

**SINTESIS DAN PENGKLONAN FRAGMEN-FRAGMEN
DNA APOBEC3G KE DALAM VEKTOR *pBluescript* KS (-)**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M. Biomedik)**

**ANGELA FUZAIRI
NPM: 610501202X**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
DESEMBER 2008**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Angela Fuzairi
NPM : 610501202X
Tanda Tangan :
Tanggal : 17 Desember 2008



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Angela Fuzairi
NPM : 610501202X
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Sintesis dan Pengklonaan Fragmen-fragmen DNA
APOBEC3G ke dalam vektor *pBluescript* KS (-)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Budiman Bela, Sp.MK. ()
Pembimbing : dr. Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D, Sp.MK. ()
Penguji : dr. T. Mirawati Soediro, Ph.D ()
Penguji : dr. Ahmad Aulia Jusuf, Ph.D ()
Penguji : Ahmad Ruslan Handoyo Utomo, Ph.D ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 17 Desember 2008

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik:
Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati W.

()

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Angela Fuzairi
NPM : 610501202X
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Mikrobiologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul: **Sintesis dan Pengklonnan Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G ke dalam vektor *pBluescript* KS (-)**.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis. Adapun hak cipta karya ilmiah ini dimiliki oleh *Institute of Human Virus and Cancer Biology of University of Indonesia (IHVCB-UI)*

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 17 Desember 2008
Yang menyatakan



(Angela Fuzairi)

ABSTRAK

Nama : Angela Fuzairi
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul : Sintesis dan Pengklonaan Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G ke Dalam Vektor *pBluescript* KS (-)

Latar Belakang: APOBEC3G, *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*, merupakan protein manusia yang dapat mengganggu replikasi HIV dengan memasukkan dirinya ke dalam partikel virus dan merusak susunan materi genetik virus. Beberapa studi terbaru menunjukkan bahwa APOBEC3G manusia mengatur infektivitas HIV-1 dengan mendeaminasi dC menjadi dU pada rantai minus DNA yang baru dibentuk, menyebabkan hipermutasi G menjadi A dari rantai plus DNA viral. Induksi hipermutasi oleh APOBEC3G dapat menyebabkan pembentukan stop kodon pada ORF protein virus dan memicu degradasi DNA virus oleh glikosilase DNA urasil yang selanjutnya dapat menghambat replikasi HIV. Protein ini layak untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka pengembangan anti retrovirus yang berbasis pada mekanisme penghambatan replikasi HIV-1 melalui jalur APOBEC3G. Sebagai langkah awal, diperlukan sistem ekspresi gen APOBEC3G yang akan diperoleh melalui sintesis dan kloning gen APOBEC3G ke dalam vektor ekspresi DNA rekombinan.

Metode: Untuk mendapatkan mRNA APOBEC3G yang akan digunakan sebagai pola cetak dalam sintesis cDNA APOBEC3G, dilakukan ekstraksi RNA dari sel CEM-GFP menggunakan Rneasy Mini Kit. Agar DNA APOBEC3G lengkap dapat diperoleh dengan lebih mudah, sintesis DNA serat ganda APOBEC3G menggunakan reaksi RT-PCR dua tahap, dibagi atas tiga daerah pada gen APOBEC3G dengan susunan nukleotida yang bertumpang tindih (*overlapping*) pada bagian ujung segmen DNA yang akan berfungsi sebagai penyambung fragmen-fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G utuh.

Hasil: Hasil eksperimen menunjukkan ketiga fragmen APOBEC3G yang masing-masing berukuran 452 pb, 458 pb, dan 433 pb berhasil dibentuk lewat reaksi PCR dengan menggunakan enzim Pfx dan diklona ke dalam vektor plasmid.

Kesimpulan: DNA APOBEC3G yang dibagi menjadi 3 fragmen telah berhasil didapat dan terklona ke dalam *pBluescript* KS (-). Pekerjaan lanjutan akan dilakukan untuk verifikasi sekuen fragmen-fragmen terklona dan menyambung ketiga fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G yang utuh yang kemudian akan diklona ke dalam vektor ekspresi.

Kata Kunci:

Kloning APOBEC3G, HIV, Vif

ABSTRACT

Name : Angela Fuzairi
Study Program : Ilmu Biomedik
Title : Synthesis and Cloning of fragments APOBEC3G DNA Into pBluescript SK (-) Vector

Background: APOBEC3G, apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G, is a human protein that interferes with the replication of HIV by incorporating itself into virus particles and damaging the genetic material of the virus. Several recent studies revealed that human APOBEC3G regulates HIV-1 infectivity by deaminating dC to dU in the newly synthesized minus strand DNA, resulting in G to A hypermutation of the viral plus strand DNA. Hypermutation induced by APOBEC3G may result in the introduction of stop codons in viral protein open reading frame and degradation of viral DNA by uracil-DNA glycosylase, therefore blocking HIV replication. This protein is therefore suitable for further investigation for the development of ARV (Anti-Retroviral) that is based on mechanism of blocking HIV-1 replication inhibition by APOBEC3G through the pathway. In order to obtain the APOBEC3G protein, an expression system of the APOBEC3G gene is required, which will be obtained by synthesis and cloning of the APOBEC3G gene into an expression vector.

Method: To obtain the APOBEC3G mRNA that will be used as template for synthesis of APOBEC3G cDNA by RT-PCR using Omniscript enzyme, we performed RNA extraction from CEM-GFP cell line using the Rneasy Mini Kit. In order to facilitate the synthesis of a complete APOBEC3G DNA, the APOBEC3G DNA double stranded was divided into three regions with overlapping nucleotide sequences at the DNA ends that function in the joining of the fragments into a full length APOBEC3G DNA.

Results: The result of the experiments showed that the three fragments of APOBEC3G gene of 452 bp, 458 bp, and 433 bp, were successfully produced by PCR reaction using Pfx enzyme, and cloned into plasmid vector.

Conclusions: APOBEC3G DNA that was divided into three fragments has been obtained and cloned into pBluescript KS (-) vector. Further study, will be performed to verify the cloned fragments, and to fuse the fragments into a complete APOBEC3G DNA that will be cloned into an expression vector.

Key words:

Clone APOBEC3G, HIV, Vif

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik Program Studi Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr Budiman Bela, Sp.MK selaku Pembimbing I dan dr Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D., Sp.MK selaku Pembimbing II, yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
2. Dr.rer.physiol.Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Biomedik dan memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan tepat waktu.
3. dr. Mardiasuti, M.Sc., Sp.MK selaku ketua Departemen Mikrobiologi FKUI (sampai dengan periode 2008) atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan pendidikan di lingkungan Departemen Mikrobiologi FKUI.
4. Pembina, Ketua Pengurus beserta anggota, staf karyawan laboratorium *Institute of Human Virus and Cancer Biology of University of Indonesia* (IHVCB-UI) dan terutama pada dr Fera Ibrahim, M.Sc., Ph.D., Sp.MK selaku *Director for Science* IHVCB-UI, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan riset di laboratorium IHVCB-UI.
5. Orang tua (Djohan Fuzairi dan Linggawaty), yang telah memberikan nasihat, bantuan dukungan material dan moral

6. Adik (Albert Fuzairi), Om Stefanus Lembar, Isabella, serta Novrendi, yang telah memberikan nasihat dan dukungan kepada saya selama menjalani pendidikan sampai selesainya penyusunan tesis ini.
7. Sahabat-sahabat saya, khususnya Bu Yus,teman satu angkatan pada kekhususan Mikrobiologi, atas segala nasihat, kerjasama, persahabatan, dukungan yang diberikan kepada saya selana ini. Untuk Mbak Ika, Mbak Henni, Pak Andi Yasmon, Mbak Silvi, Mbak Sofy, Mbak Aroem, Mbak Wani, Mbak Ade, Mbak Nengah, Mbak Evi, Mbak Vivi, Mbak Yuni, Mbak Via, Mbak Deka, Mbak Wendra, Fithri, Atep, Mas budi, Mas eki, Mas Heru, Toro, Sance, Adit, Wuri, Lulut, Anjar,Rudina, Kiki, Murni, dan sahabat lainnya yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas segala kerjasama, nasihat, diskusi, bantuan, waktu yang diluangkan hingga larut malam, selama penyusunan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 1 Desember 2008

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	iv
ABSTRAK.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
I. PENDAHULUAN.....	1
1. Latar Belakang.....	1
2. Rumusan Masalah.....	3
3. Hipotesis.....	3
4. Tujuan Penelitian.....	4
5. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
1. <i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like</i>	
3G (APOBEC3G).....	5
1.1. Protein Famili APOBEC3G.....	5
1.2. Aktivitas Protein Famili APOBEC3.....	6
1.3. Penghambatan Replikasi HIV-1 melalui jalur APOBEC3G....	7
1.3.1. Struktur dan Genom Virus.....	7
1.3.2. Sifat-sifat khusus dan siklus Hidup HIV.....	9
1.3.3. Interaksi Protein APOBEC3G dan Virus HIV.....	12
2. Sintesis Fragmen DNA dengan Teknik PCR.....	15
2.1. <i>Reverse Transcriptase</i> PCR (RT-PCR).....	15
2.2. Nested PCR.....	16
2.3. RT-Q-PCR (Real-Time-Quantitative PCR).....	17
3. PENGKLONAN.....	18
3.1. Teknologi DNA Rekombinan.....	18

3.2. Vektor DNA Rekombinan.....	21
III. BAHAN DAN CARA KERJA.....	25
1. BAHAN.....	25
1.1. Galur Bakteri.....	25
1.2. SEL CEM GFP.....	25
1.3. Plasmid.....	25
1.4. Primer.....	26
2. ALUR PENELITIAN.....	27
2.1. Kultur sel CEM-GFP.....	28
2.2. Ekstraksi RNA Sel.....	28
2.3. Sintesis cDNA fragmen-fragmen gen APOBEC3G.....	29
2.4. Amplifikasi fragmen-fragmen gen APOBEC3G.....	29
2.5. Konstruksi plasmid rekombinan.....	30
2.5.1. Isolasi Plasmid pBluescript.....	30
2.5.2. Purifikasi Hasil Amplifikasi Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G.....	31
2.5.3. Pemotongan Plasmid dengan Enzim Restriksi.....	31
2.5.4. Ligasi Sisipan dan Plasmid.....	31
2.6. Transformasi Hasil Ligasi.....	32
2.7. Identifikasi Klon.....	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
1. HASIL.....	34
1.1. Analisis Hasil Ekstraksi RNA.....	34
1.2. Sintesis DNA APOBEC3G.....	35
1.2.1. Sintesis DNA APOBEC3G <i>full length</i>	35
1.2.2. Sintesis tiga fragmen DNA APOBEC3G (berdasarkan sekuen mRNA).....	39
1.3. Konstruksi Plasmid Rekombinan.....	41
1.4. Transformasi Hasil Ligasi.....	42
1.5. Hasil Isolasi Plasmid.....	42
1.5.1. Identifikasi klon dengan PCR.....	44

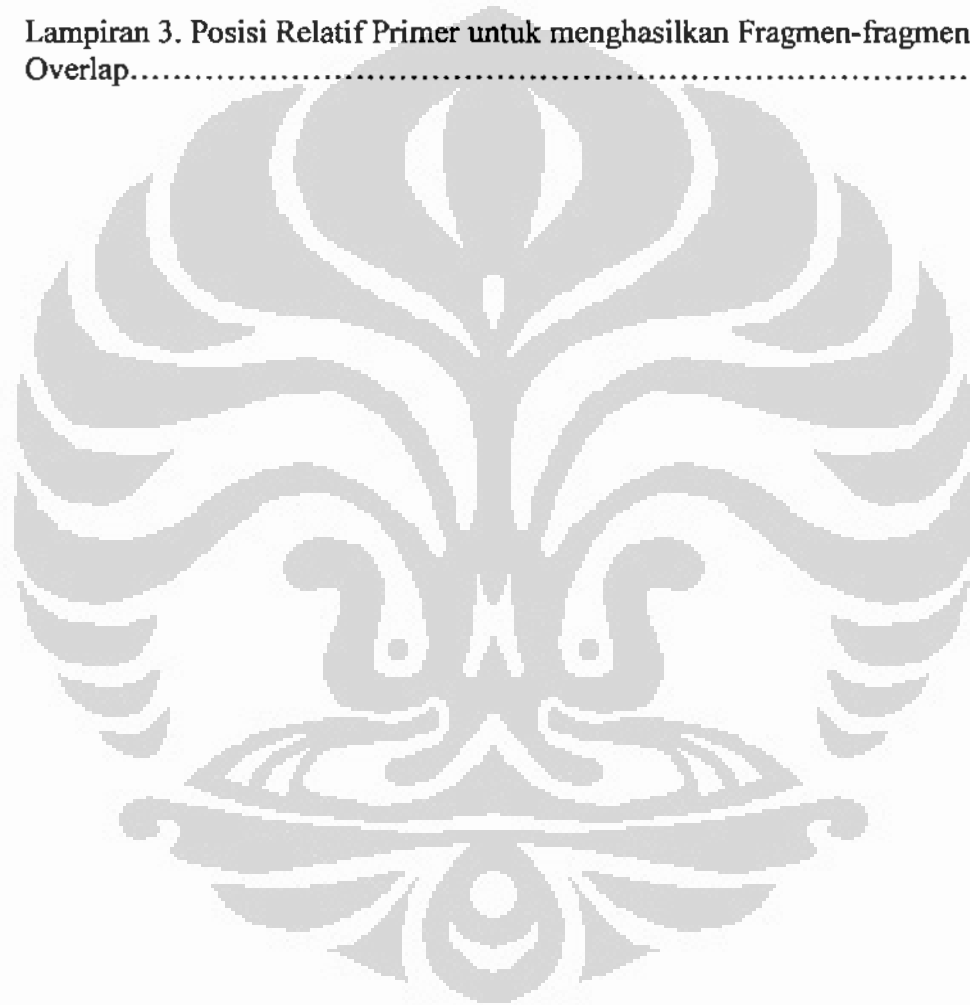
1.6. Isolasi Plasmid ulang Fragmen III.....	45
1.6.1. Identifikasi Sisipan dengan Enzim Restriksi.....	46
1.6.2. Identifikasi klon framen III DNA APOBEC3G dengan PCR.....	47
1.7. Isolasi Plasmid ulang Fragmen II.....	48
1.7.1. Identifikasi Sisipan dengan Enzim Restriksi.....	48
1.7.2. Identifikasi klon framen II DNA APOBEC3G dengan PCR.....	49
1.8. Isolasi Plasmid ulang untuk fragmen I.....	50
1.8.1. Identifikasi sisipan dengan enzim restriksi.....	51
1.8.2. Identifikasi klon framen I DNA APOBEC3G dengan PCR.....	52
1.8.3. Identifikasi sisipan dengan dua enzim.....	52
1.9. <i>Overlap extension</i> Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G.....	53
2. PEMBAHASAN.....	54
V. KESIMPULAN.....	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59
LAMPIRAN.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur dan genom HIV-1.....	8
Gambar 2. Siklus Hidup HIV (atas) dan Infeksi HIV pada sel hospes (bawah).....	11
Gambar 3: Interaksi HIV <i>wild type</i> dan HIV-1 <i>Δvif</i> dengan APOBEC3G	14
Gambar 4. Plasmid pBluescript II KS (+/-).....	23
Gambar 5. Analisis hasil ekstraksi RNA.....	34
Gambar 6. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G <i>full length</i> (konsentrasi akhir primer 0,5μM; suhu annealing 52°C).....	35
Gambar 7. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G <i>full length</i> dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 0,5 μM.....	36
Gambar 8. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G <i>full length</i> dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 5 μM.....	37
Gambar 9. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G <i>full length</i> dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 25 μM.....	37
Gambar 10. Analisis hasil purifikasi isolasi gel DNA APOBEC3G (1155 pb)....	38
Gambar 11. Analisis hasil sintesis DNA APOBEC3G <i>full length</i> dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 25 μM.....	39
Gambar 12. Analisis hasil: fragmen I DNA APOBEC3G.....	40
Gambar 13. Analisis hasil fragmen II dan fragmen III DNA APOBEC3G.....	40
Gambar 14. Analisis hasil purifikasi fragmen I DNA APOBEC3G.....	41
Gambar 15. Analisis hasil purifikasi fragmen II dan III DNA APOBEC3G.....	41
Gambar 16. Analisis hasil isolasi plasmid.....	43
Gambar 17. Analisis hasil isolasi plasmid.....	43
Gambar 18. Analisis hasil identifikasi klon yang mengandung sisipan DNA APOBEC3G dengan PCR.....	44
Gambar 19. Analisis hasil isolasi plasmid ulang fragmen III DNA APOBEC3G..	45
Gambar 20. Analisis hasil isolasi plasmid ulang fragmen III DNA APOBEC3G..	45
Gambar 21. Analisis hasil identifikasi plasmid rekombinan dengan enzim restriksi.	46
Gambar 22. Analisis hasil identifikasi plasmid rekombinan fragmen III DNA APOBEC3G dengan enzim restriksi.....	47
Gambar 23. Analisis hasil identifikasi klon yang mengandung sisipan fragmen III DNA APOBEC3G dengan PCR.....	47
Gambar24. Analisis hasil isolasi plasmid untuk fragmenII DNAAPOBEC3G.....	48
Gambar 25. Analisis hasil identifikasi plasmid rekombinan dengan enzim EcoRI.	49
Gambar 26. Analisis hasil identifikasi klon dengan PCR.....	49
Gambar 27 . Analisis hasil isolasi plasmid ulang fragmen I DNA APOBEC3G.....	50
Gambar 28. Analisis hasil identifikasi plasmid rekombinan dengan enzim restriksi...	51
Gambar 29. Analisis hasil identifikasi klon dengan PCR.....	52
Gambar 30. Analisis hasil identifikasi sisipan fragmen I DNA APOBEC3G dengan dua enzim retsriksi.....	53
Gambar 31. Analisis hasil <i>overlap extension</i> fragmen-fragmen APOBEC3G.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Primer pada mRNA APOBEC3G untuk Fragmen-fragmen APOBEC3G.....	63
Lampiran 2. Posisi Relatif Primer <i>Full Length</i> Gen APOBEC3G.....	64
Lampiran 3. Posisi Relatif Primer untuk menghasilkan Fragmen-fragmen gen Overlap.....	65



BAB I PENDAHULUAN

1. LATAR BELAKANG

Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) merupakan suatu protein yang diekspresikan terutama pada limfosit T manusia.²⁰ Beberapa studi terbaru menunjukkan bahwa APOBEC3G manusia menghambat infektivitas HIV-1 dengan mendeaminasi dC menjadi dU pada rantai minus DNA yang baru dibentuk, menyebabkan hipermutasi G menjadi A dari rantai plus DNA viral. Induksi hipermutasi oleh APOBEC3G menyebabkan stop kodon pada ORF protein virus atau pemicu degradasi DNA virus oleh glikosilase DNA urasil yang selanjutnya dapat menghambat replikasi HIV. Gen APOBEC3G manusia juga memiliki aktivitas antiretroviral pada lentivirus lainnya dan virus leukemia murin (MLV) dengan mekanisme yang sama.⁴⁰

Kabat (2003) menemukan bahwa HIV mengkode protein yang berperan sebagai faktor infektifitas, yang disebut vif (*Viral Infectivity Factor*).¹⁵ Protein vif dapat menghalangi perakitan APOBEC3G manusia ke dalam virion dengan cara mendegradasi APOBEC3G melalui jalur ubiquitin yang difasilitasi oleh vif. Hal ini memungkinkan HIV-1 dapat bereplikasi dalam sel yang memproduksi APOBEC3G.¹⁸

Pengaruh vif dalam infektifitas virus telah dibuktikan melalui observasi infektivitas virus yang tidak mengandung vif pada dua kelompok sel yaitu, sel *permissive* dan sel *non-permissive* yang terdapat pada infeksi HIV. Pada sel *permissive* seperti HeLa, COS, C8166, Jurkat, U937, SupT1, atau 293T, vif tidak dibutuhkan untuk infeksi HIV. Untuk sel *non-permissive* seperti H9, CEM, Hut68, sel darah tepi dan makrofag, Vif dibutuhkan untuk replikasi HIV. Telah diketahui bahwa sel *non-permissive* mengekspresikan APOBEC3G untuk menginaktivasi

HIV-1 jika tidak ada vif didalamnya. Selama vif berada dalam *RNA binding protein*, vif melindungi genom HIV dari serangan APOBEC3G.⁴⁰

Kekebalan terhadap semua jenis obat antiretrovirus yang digunakan dalam terapi infeksi HIV-1 telah ditemukan. Kenyataan ini mendorong dilakukannya usaha-usaha untuk menemukan obat antiretrovirus jenis baru yang diharapkan lebih efektif dalam menghambat replikasi virus HIV-1. Selama ini penelitian yang telah digunakan dengan kultur virus terasa kurang praktis untuk digunakan skrining kandidat anti HIV-1 dalam jumlah banyak. Di samping itu juga dipertimbangkan dari aspek fasilitas laboratorium yang diperlukan untuk kultur virus. Untuk mempermudah skrining kandidat anti HIV dalam jumlah banyak, baik berupa bahan alam atau sintetik, diperlukan sistem skrining yang cepat, aman, dan murah dibandingkan dengan kultur virus. Salah satu alternatif sistem yang dikembangkan untuk mencapai tujuan ini ialah dengan menggunakan interaksi antara protein rekombinan APOBEC3G dan vif HIV-1.

Fakta menunjukkan bahwa gen APOBEC3G telah diklona, sehingga untuk mempermudah proses pengembangan sistem yang diusulkan tersebut ialah dengan meminta izin penggunaan gen APOBEC3G yang telah diklona untuk tujuan sistem pengembangan tersebut. Namun di kemudian hari, pendekatan semacam ini berpotensi menimbulkan masalah aplikasi paten. Dalam rangka meningkatkan kemandirian Universitas Indonesia pada khususnya di Indonesia pada umumnya dalam pengembangan penelitian eksplorasi bahan-bahan anti-HIV, perlu diusahakan untuk mengembangkan sendiri sistem ekspresi protein rekombinan APOBEC3G.

Dalam penelitian ini dilakukan sintesis dan pengklonaan fragmen gen APOBEC3G, dimana pada tahap sintesis gen APOBEC3G ini digunakan PCR dua tahap untuk mensintesis DNA serat ganda APOBEC3G, yang dibagi atas tiga potongan gen APOBEC3G dengan susunan nukleotida yang saling bertumpang tindih (*overlapping*) pada ujung-ujung fragmen yang berdampingan sehingga memungkinkan penggabungan fragmen-fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G yang utuh oleh teknik *overlap extention* PCR. Penerapan teknik ini

diharapkan akan mempermudah perolehan DNA APOBEC3G. Vektor yang dipakai pada penelitian ini adalah pBluescript KS (-), yaitu vektor kloning yang memiliki situs *ori* yang berasal dari faga filamen sehingga mampu menghasilkan jumlah kopian yang tinggi (*high copy number*). Kelebihan lain yang juga dimiliki oleh fagamid *pBluescript* KS (-) yaitu dilengkapi dengan 21--22 situs pengenalan enzim restriksi yang berada pada daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) serta promotor *LacZ* yang berfungsi dalam proses seleksi biru putih.^{30,34}

2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah fragmen-fragmen gen APOBEC3G dapat diperoleh secara sintetik dengan PCR?
2. Bila fragmen-fragmen gen APOBEC3G berhasil diperoleh secara sintetik, apakah fragmen DNA tersebut dapat diklona ke dalam vektor pengklona (*pBluescript* KS -)?
3. Apakah fragmen-fragmen gen lengkap APOBEC3G dapat disintesis dengan teknik *overlap extension* PCR?

3. HIPOTESIS

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka dapat dibuat hipotesis sebagai berikut:

1. Fragmen-fragmen gen APOBEC3G dapat diperoleh secara sintetik dengan menggunakan PCR dua tahap untuk mensintesis DNA serat ganda APOBEC3G.
2. Pengklonaan fragmen-fragmen gen APOBEC3G sintetik dapat diklona ke dalam vektor pengklona (*pBluescript* KS -)
3. Fragmen-fragmen gen lengkap APOBEC3G dapat disintesis dengan teknik *overlap extension* PCR

4. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk memperoleh DNA sintetik APOBEC3G sel CEM-GFP. Sedangkan tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk memperoleh fragmen-fragmen DNA sintetik APOBEC3G, dan memperoleh klon plasmid pembawa fragmen-fragmen DNA.

5. MANFAAT PENELITIAN

Manfaat yang bisa didapatkan dari penelitian ini adalah :

Fragmen-fragmen DNA sintetik APOBEC3G yang didapat, kemudian akan disambung menjadi DNA APOBEC3G yang utuh, dan akan dipakai untuk ekspresi protein rekombinan APOBEC3G, dalam rangka studi interaksi protein Vif HIV-1 dan APOBEC3G serta molekul-molekul penghambat interaksi tersebut.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

1. *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G* (APOBEC3G)

Lentivirus primata, kecuali *Equine Infectious Anemia Virus* (EIAV), mengkode protein *Viral Infectivity Factor* (Vif). Vif HIV-1 adalah fosfoprotein yang berukuran 23 kDa yang berperan penting di dalam siklus hidup virus. Mekanisme fungsional ini masih belum jelas hingga APOBEC3G diidentifikasi sebagai faktor antivirus. Protein APOBEC3G dikelompokkan ke dalam famili enzim deaminase sitidin APOBEC, dimana termasuk juga APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3 (A sampai F, H), dan AID (Activation-Induced cytidine Deaminase).³⁵

Protein APOBEC3G mendeaminasi dC menjadi dU pada DNA virus yang baru terbentuk selama proses transkripsi balik, sehingga menghasilkan kerusakan DNA virus dan hipermutasi G menjadi A pada DNA serat positif. Hal ini mengakibatkan replikasi virus terhambat. Beberapa studi menunjukkan bahwa anggota famili APOBEC lain juga memiliki aktivitas antivirus terhadap HIV-1, walaupun sensitivitas terhadap protein vif bervariasi satu dengan yang lain. Spektrum fungsi antivirus famili APOBEC juga terjadi pada retrovirus yang lain, termasuk lentivirus yang lain, *Human T-cell Leukemia Virus type 1* (HTLV-1), *Murine Leukemia Virus* (MLV), dan *foamy viruses*, bahkan juga virus hepatitis B dan retrotransposon.³⁵

1.1. Kelompok Protein APOBEC3G

Kelompok APOBEC3G terdiri dari APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3 (A sampai F, H), dan AID. Protein APOBEC1 adalah enzim prototipik dan merupakan komponen utama dalam kompleks editosom RNA yang mendeaminasi sitosin 6666

dalam mRNA apolipoprotein B mamalia. Protein AID berperan dalam hipermutasi somatik. Baik APOBEC1 dan AID, berperan juga dalam mengkatalisis deaminasi residu dC pada DNA untai tunggal secara *in vitro*.⁷

Protein APOBEC3G adalah salah satu kelompok gen yang terdapat di dalam kromosom 22. Semua gen APOBEC3 (A-H) disusun didalam orientasi yang sama dan pola ekspresinya dalam jaringan secara spesifik. Protein APOBEC3G, APOBEC3F, dan APOBEC3C tereksresi di dalam limfa, limfosit darah tepi, ovarium, dan testis. Protein APOBEC3A dan APOBEC3B sering ditemukan pada berbagai *cancer cell line*. Gen APOBEC3 dapat aktif dalam bentuk homodimer.⁷

1.2. Aktivitas Famili Protein APOBEC3

Laporan awal dari laboratorium Landau memperlihatkan bahwa APOBEC3B, APOBEC3C, dan APOBEC3F tidak menunjukkan adanya fungsi anti HIV-1. Beberapa studi yang dilakukan oleh laboratorium lain melaporkan bahwa APOBEC3F menunjukkan aktivitas antivirus terhadap HIV-1. APOBEC3B juga menunjukkan aktivitas antivirus terhadap HIV-1, walau aktivitasnya tidak begitu tinggi. Sebaliknya, APOBEC3A dan APOBEC3C tidak mempunyai kemampuan aktivitas anti HIV-1. APOBEC1, dan AID tidak dapat menghambat HIV-1, sekalipun terakit ke dalam virus.³⁵

Pada spesies lain, seperti APOBEC3 *murine* mempunyai kemampuan aktivitas anti HIV-1. APOBEC1 pada tikus mampu menghambat HIV-1 melalui hipermutasi C menjadi T.³⁵

Protein APOBEC3G dibanding dengan protein APOBEC3 yang lain, terlebih dahulu telah diketahui dapat menghambat replikasi HIV-1 yang mengandung delesi pada gen yang menyandi faktor infektivitas virus (HIV-1 Δvif).³²

Pengaruh Vif dalam infektifitas virus telah dibuktikan melalui observasi infektivitas virus yang tidak mengandung Vif pada dua kelompok sel yaitu, sel *permissive* dan sel *non-permissive* yang terdapat pada infeksi HIV. Pada sel *permissive* dikelompokkan seperti HeLa, COS, C8166, Jurkat, U937, SupT1, atau

293T, Vif tidak di butuhkan untuk infeksi HIV. Untuk sel *non-permissive* seperti H9, CEM, Hut68, sel darah tepi dan makrofag, Vif dibutuhkan untuk replikasi HIV. Telah diketahui bahwa sel *non-permissive* mengekspresikan APOBEC3G untuk menginaktivasi HIV-1 jika tidak ada vif didalamnya.⁴⁰

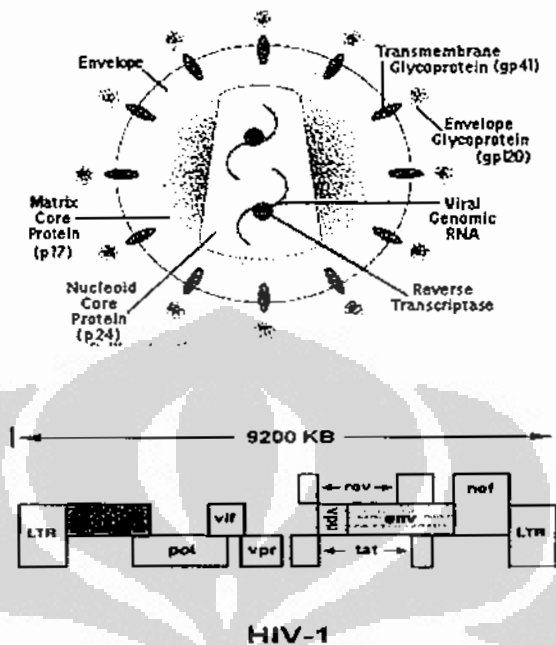
Salah satu bukti bahwa APOBEC3G merupakan faktor penghambat replikasi HIV-1 ialah ekspresi APOBEC3G hanya terjadi pada sel yang non permisif terhadap infeksi HIV-1 Δvif , dan bahwa ekspresi APOBEC3G pada sel yang *permissive* mengubah sel ini menjadi *non permissive*.³²

1.3. Penghambatan Replikasi HIV-1 melalui jalur APOBEC3G

1.3.1. Struktur dan genom virus

Virion memiliki bentuk *spherical*, berdiameter sekitar 110 nm berupa membran *lipid bilayer* dan memiliki *envelope* yang mengelilingi nukleokapsid. Setiap nukleokapsid memiliki panjang 100 nm (Luciw, 1996). Terdapat pula bentuk seperti paku (*spike*) pada membran terluar yang merupakan protein Env (gp120 dan gp41) Membran (atau *envelope*) HIV ekstraseluler dan partikel SIV terdiri dari sekitar 72 *knob* (atau *spike*).¹⁹

Ketika virus meninggalkan sel, maka virus tersebut tidak infeksius dan bagian dalam dari partikel virus terdiri dari inti yang bulat (*spherical*). Virus ini masih dalam bentuk tidak matang. Bentuk matang virus terjadi ketika enzim protease virus telah memecah protein-protein Gag. Pada saat ini, bagian inti (*core*) akan berbentuk kerucut (*truncated core*). Bentuk khas inti ini membuat HIV mudah dikenali. Protein gp120 dan gp41 terlihat lebih jarang.¹⁹



Gambar 1. Struktur dan genom HIV-1.²

Virion infeksius HIV mengandung 2 kopi RNA untai tunggal yang identik dengan panjang 9,2 kb. Pada tahap awal infeksi, genom virion yang berupa RNA diubah menjadi DNA linier untai ganda melalui proses transkripsi balik [dengan enzim *reverse transcriptase* (RT)]. HIV memiliki 2 bentuk genom, yaitu RNA untai tunggal saat berada di luar sel (virion) dan DNA untai ganda (provirus).¹⁹

Organisasi genom HIV terdiri 3 gen utama, yaitu *gag*, *pol* dan *env*, yang mengkode protein kapsid (Gag), enzim virus yang digunakan dalam replikasi (Pol) dan glikoprotein eksternal (Env) yang terdapat pada bagian luar *envelope* virus serta bertanggung jawab terhadap infektivitas partikel virus melalui ikatan dengan reseptor sel spesifik.²⁶

Produk gen *gag* adalah protein matriks (MA) yang terdapat di antara membran (*envelope*) virus dengan nukleokapsid; juga protein kapsid (CA) yang membentuk perisai kapsid serta protein nukleokapsid (NC) yang berikatan dengan dengan RNA virus. Enzim yang dikode oleh *pol* adalah protease, *reverse transcriptase* dan integras.²⁶ Gen *env* merupakan gen yang mengkode *envelope* HIV. Protein yang

dihasilkan adalah protein *surface* [SU (gp120)] dan protein transmembran [TM (gp41)]. Protein ini terdapat di bagian terluar dari partikel virus, menyebabkan virus dapat berikatan dan berfusi dengan sel target untuk memulai siklus infeksiusnya. Protein ini memiliki struktur seperti tombol (*knob*).¹⁹

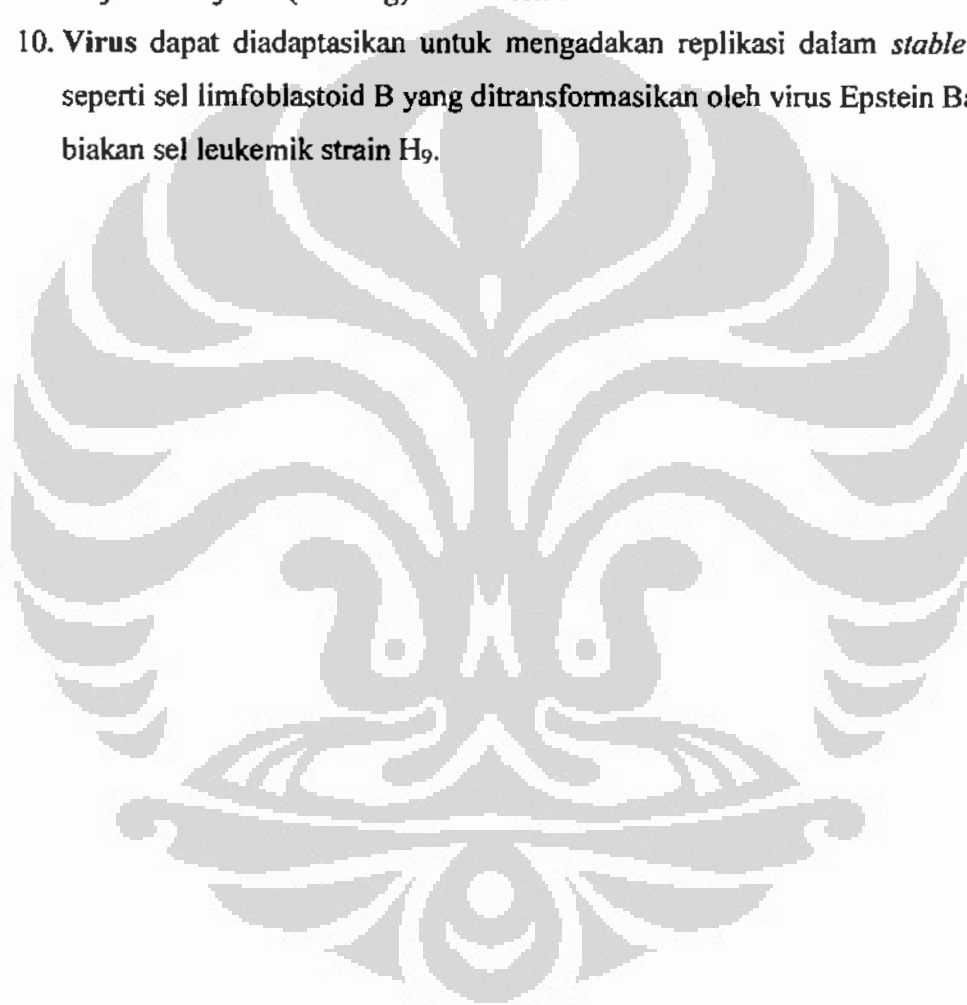
Molekul DNA HIV memiliki satu promoter dan *polyadenilation site* dalam *Long Terminal Repeat* (LTR). Daerah U3 dan U5 dari LTR berperan dalam poliadenilasi pada ujung 3' LTR. Beberapa protein tambahan yang diekspresikan HIV-1 merupakan protein-protein yang menjadi bagian dari partikel virus (*vif* dan *vpr*), mengatur secara langsung ekspresi gen virus (*tat* dan *rev*), atau berinteraksi dengan mesin seluler untuk meningkatkan propagasi virus (*vpu* dan *nef*). Protein-protein tambahan ini meningkatkan kompleksitas organisasi dan ekspresi gen HIV.²⁶

1.3.2. Sifat-sifat khusus dan siklus hidup HIV

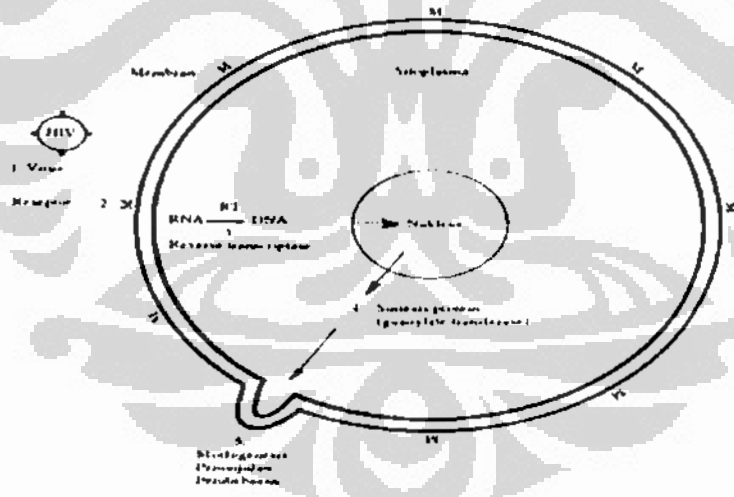
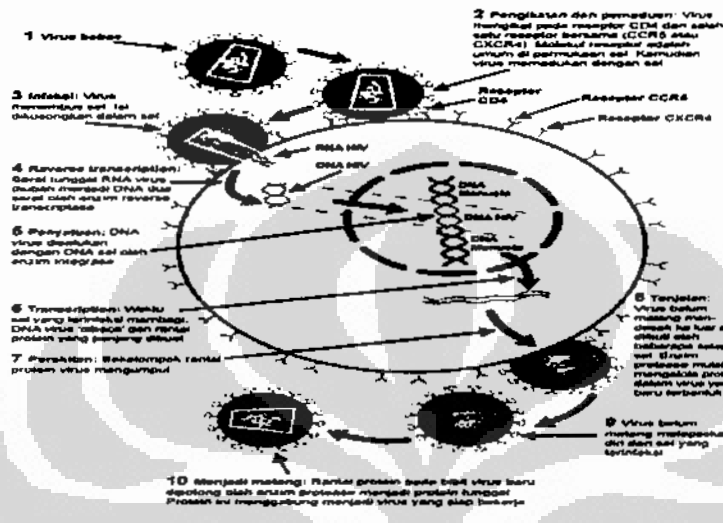
Sifat-sifat khusus HIV dapat dibahas sebagai berikut:³¹

1. **Morfologi:** membentuk tonjolan pada permukaan sel; partikel virus dewasa (*mature*) mempunyai inti eksentrik berbentuk batang
2. **Densitas:** 1.16 – 1.17 dalam gradien sukrosa
3. **Struktur Antigenik:** ada dua, yaitu HIV-I dan HIV-II yang mempunyai persamaan dalam tropismanya terhadap limfosit T, efek sitopatiknya, tetapi berbeda secara biologik molekul dan tropisnya pada golongan kera (HIV-I menginfeksi Chimpanse dan HIV-II golongan *Macacus*)
4. **Asam nukleat:** mempunyai RNA yang terdiri atas dua subunit identik (9200 base pair) dengan tiga gen utama (*gag*, *pol*, *env*) serta beberapa gen tambahan (LTR, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, dan *nef*)
5. **Enzim reverse transcriptase (RT):** bekerja dengan menggunakan *primer lysin transferRNA* dan bantuan Mg^{++} .
6. **Prekursor gag:** p 53, prekursor env: gp 160
7. **Glycoprotein peplos:** terdiri atas gp 120, gp 41

8. **Tropisma:** spesifik, selektif tinggi terhadap sel *limfosit T-helper* yang memegang peranan penting pada sistem imunitas seluler.
9. **Sitopatologi:** HIV pada biakan sel limfosit menimbulkan efek sitopatik yang khas, berupa sel raksasa yang berinti banyak (*multinucleated giant cell*). Pada permukaan sel dari biakan sel leukemik secara *in vitro* akan terlihat adanya tonjolan-tonjolan (*budding*) dari virion HIV
10. **Virus** dapat diadaptasikan untuk mengadakan replikasi dalam *stable cell lines* seperti sel limfoblastoid B yang ditransformasikan oleh virus Epstein Barr (EBV), biakan sel leukemik strain H₉.



Siklus hidup HIV dan infeksi sel hospes oleh HIV secara skematik dapat dilihat pada gambar dibawah ini;



Gambar 2. Siklus Hidup HIV (atas) dan Infeksi HIV pada sel hospes (bawah).³¹

1.3.3. Interaksi Protein APOBEC3G dan Virus HIV

Salah satu mekanisme yang dapat menjelaskan penghambatan replikasi HIV-1 oleh APOBEC3G ialah kemampuan enzim ini mendeaminasi residu sitidin pada saat sintesis serat negatif DNA HIV-1, sehingga menyebabkan hipermutasi G→A pada genom RNA HIV-1.¹⁴ Hipermutasi yang diinduksi oleh APOBEC3G dapat menyebabkan pembentukan kodon terminasi pada "open reading frame" penyandi protein virus maupun memicu degradasi DNA virus oleh glikosilase DNA urasil, sehingga menghambat replikasi HIV.¹³ Mekanisme hipermutasi G→A bukan merupakan satu-satunya mekanisme kerja APOBEC3G dalam penghambatan replikasi virus. Studi yang dilakukan oleh beberapa peneliti mengindikasikan adanya mekanisme lain yang menyebabkan penghambatan APOBEC3G terhadap replikasi HIV-1 disamping melalui proses deaminasi deoksi sitidin.⁷ Suatu studi yang mempelajari bagian terminal amino (N) dan karboksil (C) APOBEC3G secara terpisah memperlihatkan bahwa bila diekspresikan secara terpisah masing-masing bagian tersebut tidak dapat berfungsi sebagai agen pemutasi DNA, tetapi fungsi penghambatan replikasi HIV-1 masih dapat ditemukan pada kedua bagian APOBEC3G tersebut.²⁵

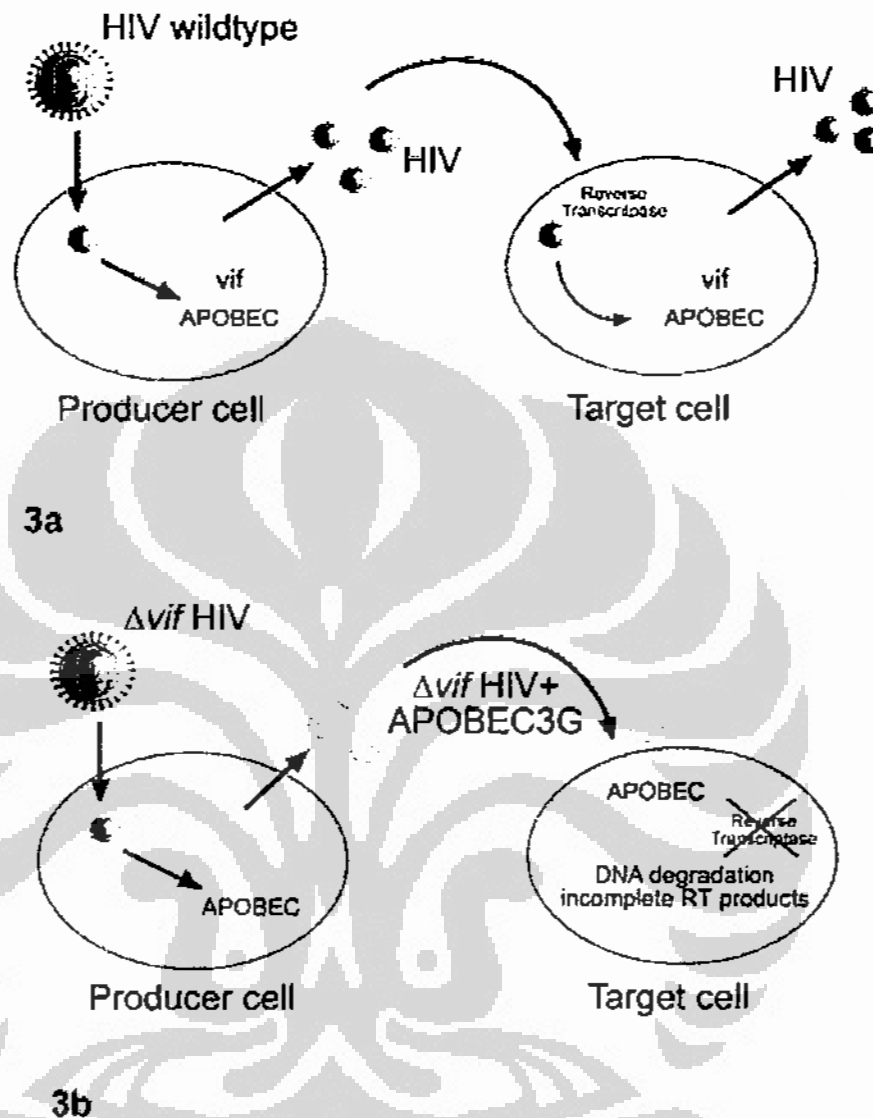
Interaksi APOBEC3G dengan RNA virus merupakan salah satu mekanisme yang berperan penting dalam fungsinya sebagai penghambat replikasi HIV-1. APOBEC3G menghambat replikasi HIV-1 akibat perakitan protein ini ke dalam partikel virus pada sel penghasil virus. Perakitan APOBEC3G ke dalam partikel virus terjadi akibat interaksi protein ini dengan poliprotein GAG HIV-1.³⁸ Mekanisme lain yang mungkin berperan dalam perakitan APOBEC3G ke dalam partikel virus ialah interaksinya dengan RNA virus, dimana RNA virus yang terakit ke dalam partikel virus telah terbukti meningkatkan jumlah APOBEC3G yang terakit ke dalam partikel virus secara signifikan.¹⁷

Studi fungsi APOBEC3G pada sel-sel T CD4+ yang tidak aktif membelah memperlihatkan bahwa APOBEC3G pada sel-sel tersebut berat molekulnya lebih rendah atau berada dalam bentuk LMM (*Low Molecular Mass*). APOBEC3G LMM tersebut memiliki daya hambat replikasi HIV-1 lebih tinggi dibanding APOBEC3G

pada sel-sel T CD4+ teraktivasi, dimana dalam sel-sel teraktivasi tersebut APOBEC3G ditemukan dalam kompleks ribonucleoprotein bermassa molekul besar atau HMM (*High Molecular Mass*). Bila kompleks APOBEC3G HMM tersebut dipaparkan dengan enzim Rnase, APOBEC3G kembali dalam bentuk LMM yang fungsional.⁷

Fungsi penghambatan replikasi HIV-1 oleh APOBEC3G dapat dihambat oleh protein Vif HIV-1.²¹ Interaksi protein Vif dengan APOBEC menyebabkan terjadinya ubiquitinasi APOBEC3G yang mengakibatkan terbawanya APOBEC3G ke proteasom untuk didegradasi sehingga APOBEC3G tidak dapat terakit ke dalam virus HIV-1²² dan melaksanakan fungsinya sebagai penghambat replikasi pada saat virus mengalami proses transkripsi terbalik.^{20,39} Bila protein Vif diekspresikan pada sel non permisif yang memproduksi partikel virus HIV-1 Δvif , defek pada virus dapat dikoreksi, tetapi hal ini tidak terjadi bila partikel virus HIV-1 Δvif diinfeksi pada sel non permisif yang memproduksi protein Vif.³

Mengingat dalam sel-sel yang teraktivasi terjadi peningkatan sintesis mRNA untuk produksi sitokin dan kimokin maupun untuk pembentukan sel-sel baru, maka dapat dibayangkan bahwa akibat adanya interaksi APOBEC3G dengan RNA, APOBEC3G yang ada dalam sel akan direkrut ke dalam kompleks ribonucleoprotein selular, sehingga mengurangi jumlah APOBEC3G yang terakit ke dalam virus mencapai jumlah yang tidak dapat terdeteksi.¹⁷



Gambar 3: Interaksi HIV wild type dan HIV-1 Δvif dengan APOBEC3G. ²⁹

Aktivitas antivirus APOBEC3G sangat tinggi diantara spesies yang bervariasi, sedangkan pemblokiran APOBEC3G oleh vif secara spesifik juga tinggi untuk HIV. Ketiadaan vif, APOBEC3G bergabung kedalam bentuk partikel virus baru dan kemudian menginfeksi sel target, sintesis DNA proviral terblokir (gambar 3b). Sebaliknya, adanya vif, APOBEC3G menjadi kompleks, terdegradasi dan tidak bergabung dalam bentuk virion yang baru.

2. Sintesis Fragmen DNA dengan Teknik PCR

Sejak pertama kali diperkenalkan, teknik PCR telah berkembang sangat pesat dan diaplikasikan untuk bermacam-macam tujuan, baik untuk riset dasar maupun aplikasi praktis. Pada aspek metodologinya, teknik PCR yang pertama kali diperkenalkan memerlukan banyak kondisi khusus untuk menjamin keberhasilannya. Sebagai contoh, pada awalnya teknik PCR hanya digunakan untuk mengamplifikasi molekul DNA dengan menggunakan DNA sebagai bahan awal (*starting material*) yang akan digunakan sebagai cetakan. Dalam hal ini molekul DNA yang akan diamplifikasi harus diisolasi terlebih dahulu dari sel atau jaringan. Perkembangan lebih lanjut teknik ini memungkinkan para peneliti menggunakan molekul RNA sebagai bahan awal, yaitu dengan berkembangnya teknik *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR).³⁷ Selain itu juga terdapat berbagai teknik lainnya seperti yang dijelaskan pada uraian berikut:

2.1. *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR)

Teknik RT-PCR dikembangkan untuk melakukan analisis terhadap molekul RNA hasil transkripsi yang terdapat dalam jumlah sangat sedikit di dalam sel.

Teknik ini memerlukan enzim transcriptase balik (*reverse transcriptase*). Enzim transcriptase balik adalah enzim DNA polimerase yang menggunakan molekul RNA sebagai cetakan untuk menyintesis molekul DNA (cDNA) yang komplementer dengan molekul RNA tersebut. Beberapa enzim transkriptase balik yang dapat digunakan antara lain *mesophilic viral reverse transcriptase* (RTase) yang dikode oleh virus avian myoblastosis (AMV) maupun oleh virus Maloney murine leukemia (M-MuLV), dan *Tth* DNA polimerase. RTase yang dikode oleh AMV maupun M-MuLV bersifat sangat prosesif dan mampu mensintesis cDNA sampai sepanjang 10 kb, sedangkan *Tth* DNA polimerase mampu mensintesis cDNA sampai sepanjang 1-2 kb. Setelah terbentuk DNA, maka DNA itu dapat diamplifikasi seperti umumnya

PCR. Teknik RT-PCR digunakan untuk mengamplifikasi RNA (mRNA, tRNA dan rRNA) perlu ditekankan disini bahwa kestabilan RNA jauh lebih rendah dibandingkan dengan DNA.³⁷

Reaksi transkripsi balik dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa macam primer yaitu:³⁷

1. Oligo(dT) sepanjang 12 – 18 nukleotida yang akan melekat pada ekor poli (A) pada ujung 3' mRNA mamalia. Primer semacam ini pada umumnya akan menghasilkan cDNA yang tidak lengkap.
2. **Heksanukleotida acak** yang akan melekat pada cetakan mRNA yang komplementer pada bagian manapun. Primer semacam ini akan menghasilkan cDNA yang tidak lengkap (parsial).
3. **Urutan nukleotida spesifik** yang dapat digunakan secara selektif untuk menyalin mRNA tertentu.

2.2. Nested PCR

Modifikasi PCR yang populer adalah nested-PCR. Metode ini melibatkan dua siklus amplifikasi menggunakan dua pasang primer. Pada amplifikasi pertama menggunakan sepasang primer dan menghasilkan produk PCR yang relative panjang, yang kemudian dipindahkan ke tabung kedua. Produk PCR ini diamplifikasi dengan menggunakan primer internal sehingga menghasilkan produk yang lebih pendek.³⁷

Metode ini memiliki keunggulan dan kelemahan. Metode ini sangat peka dan selektif. Amplifikasi ulang dengan primer internal menaikkan jumlah produk PCR yang pada amplifikasi produknya belum dapat dilihat. Selain itu, amplifikasi kedua ini juga untuk menegaskan spesifitas produk PCR pertama. Pemindahan produk amplifikasi ke tabung dapat menyebabkan kontaminasi.³⁷

2.3. RT-Q-PCR (Real-Time-Quantitative PCR)

Metode RT-Q-PCR merupakan pengembangan metode PCR, bahwa hasil amplifikasi dianalisis selama proses amplifikasi dengan menggunakan pewarna DNA atau pelacak berfluoresensi. Analisis data dilakukan dalam instrument yang sama, tanpa pemindahan sampel, tanpa penambahan sampel, dan tanpa pemisahan dengan elektroforesis. Metode ini dapat digunakan untuk analisis secara kuantitatif jumlah DNA awal sehingga dapat digunakan pengukuran secara kuantitatif. Ada beberapa format deteksi, yakni:³⁷

1. Senyawa SYBR Green I. Senyawa ini berikatan dengan DNA untai ganda dan menyebabkan fluoresensi. Intensitas fluoresensi tergantung pada jumlah DNA untai ganda hasil amplifikasi.
2. Hibridisasi pelacak. Ada dua pelacak, yang satu membawa molekul donor fluoresen, sedangkan yang lainnya membawa molekul reseptor fluoresen. Apabila kedua pelacak itu menempel pada produk PCR sedemikian rupa sehingga molekul donor dan reseptor fluoresen sedemikian dekat, maka terjadi fluoresensi. Intensitas fluoresensi tergantung pada jumlah produk PCR.
3. Hidrolisis pelacak. Metode ini menggunakan aktifitas membawa molekul reporter fluoresen dan molekul pemadam yang jika molekul itu dalam keadaan utuh tidak terjadi fluoresensi. Jika pelacak menempel pada hasil PCR dan polimerase DNA pada waktu sintesis DNA mempunyai pelacak yang menempel didepannya, maka aktifitas eksonuklease 5' – 3' menghidrolisis pelacak itu sehingga reporter berfluoresensi.
4. Pelacak sederhana. Pelacak ini membawa molekul fluorokrom dan pemadam. Dalam keadaan biasa molekul ini melipat sedemikian rupa sehingga molekul fluorokrom dan pemadam sedemikian dekat sehingga tidak terjadi fluoresensi. Jika pelacak ini menempel pada DNA target sehingga jarak kedua molekul fluorokrom dan pemadam berjauhan, maka terjadi fluoresensi.

Fragmen DNA yang telah didapatkan melalui reaksi amplikasi PCR digunakan untuk mengkonstruksi vektor rekombinan dengan cara menginsersikannya ke dalam suatu vektor. Penggunaan vektor dalam pembuatan vektor rekombinan disesuaikan dengan tujuan dari penelitian yang akan dilakukan. Beberapa faktor yang mempengaruhi dalam pemilihan vektor rekombinan diantaranya yaitu ukuran vektor, kemampuan untuk bereplikasi, gen penyandi resistensi antibiotik yang dimilikinya, dan situs restriksi yang terdapat pada vektor.¹¹

3. PENGKLONAN

Kata pengklonan mengacu pada produksi sel-sel anak dengan cara pembelahan atau mitosis. Selama proses ini berlangsung, DNA dari sel induk bereplikasi dan satu set informasi genetik yang identik kemudian diberikan ke sel-sel anak. Regenerasi sel yang terus menerus akan menghasilkan populasi sel yang secara genetik merupakan klon yang identik, semua berasal dari satu sel induk.²³

3.1. Teknologi DNA Rekombinan

Teknologi DNA rekombinan telah memungkinkan bagi kita untuk: mengisolasi DNA dari berbagai organisme, menggabungkan DNA yang berasal dari organisme yang berbeda sehingga terbentuk DNA rekombinan, memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel organisme prokariot maupun eukariot hingga DNA rekombinan dapat bereplikasi dan bahkan dapat diekspresikan. Jadi, Teknologi DNA Rekombinan merupakan kumpulan teknik atau metoda yang digunakan untuk mengkombinasikan gen-gen di dalam tabung reaksi.⁴¹ Teknik-teknik tersebut meliputi:

1. Teknik untuk mengisolasi DNA.
2. Teknik untuk memotong DNA.
3. Teknik untuk menggabung atau menyambung DNA.
4. Teknik untuk memasukkan DNA ke dalam sel hidup.

Teknologi DNA rekombinan berdasarkan pada mekanisme yang terdapat pada bakteri. Hasil percobaan Lederberg dan Tatum (1946) menunjukkan bahwa bakteri mempunyai mekanisme seksual. Mekanisme seksual pada bakteri ini menyebabkan terbentuknya kombinasi gen-gen yang berasal dari dua sel yang berbeda. Mekanisme seksual pada bakteri ini merupakan pertukaran DNA atau gen dari satu sel ke sel lainnya. Jadi mekanisme seksual pada bakteri ini tidak bersifat reproduktif.⁴¹

Transfer DNA atau perpindahan DNA ke dalam bakteri dapat melalui tiga cara yaitu konjugasi, transformasi, dan transduksi.⁴¹

1. Konjugasi merupakan perpindahan DNA dari satu sel (sel donor) ke dalam sel bakteri lainnya (sel resipien) melalui kontak fisik antara kedua sel.
2. Transformasi merupakan pengambilan DNA oleh bakteri dari lingkungan di sekelilingnya.
3. Transduksi adalah cara pemindahan DNA dari satu sel ke dalam sel lainnya melalui perantaraan fage.

Perangkat yang digunakan dalam teknologi DNA rekombinan adalah perangkat-perangkat yang ada pada bakteri. Perangkat tersebut antara lain adalah:⁴¹

1. Enzim restriksi digunakan untuk memotong DNA
2. Enzim DNA ligase digunakan untuk menyambung DNA

3. Plasmid digunakan sebagai vektor untuk mengklonkan gen atau mengklonkan fragmen DNA atau mengubah sifat bakteri.
4. Transposon digunakan sebagai alat untuk melakukan mutagenesis dan untuk menyisipkan penanda.
5. Pustaka Genom digunakan untuk menyimpan gen atau fragmen DNA yang telah diklonkan.
6. Enzim transkripsi balik digunakan untuk membuat DNA berdasarkan RNA.
7. Pelacak DNA / RNA digunakan untuk mendeteksi gen atau fragmen DNA yang diinginkan atau untuk mendeteksi klon yang benar.

Berdasarkan mekanisme bakteri, perangkat bakteri, dan beberapa teknik diatas, DNA rekombinan dapat dibuat paling tidak melalui tiga pendekatan:⁴¹

1. Mengekstraksi DNA total suatu organisme, memotong DNA total menjadi fragmen-fragmen, memilih fragmen yang dikendaki, mengklonkan fragmen yang telah terpilih,
2. Mengekstraksi DNA total suatu organisme, memotong DNA total menjadi fragmen-fragmen, mengklonkan semua fragmen DNA pada vektor yang sesuai, menguji setiap klon untuk mendapatkan gen yang diinginkan,
3. Sintesis gen atau fragmen DNA yang diinginkan secara langsung dan mengklonkan gen atau fragmen DNA hasil sintesis.

3.2. Vektor DNA Rekombinan

Pengklonaan gen menggunakan kemampuan alami sel dalam mengisolasi dan menduplikasi gen. Pertama, gen yang diinginkan dimasukkan ke dalam molekul DNA (*carrier*) yang disebut vektor. Kemudian vektor yang telah memiliki sisipan gen ditransformasikan ke sel inang (*host cell*) yang sesuai. Mitosis dari sel inang akan menghasilkan suatu populasi klon dimana tiap-tiap klon mengandung gen yang diinginkan.²³

Fragmen-fragmen DNA yang digunakan untuk molekul rekombinan dihasilkan dari digesti dengan enzim restriksi (*restriction endonuclease*). Enzim-enzim restriksi memotong DNA pada daerah-daerah pengenalan tertentu (*recognition site*). Digesti ini menghasilkan ujung-ujung DNA yang menggantung (*over-hanging*) atau *cohesive single-stranded*, dan dapat saling bergabung satu sama lain pada sekuen yang komplemen. Proses penggabungan ini dapat dilakukan dengan menggunakan enzim DNA ligase.⁸

Ada beberapa tipe vektor kloning dapat digunakan untuk membentuk molekul rekombinan. Vektor plasmid digunakan untuk manipulasi sekuen DNA yang lebih mudah dibandingkan dengan vektor faga. Plasmid merupakan molekul DNA sirkuler yang berukuran kecil dan dapat bereplikasi secara mandiri dalam sel bakteri. Hal ini disebabkan karena plasmid memiliki *origin of replication*. Vektor plasmid juga memiliki gen yang mengkode resistensi terhadap antibiotik (contohnya resistensi terhadap ampisilin), sehingga bakteri yang mengandung plasmid dapat diseleksi.⁸

Vektor plasmid umumnya terdiri dari 2-4 kb sekuen DNA. Agar fragmen DNA sisipan dapat diklon ke dalam suatu plasmid, maka fragmen ini diligasikan pada situs restriksi yang sesuai pada vektor. Kemudian molekul rekombinan yang dihasilkan ditransformasikan ke *E. coli*. Bakteri yang memiliki plasmid kemudian dapat ditumbuhkan dalam jumlah besar dan dilakukan ekstraksi DNA. Molekul plasmid DNA sirkuler dapat dipisahkan dari DNA kromosom bakteri sehingga akan dihasilkan DNA plasmid murni yang dapat digunakan untuk analisa sisipan klon.⁸

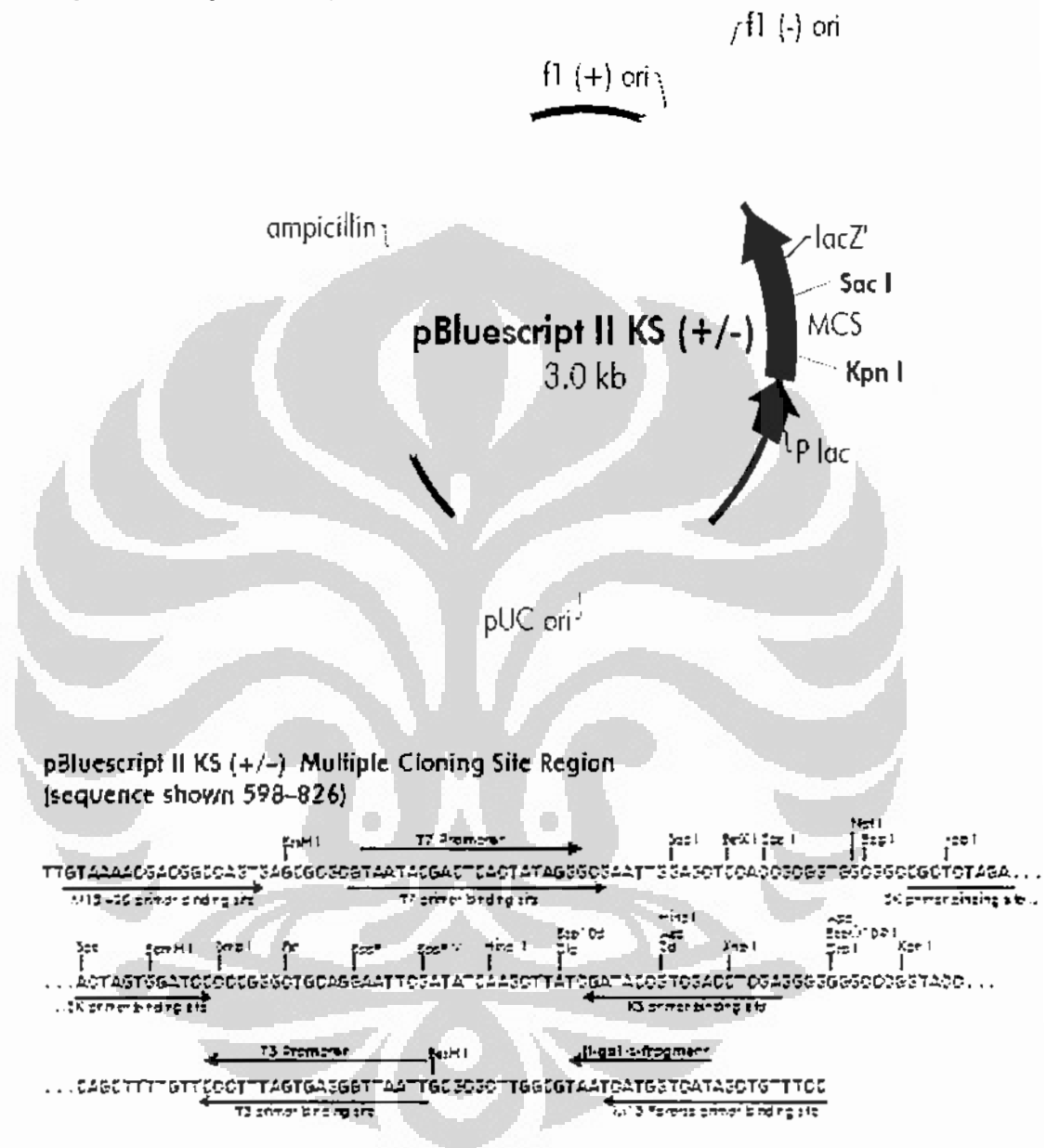
Vektor *cosmid* dapat digunakan untuk sisipan dengan panjang DNA 45 kb. Vektor ini memiliki sekuen bakteriofaga λ yang dapat menghasilkan penempatan klon DNA yang efisien ke dalam partikel faga. *Cosmid* memiliki *origin of replication* dan gen yang mengkode resistensi terhadap antibiotik, sehingga vektor ini dapat bereplikasi sendiri seperti plasmid pada sel-sel bakteri. Untuk fragmen DNA yang berukuran hingga ratusan kilobasa, maka dapat dilakukan klon pada vektor *Yeast Artificial Chromosome* (YAC). Vektor ini dapat bereplikasi sebagai kromosom dalam sel-sel *yeast* dan dapat digunakan dalam studi pemetaan kromosom.⁸

Penggunaan vektor dalam pembuatan vektor rekombinan disesuaikan dengan tujuan dari penelitian yang akan dilakukan. Beberapa faktor yang mempengaruhi dalam pemilihan vektor rekombinan diantaranya yaitu ukuran vektor, kemampuan untuk bereplikasi, gen penyandi resistensi antibiotik yang dimilikinya, dan situs restriksi yang terdapat pada vektor.¹¹ Vektor yang umum digunakan dalam proses konstruksi vektor rekombinan adalah plasmid dan fagamid.⁵

Fagamid adalah vektor yang berasal dari turunan plasmid dan dilengkapi oleh satu atau dua *ori* yang berasal dari faga berfilamen. Fagamid dapat dijadikan sebagai vektor rekombinan jika memiliki beberapa syarat tertentu. Syarat-syarat fagamid yang baik di antaranya adalah bersifat *high copy number*, memiliki situs pengenalan enzim restriksi, dan marka genetik berupa gen resistensi terhadap antibiotik.³⁰ Beberapa contoh fagamid yang digunakan dalam pengklonaan adalah pTZ118R, pBluescript II KS (+/-) dan pBluescript II SK (+/-).³⁴

Fagamid pBluescript KS (-) dapat digunakan dalam konstruksi vektor rekombinan karena vektor tersebut memiliki situs *ori* yang berasal dari faga filamen sehingga mampu menghasilkan jumlah kopian yang tinggi (*high copy number*). Kelebihan lain yang juga dimiliki oleh fagamid pBluescript KS (-) yaitu dilengkapi dengan 21–22 situs pengenalan enzim restriksi yang berada pada daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) serta promotor *LacZ* yang berfungsi dalam proses *blue white screening* (seleksi biru putih) (Gambar 4).^{30,34}

pBluescript II KS (+/-) Phagemids



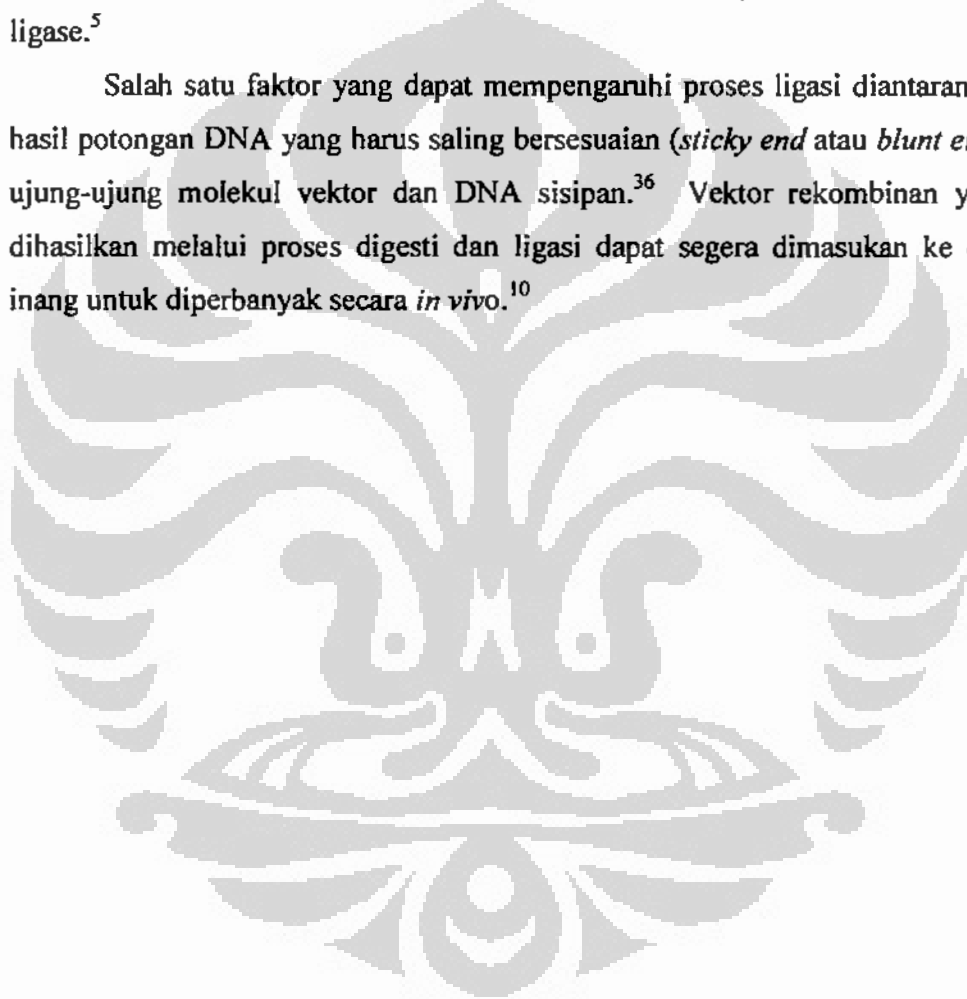
Gambar 4. Plasmid pBluescript II KS (+/-).³⁴

Vektor yang telah dipilih dalam konstruksi vektor rekombinan hanya dapat menerima DNA sisipan jika vektor yang digunakan telah berada dalam bentuk linear. Vektor dapat dibuat dalam bentuk linear melalui proses digesti dengan bantuan enzim

restriksi endonuklease.⁵ Proses digesti tersebut dapat menghasilkan vektor dalam bentuk linear dengan ujung *sticky end* atau *blunt end*.³⁶

Vektor yang telah berbentuk linear menunjukkan bahwa vektor tersebut telah siap menerima DNA sisipan. Pengabungan DNA sisipan dengan vektor dilakukan melalui reaksi ligasi, sehingga didapatkan vektor rekombinan. Proses penyambungan DNA sisipan dengan vektor pengklonan dapat dilakukan dengan bantuan enzim ligase.⁵

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi proses ligasi diantaranya adalah hasil potongan DNA yang harus saling bersesuaian (*sticky end* atau *blunt end*) antara ujung-ujung molekul vektor dan DNA sisipan.³⁶ Vektor rekombinan yang telah dihasilkan melalui proses digesti dan ligasi dapat segera dimasukkan ke dalam sel inang untuk diperbanyak secara *in vivo*.¹⁰



BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

1. BAHAN

1.1. Galur bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* galur T10. *Escherichia coli* galur T10 digunakan dalam proses propagasi plasmid karena sifat efisiensi transformasinya yang tinggi. galur *E.coli* ini ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) agar dan cair. Medium LB agar mengandung ampisilin dengan konsentrasi 50 µg/ml, sedangkan media LB cair mengandung ampisilin dengan konsentrasi 100 µg/ml.

1.2. SEL CEM-GFP

Gen DNA APOBEC3G yang digunakan berasal dari kultur sel CEM-GFP yang merupakan suatu galur sel limfosit T, yang merupakan sel non permissive terhadap infeksi HIV-1/Δvif. Sel ini akan digunakan dalam ekstraksi mRNA APOBEC3G untuk mendapatkan cetakan.

1.3. Plasmid

Vektor plasmid yang digunakan dalam penelitian ini adalah pBluescript II KS(-) (Stratagene, 1999) sebagai vektor kloning.

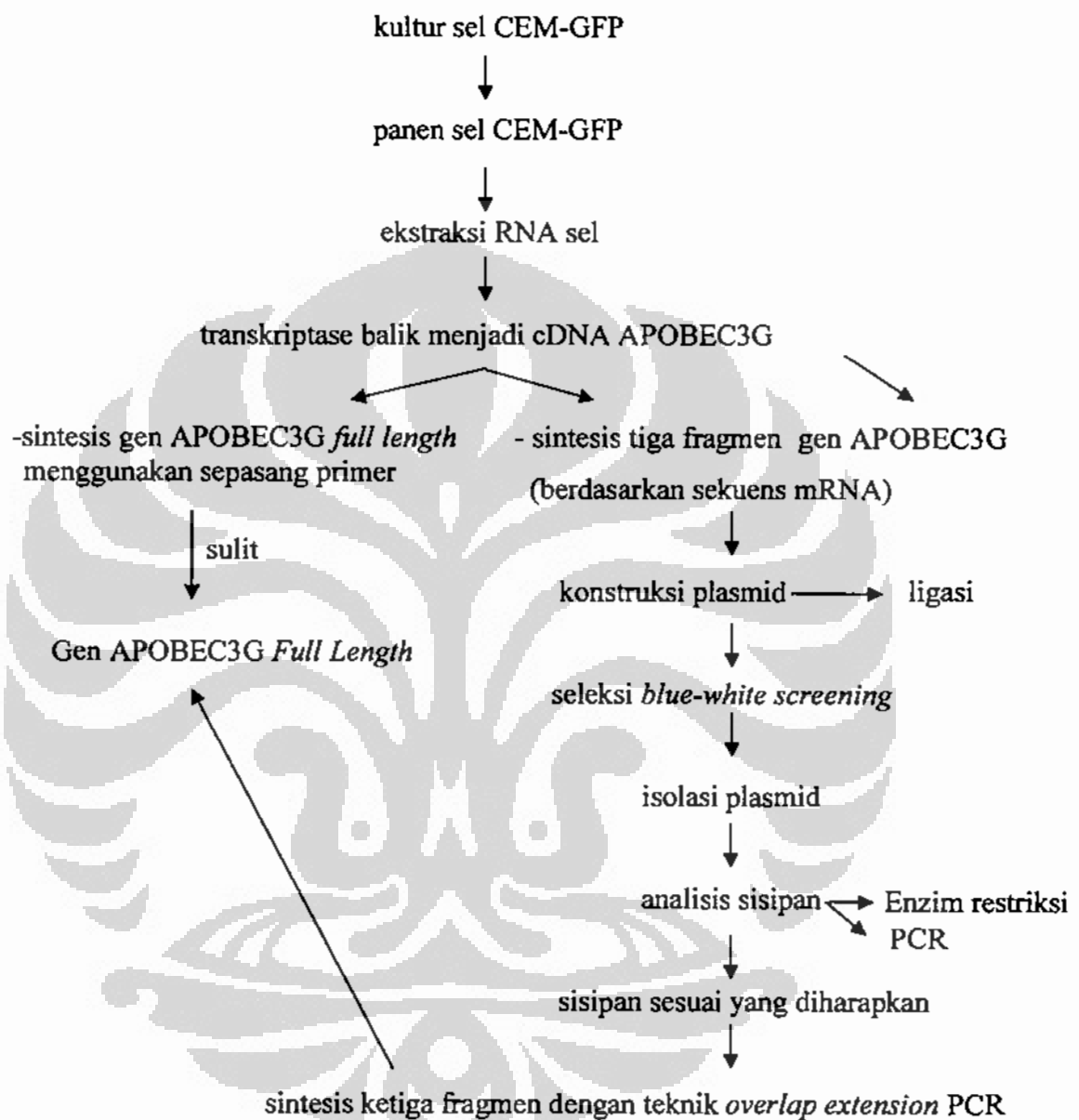
1.4.Primer

- Penentuan primer untuk DNA APOBEC3G *full length*. Pasangan primer yang digunakan merupakan pasangan primer *sense* dan *antisense* yang spesifik terhadap ORF (*Open Reading Frame*) mRNA APOBEC3G.
- Penentuan primer untuk tiga fragmen APOBEC3G. Penentuan sekuen primer dilakukan dengan menggunakan piranti lunak *primer designer* berdasarkan sekuen mRNA yang mengkode APOBEC3G (Accession Number: NM_021822) yang dibagi menjadi tiga daerah dengan susunan nukleotida yang bertumpang tindih (*overlapping*) dan pada bagian ujung segmen DNA yang akan berfungsi sebagai penyambung fragmen-fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G utuh. Sekuen primer yang digunakan adalah:

Nama	Sekuen (5' → 3')
1F	CCTGCGGTACCATGITATGAAGCCTCACTTCAG
684R	GATCTTCATGGTGGCACG
594F	CCGCCTCTACTACTTCTG
1052R	TCCAGGTCCAGCTTCCAA
953F	TTCTATGCAACCAGGCTC
1155R	GGCCCGAATTCGTTTTCCTGATTCTGGAG

2. ALUR PENELITIAN

Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahap penelitian, yaitu



2.1. Kultur Sel CEM-GFP

Sel CEM-GFP diambil dari tabung nitrogen cair, kemudian ditempatkan di atas penangas air dengan suhu 37°C sekitar 2-3 menit sampai setengah cair. Kemudian ditambah media RPMI 2 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm 10 menit dengan suhu 4°C. setelah itu dibuang supernatan sedangkan pelet sel diberi media RPMI ± 5 ml, disuspensi, dan dimasukkan ke dalam *flask culture* untuk diinkubasi ke dalam inkubator CO₂. Diamati setiap hari pertumbuhan sel tersebut dan media lama diganti yang baru, jika warna tampak keruh dari media awal. Media yang dipakai untuk pertumbuhan kultur sel CEM-GFP ini adalah medium RPMI 1640 yang ditambahkan dengan 10% FBS, 1% antibiotik penisilin streptomisin, dan 2mM glutamine (Cerboni *et al.*, 2007). Selama pengamatan tersebut juga dilakukan penghitungan jumlah sel tersebut. Panen sel dilakukan jika jumlah sel telah mencapai maksimal 3×10^6 sel/ml. Setelah didapat panen sel, kemudian dilakukan ekstraksi RNA sel.

2.2. Ekstraksi RNA sel

Ekstraksi RNA sel dilakukan dengan menggunakan RNeasy MiniKit (Qiagen, 2006). Panen sel dilakukan dengan cara: suspensi sel disentrifugasi 300 x g (5 menit). Lalu dibuang supernatan lewat aspirasi. Ditambahkan buffer RLT 350 µl lalu lisat tersebut dipindahkan ke kolom QIA shredder yang ditempatkan dalam tabung koleksi 2ml. Setelah itu disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan maksimum. Lalu ditambah etanol 70% 350 µl dengan tujuan agar lisat dapat homogen, dicampur dengan cara dipipet. Kemudian dipindahkan ke kolom mini RN_{easy} yang ditempatkan ke dalam tabung koleksi 2ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Dibuang airnya lalu ditambahkan 700 µl buffer RW1 ke kolom RN_{easy} dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya dipindahkan kolom RN_{easy} ke tabung koleksi 2 ml yang baru. Lalu ditambahkan 500 µl buffer RPE ke kolom RN_{easy} dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Dibuang airnya lalu

ditambahkan kembali 500 μ l buffer RPE ke kolom RN_{easy}, disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Kemudian kolom RN_{easy} ditempatkan ke dalam tabung koleksi yang baru dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Untuk elusi RNA, dipindahkan kolom RN_{easy} ke tabung koleksi 1,5 ml yang baru, lalu diambil 50 μ l RNase-free water, dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. RNA yang diperoleh disimpan di -80°C. Untuk menguji adanya RNA yang telah diekstraksi, dilakukan elektroforesis di gel agarosa 1%.

2.3. Sintesis cDNA fragmen-fragmen gen APOBEC3G

Sintesis cDNA fragmen-fragmen gen APOBEC3G dilakukan dengan menggunakan RNA hasil ekstraksi dari sel CEM_GFP. Campuran reaksi yang digunakan adalah 10 x Buffer RT, 5 mM campuran dNTP, primer *reverse*, *Rnase OUT*, *Distilled Water*, cetakan (RNA), Enzim RT *Omniscript* (Qiagen). Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, dan 95°C selama 5 menit untuk inaktivasi enzim. Proses sintesis ini dilakukan pada *Gradient cyclers*. cDNA yang dihasilkan kemudian dijadikan cetakan untuk proses PCR.

2.4. Amplifikasi fragmen-fragmen gen APOBEC3G

Amplifikasi fragmen-fragmen gen APOBEC3G dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan dengan pasangan primer yang telah disebutkan di atas, yaitu: Campuran reaksi yang digunakan adalah 10 x Buffer *Pfx*, Enhancer *Pfx*, 10 mM campuran dNTP, campuran primer, cetakan (cDNA), enzim *Pfx* (Invitrogen) dan 50 mM MgSO₄. Siklus suhu yang digunakan adalah *Initial Denaturation* pada 95°C selama 4 menit, *Denaturation* pada suhu 94°C selama 1 menit, *Annealing* pada gradien suhu selama 30 detik, *Extension* pada suhu 72°C selama 1 menit dan *Final Extension* pada suhu 72°C selama 10 menit. Proses amplifikasi dilakukan pada *Gradient cyclers*.

Hasil amplifikasi (DNA protease sintetik) kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1,5%. DNA protease sintetik selanjutnya dipurifikasi dengan metode PCR Purification kit dengan QiaQuick (Qiagen).

2.5. Konstruksi plasmid rekombinan

2.5.1. Isolasi plasmid pBluescript

Plasmid pbluescript diisolasi dari bakteri *E. coli* galur T10 menggunakan metode Miniprep Plasmid purification (Qiagen).

Bakteri *E. coli* pembawa plasmid ditumbuhkan dalam medium LB cair yang telah mengandung ampisilin 100 µg/ml selama 16 jam. Pada masa ini bakteri akan mencapai puncak pertumbuhan fase *log*. Kemudian bakteri pada tabung *microtube* dipanen dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang. Larutan P1 (25 mM Tris, 10 mM EDTA dan 100 ng/ml RNase) ditambahkan ke dalam pelet, kemudian dilakukan resuspensi pelet dengan larutan ini. Setelah itu larutan P2 (200 mM NaOH dan 1% SDS) ditambahkan, dan dilakukan pembolak-balikan tabung *micotube* sebanyak 7 kali. Larutan N3 (3 M Potasium Asetat) ditambahkan kemudian, dan dilakukan juga proses pembolak-balikan tabung sebanyak 8 kali. Semua proses pembolak-balikan tabung ini tidak boleh dari 5 menit untuk menghindari kerusakan DNA. Setelah itu campuran larutan ini dilakukan sentrifugasi larutan pada suhu dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit.

Supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan ditempatkan pada kolom miniprep plasmid purification, sedangkan pelet dibuang. Lalu supernatan ditambahkan larutan PB dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Air yang ada di tabung koleksi dibuang, lalu ditambahkan larutan PE yang telah bercampur dengan etanol ke dalam kolom miniprep, dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Air yang ada di tabung koleksi dibuang, lalu dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Hal ini dilakukan untuk membuang sisa etanol yang ada pada DNA plasmid. Tabung koleksi dibuang dan kolom miniprep dipindahkan

bersama microtube yang baru. Setelah itu ditambahkan 1/3 *Elution Buffer*. Dibiarkan selama 1 menit pada suhu ruang. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 1 menit. Hasil dari isolasi plasmid ini kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 0,8%.

2.5.2. Purifikasi Hasil Amplifikasi Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G

Purifikasi fragmen-fragmen DNA APOBEC3G sintetik dilakukan dengan PCR purification kit dengan QiaQuick (Qiagen). Hasil purifikasi ini dianalisis dengan elektroforesis gel poliakrilamid 10%.

2.5.3. Pemotongan Plasmid Dengan Enzim Restriksi

Plasmid pBluescript dipotong dengan enzim restriksi endonuklease *Sma* I (Research Biolabs). Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G sintetik kemudian dinamakan sebagai sisipan fragmen APOBEC3G, akan disisipkan ke dalam *multiple cloning site* dari pBluescript, pada daerah pemotongan *Sma*I. Reaksi pemotongan dilakukan dengan campuran reaksi 10 x BSA, 10 x *NEBuffer* 2, enzim *Sma*I, plasmid pBluescript dan *distilled water*. Campuran reaksi ini kemudian diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C. Plasmid yang telah dipotong dipurifikasi dengan *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

2.5.4. Ligasi Sisipan dan Plasmid

Prosedur ligasi dilakukan sesuai dengan prosedur Sambrook, *et al.* (2001). Perbandingan sisipan : plasmid adalah 3 : 1. Reaksi ligasi dilakukan dengan campuran 10 x *T4 DNA ligase buffer*, enzim *T4 DNA Ligase* (Research Biolabs) dan *distilled water*. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 16°C selama 16 jam.

2.6. Transformasi hasil ligasi

Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* T10 untuk memperbanyak plasmid rekombinan. Prosedur transformasi dilakukan sesuai dengan petunjuk dari Sambrook, *et al.* (1989). Transformasi dilakukan dengan metode *Heat Shock* CaCl_2 . Pada prosedur ini akan dilakukan penambahan MgCl_2 dan CaCl_2 serta perlakuan kejutan panas pada suhu 42°C terhadap sel *E. coli* sehingga akan bersifat kompeten dan plasmid rekombinan dapat masuk ke dalam sel.

Pembuatan sel kompeten, sel-sel *E. coli* terlebih dahulu ditumbuhkan selama 4 jam pada medium cair Luria-Bertani (LB). Setelah 4 jam, bakteri kemudian diinkubasi dengan suhu dingin selama 1 jam. Kemudian sel dipanen dengan proses sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit dengan kondisi dingin (4°C). Larutan 0,1 M MgCl_2 sebanyak $\frac{1}{2}$ volume total medium LB sebelumnya, ditambahkan dan dilakukan resuspensi sel. Dilakukan kembali sentrifugasi 12.000 rpm selama 2 menit pada suhu dingin dan supernatan yang terbentuk dibuang. Larutan 0,1 M CaCl_2 sebanyak $\frac{1}{4}$ volume total medium LB sebelumnya, ditambahkan pada pelet dan dilakukan resuspensi sel. Sel kemudian dibiarkan dalam keadaan dingin selama 30 menit. Setelah itu dilakukan kembali sentrifugasi 12.000 rpm selama 2 menit. Langkah terakhir adalah penambahan larutan 0,1 M CaCl_2 kembali dengan volume sesuai dengan kebutuhan dan dilakukan resuspensi sel.

Prosedur transformasi plasmid kemudian dilanjutkan dengan memasukkan plasmid rekombinan ke dalam sel kompeten. Hasil ligasi dicampurkan dengan sel kompeten. Perlakuan ini dilakukan pada suhu dingin. Transforman kemudian diinkubasi pada suhu dingin selama 60 menit. Setelah itu dilakukan kejutan panas (*heat shock*) dengan suhu 42°C selama 90 detik terhadap sel transforman. Proses kejutan panas ini dilakukan selama 90 detik. Setelah itu sel transforman dengan cepat dimasukkan kembali ke dalam es dan didiamkan selama 60 detik. Sel transforman kemudian dikeluarkan dari es dan dilakukan penambahan medium SOC sebanyak 2 x volume larutan campuran. Kemudian sel diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Inkubasi dilakukan pada *Shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Setelah itu sel ditanam pada medium agar LB yang mengandung ampisilin

50 µg/ml dan diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C. Setelah 16 jam terlihat bahwa sel *E. coli* yang membawa plasmid rekombinan (klon) tumbuh pada medium ini. Untuk analisis klon, maka koloni *E. coli* yang tumbuh dipilih secara acak untuk kemudian dilakukan prosedur isolasi plasmid. Hasil dari isolasi ini dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 0,8%. Dari analisis ini diketahui adanya plasmid rekombinan dengan melihat perbedaan pola migrasi antara plasmid rekombinan dengan plasmid pKS tanpa sisipan.

2.7. Identifikasi Klon

Identifikasi klon yang memiliki plasmid rekombinan dilakukan dengan enzim restriksi dan PCR. Pada proses identifikasi klon dengan enzim restriksi, dimana enzim restriksi *EcoRI* yang memotong plasmid dan tidak memotong fragmen gen APOBEC3G. Jadi apabila hasil pemotongan plasmid rekombinan memperlihatkan adanya pita DNA yang letaknya mengalami shifting dengan plasmid *wild type* (plasmid tanpa sisipan gen APOBEC3G), maka plasmid tersebut kemungkinan memiliki sisipan fragmen gen APOBEC3G. Selain itu, dilakukan pula identifikasi melalui PCR dengan menggunakan primer sisipan untuk mengetahui keberadaan DNA sisipan.

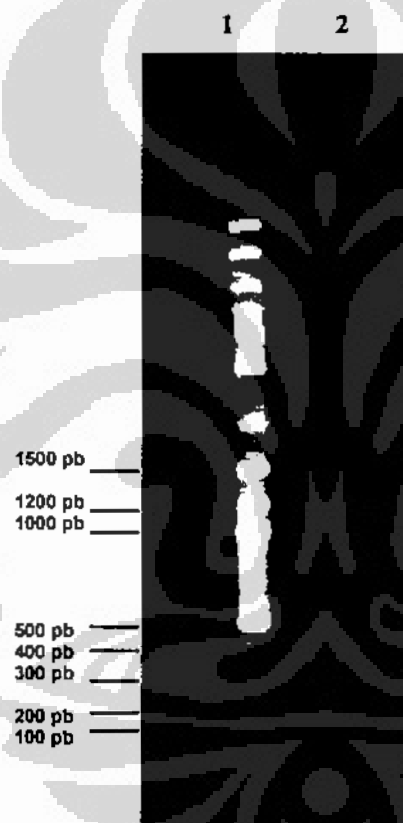
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. HASIL

1. 1. Analisis Hasil Ekstraksi RNA

Hasil analisis RNA pada gel agarose 1% memperlihatkan bahwa RNA sel CEM-GFP dapat terlihat cukup jelas.

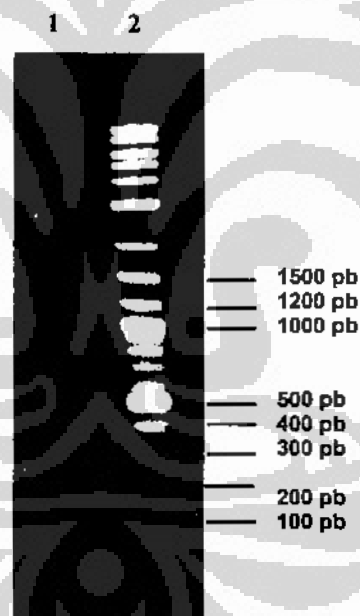


Gambar 5. Analisis hasil ekstraksi RNA melalui elektroforesis dengan gel agarosa 1%. Lajur 1: M: Marka 2 log-ladder; Lajur 2. RNA sel di agarose 0,8%

1.2. Sintesis DNA APOBEC3G

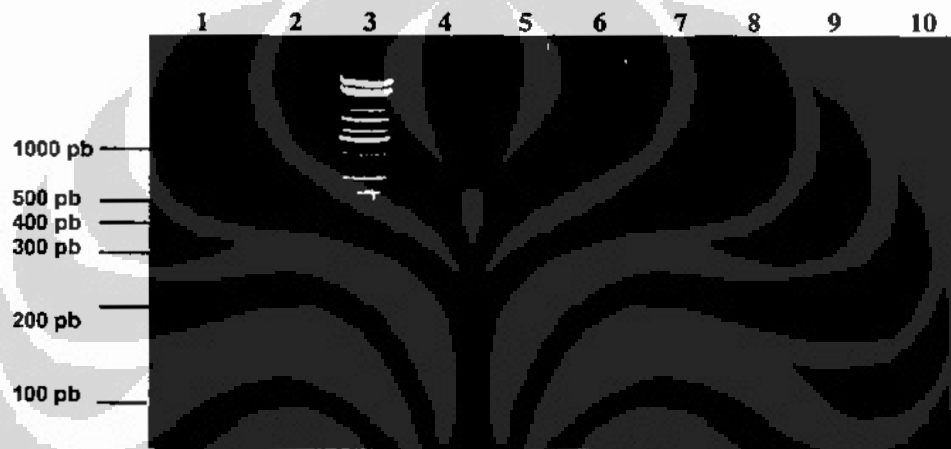
1.2.1. Sintesis DNA APOBEC3G *full length*

DNA APOBEC3G *full length* disintesis melalui reaksi PCR 2 tahap. PCR tahap I adalah pembuatan cDNA, dimana cDNA APOBEC3G tersebut diperoleh melalui reaksi *reverse transcriptase* PCR dengan menggunakan enzim omniscrypt. PCR tahap II adalah sintesis dsDNA APOBEC3G dengan menggunakan enzim *Hotstar Taq DNA Polymerase*. Gambar 6 memperlihatkan hasil reaksi amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi suhu annealing 52°C dan konsentrasi akhir primer 0,5 µM. Ukuran pita yang berukuran 1150 pb tidak diperoleh dalam kondisi reaksi tersebut.



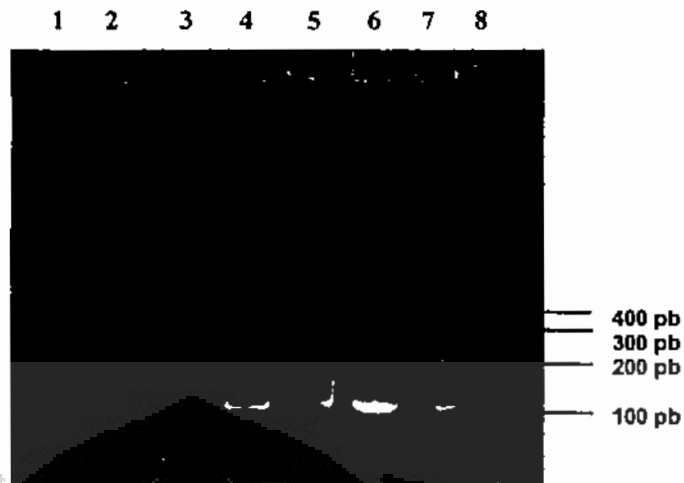
Gambar 6. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* (konsentrasi akhir primer 0,5µM; suhu annealing 52°C). Lajur 1: DNA APOBEC3G *full length*; lajur 2: M= Marka 2 log ladder.

Gambar 7 memperlihatkan hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 0,5 μ M. Hasil yang diperoleh menunjukkan tidak adanya pita DNA sesuai yang diharapkan yaitu sebesar 1150 pb pada setiap kondisi suhu annealing yang digunakan. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diasumsikan bahwa konsentrasi akhir primer 0,5 μ M belum optimal. Oleh karena itu, dilakukan optimasi PCR dengan kondisi konsentrasi akhir primer yang lebih besar



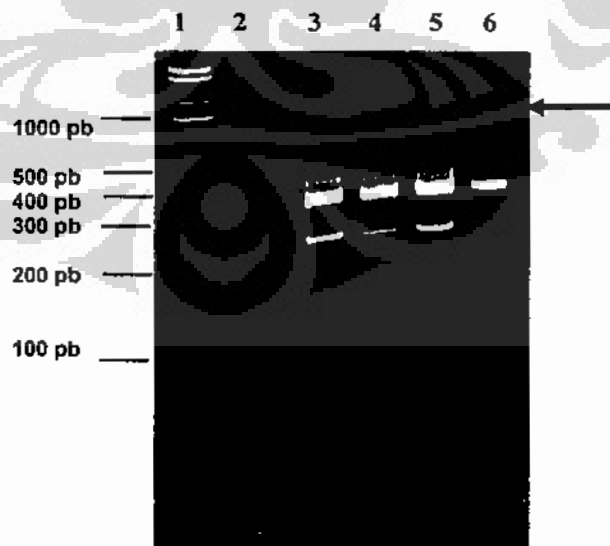
Gambar 7. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 0,5 μ M. Lajur 1: suhu 53,1°C; lajur 2: 54°C; lajur 3: Marka 100 bp; lajur 4: 55,4°C; lajur 5: 57,2°C; lajur 6: 59,2°C; lajur 7: 60,9°C; lajur 8: 62,2°C; lajur 9: 64°C; lajur 10: kontrol negatif

Hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 5 μ M diperlihatkan pada gambar 8. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya pita DNA non spesifik yang terletak di bawah marka, tetapi tidak diperoleh pita DNA sesuai yang diharapkan yaitu sebesar 1150 pb pada setiap kondisi suhu annealing yang digunakan. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diasumsikan kembali bahwa konsentrasi akhir primer 5 μ M masih belum optimal, sehingga perlu dilakukan optimasi PCR dengan kondisi konsentrasi akhir primer yang lebih besar.



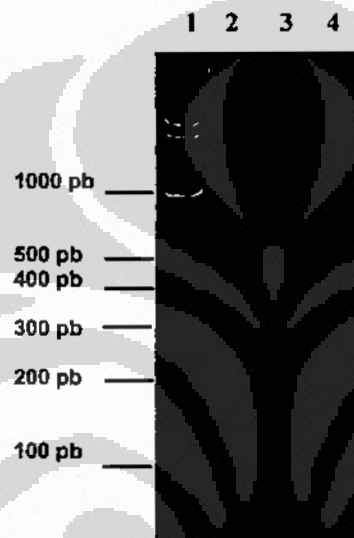
Gambar 8. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 5 μ M. Lajur 1:kontrol negatif. Lajur2: 52°C; lajur 3: 54°C; lajur 4: 57,2°C; lajur 5: 59,2°C; lajur 6: 62,2°C; lajur 7: 64°C; lajur 8: Marka 100 pb

Hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 25 μ M ditunjukkan pada gambar 9. Hasil yang diperoleh menunjukkan pada lajur 2,3, dan 4, diduga terdapat pita DNA sesuai yang diharapkan yaitu sebesar 1150 pb, tetapi disertai juga dengan pita DNA non-spesifik. Oleh karena itu dilakukan isolasi gel untuk mendapatkan DNA yang spesifik..



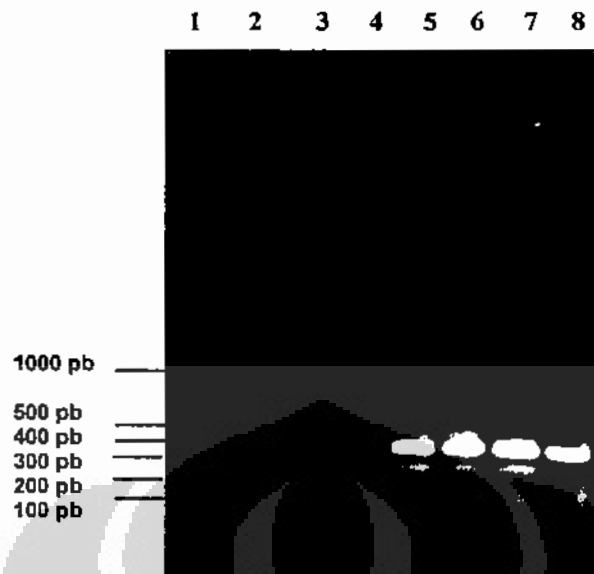
Gambar 9. Analisis hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer 25 μ M. lajur 1: Marka 100 bp Lajur 2:kontrol negatif; Lajur3: 52°C; lajur 4: 54°C; lajur 5: 57,2°C; lajur 6: 59,2°C.

Gambar 10 menunjukkan hasil isolasi pita DNA pada gel agarosa 1150 pb. Hasil yang diperoleh menunjukkan tidak adanya pita DNA hasil isolasi gel. Hal tersebut diduga disebabkan pita DNA yang diisolasi sangat tipis, sehingga saat dilakukan purifikasi, pita DNA yang diperoleh menjadi tidak terlihat. Selanjutnya, hasil isolasi gel tersebut dijadikan cetakan untuk memperoleh DNA APOBEC3G yang berukuran 1150 pb.



Gambar 10. Analisis hasil purifikasi isolasi gel DNA APOBEC3G (1155 pb). Lajur 1: 52°C; lajur 2: 54°C; lajur 3: 57,2°C

Hasil amplifikasi DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52-64°C dan konsentrasi akhir primer dalam campuran reaksi 25 μ M dengan menggunakan hasil purifikasi isolasi gel sebagai cetakan DNA, ditunjukkan pada gambar 11. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya pita DNA Namun tidak spesifik untuk DNA APOBEC3G berukuran 1150 pb. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diasumsikan bahwa cetakan DNA yang digunakan tidak mengandung DNA APOBEC3G.

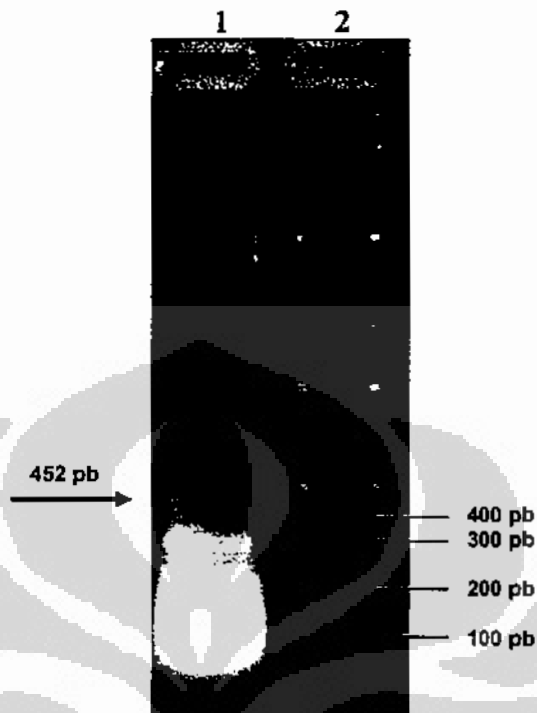


Gambar 11. Analisis hasil sintesis DNA APOBEC3G *full length* dengan kondisi berbagai suhu annealing dengan gradien 52–64°C dan konsentrasi akhir primer 25 μ M. lajur 1: kontrol negatif; Lajur 2:Marka 2 log ladder; Lajur 3: 52°C; lajur 4: 54°C; lajur 5: 57,2°C; lajur 6: 59,2°C; lajur 7: 62,2°C; lajur 8: 64°C;

DNA APOBEC3G *full length* sulit diperoleh sehingga dibuat strategi untuk memudahkan sintesis, yaitu: membagi sekuens mRNA APOBEC3G menjadi tiga fragmen yang saling *overlap*. Tiga fragmen DNA APOBEC3G disintesis dari sekuens mRNA APOBEC3G menggunakan pasangan primer 1F + 684R, 594F + 1052R, dan 953F + 1155R. Ukuran yang diharapkan dari masing-masing fragmen adalah 452 pb, 458 pb, dan 433 pb.

1.2.2. Sintesis tiga fragmen DNA APOBEC3G (berdasarkan sekuens mRNA)

Fragmen-fragmen APOBEC3G yang dibagi menjadi fragmen I, II, dan III, berhasil diperoleh dengan menggunakan cetakan cDNA APOBEC3G (yang berasal dari RNA CEM-GFP *cell line*). Hasil analisis pada gel agarosa 1% menunjukkan bahwa pita DNA fragmen APOBEC3G I (gambar 12), II, dan III (gambar 13), yang masing-masing berukuran 452 pb, 458 pb, dan 433 pb dapat dihasilkan walau disertai dengan pita DNA non-spesifik. Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang didapat juga disertai dengan pita DNA non spesifik, maka dilakukan isolasi gel untuk mendapatkan fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang spesifik.

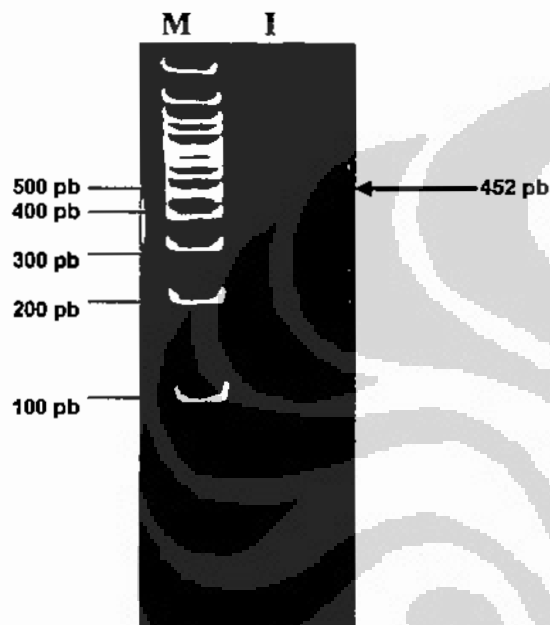


Gambar 12. Analisis hasil: fragmen I DNA APOBEC3G; Lajur 1: fragmen I; Lajur 2: M= Marka 2 Log ladder

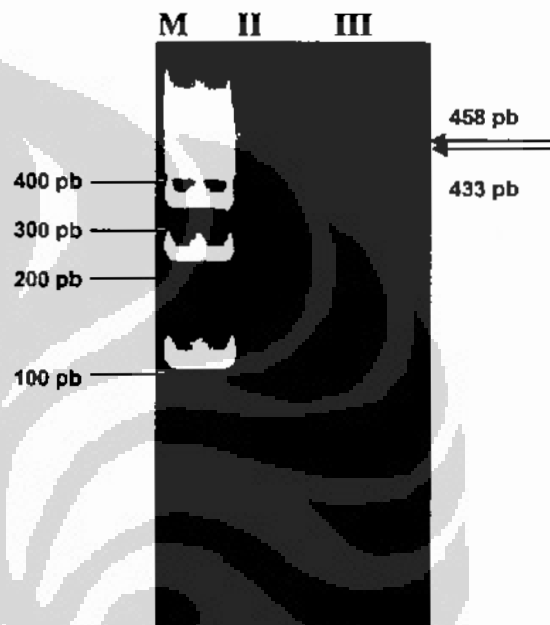


Gambar 13. Analisis hasil fragmen II dan fragmen III DNA APOBEC3G; lajur 1-3, 5-6: fragmen II; lajur 7-10: fragmen III; lajur 4: Marka 2 log ladder

Selanjutnya fragmen-fragmen tersebut dipurifikasi menggunakan PCR purification kit dengan Qieac II(Qiagen). Pada gambar 14 dan 15, dari hasil purifikasi terlihat pita DNA spesifik APOBEC3G dengan ukuran amplicon sesuai dengan yang diharapkan, kecuali pada fragmen III APOBEC3G, masih terdapat pita non-spesifik.



Gambar 14. Analisis hasil purifikasi fragmen I DNA APOBEC3G dengan PCR purification kit (Qiagen) (M: Marka 2 log ladder)



Gambar 15. Analisis hasil purifikasi fragmen II dan III DNA APOBEC3G dengan PCR purification kit (Qiagen) (M: Marka 2 log ladder)

1.3 Konstruksi plasmid rekombinan

Fragmen DNA APOBEC3G I, II, dan III disisipkan ke dalam dengan vektor pBluescript KS (-) yang dipotong dengan enzim restriksi *Sma*I. Konsentrasi fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang diperoleh, diukur dengan menggunakan spektrofotometer (OD fragmen I; 20 ng/ μ l, fragmen II; 60 ng/ μ l, fragmen III; 40 ng/ μ l) . Hal ini dilakukan agar proses ligasi dapat menghasilkan plasmid rekombinan yang diharapkan.

1.4 Transformasi hasil ligasi

Transformasi dilakukan pada sel hospes *E. coli* Top 10 yang telah dibuat kompeten dengan larutan CaCl_2 dingin dengan metode *heat shock* pada suhu 38°C . Pada proses transformasi, sebagai kontrol transformasi digunakan *E. coli* yang ditransformasi dengan vektor pBluescript KS (-) tanpa sisipan. Kontrol negatif untuk melihat kontaminasi selama proses transformasi dan untuk melihat efektifitas kerja antibiotik digunakan *E. coli* kompeten yang tidak ditransformasi dengan plasmid. Sedangkan untuk melihat kompetensi sel *E. coli* Top 10, digunakan kontrol positif dimana *E. coli* ditransformasi dengan plasmid yang sudah diketahui memiliki kemampuan untuk mentransformasi sel *E. coli* Top 10. Setelah proses transformasi selama 16 jam diperoleh: 4 koloni putih *E. coli* transforman yang mengandung plasmid rekombinan pKS-fragmen I DNA APOBEC3G; 5 koloni putih *E. coli* transforman yang mengandung plasmid rekombinan pSK-fragmen II DNA APOBEC3G; dan 5 koloni putih *E. coli* transforman yang mengandung plasmid rekombinan pKS-fragmen III DNA APOBEC3G. Koloni-koloni putih tersebut selanjutnya dibiakkan pada media LB cair mengandung antibiotik, untuk diisolasi dan dipurifikasi.

1.5 Hasil Isolasi Plasmid

Hasil Isolasi plasmid menunjukkan fragmen I dan fragmen II DNA APOBEC3G tidak memperlihatkan adanya *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*. Hal ini dapat dilihat pada gambar 18 dimana pada lajur 1-7 adalah klon untuk fragmen I DNA APOBEC3G menunjukkan tidak ada *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*; lajur 8-9, 11-18 adalah klon untuk fragmen II DNA APOBEC3G; menunjukkan tidak ada *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*; lajur 10 adalah plasmid *wild type*; Sedangkan untuk fragmen III DNA APOBEC3G, lajur 19-20 memperlihatkan *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*. Pada gambar 19, lajur 1-2 merupakan

klon untuk fragmen III DNA APOBEC3G menunjukkan adanya *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*



Gambar 16. Analisis hasil isolasi plasmid: lajur 1-7: klon untuk fragmen I DNA APOBEC3G; : lajur 8-9, 11-18: klon untuk fragmen II DNA APOBEC3G; lajur 10: plasmid *wild type*; lajur 19-20: klon untuk fragmen III DNA APOBEC3G



Gambar 17. Analisis hasil isolasi plasmid: lajur 1-2: klon untuk fragmen III DNA APOBEC3G; lajur 12: plasmid *wild type*.

1.5.1. Identifikasi klon dengan PCR

Konfirmasi bahwa plasmid mengandung gen APOBEC3G, yaitu dengan melakukan proses PCR dengan primer *insert* (fragmen APOBEC3G). Hasil yang diperoleh melalui elektroforesis di agarosa 1%, yaitu koloni-koloni putih yang tumbuh, yang diharapkan mengandung Fragmen I (lajur 1-4) dan II (lajur 6-8), tidak ada. Seharusnya pada gel agarosa tersebut, terdapat ukuran fragmen I dan II yang masing-masing besarnya 452 pb dan 458 pb. Sedangkan untuk koloni-koloni putih yang mengandung fragmen III, dengan lajur 9-13, hanya lajur 11-13, terdapat pita fragmen III DNA APOBEC3G yang berukuran 433 pb(-), seperti yang tampak pada gambar 20. Selanjutnya fragmen III DNA APOBEC3G dilakukan sekuensing untuk menguji kebenaran klon. Jadi klon yang diambil untuk sekuensing adalah lajur 12 (koloni plasmid no.10).



Gambar 18. Analisis hasil identifikasi klon yang mengandung sisipan DNA APOBEC3G dengan PCR. lajur 1-4: klon yang diduga mengandung fragmen I DNA APOBEC3G; lajur 6-8: klon yang diduga mengandung fragmen II DNA APOBEC3G; lajur 9-13: klon yang diduga mengandung fragmen III DNA APOBEC3G; Lajur 5: Marka 2 Log Ladder.

1.6. Isolasi plasmid ulang Fragmen III DNA APOBEC3G

Hasil sekuensing fragmen III DNA APOBEC3G memperlihatkan bahwa hasil sekuensing tidak dapat terbaca. Hal ini dapat terjadi karena kemungkinan plasmid tersebut terkontaminasi DNA lain, dan diduga memiliki lebih dari 1 klon. Oleh karena itu dilakukan transformasi kembali untuk plasmid yang mengandung fragmen III DNA APOBEC3G, untuk melihat ada atau tidaknya kontaminasi. Setelah ditransformasi kembali, hasil isolasi plasmid ditunjukkan dalam gambar 24, dimana lajur 1-10 adalah koloni plasmid no. 10, lajur 12,13,15-18 dan lajur 20 adalah koloni plasmid no.11 memperlihatkan ada *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*. Pada lajur 14, lajur 19 (koloni plasmid no. 11) menunjukkan tidak ada *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*.



Gambar 19. Analisis hasil isolasi plasmid ulang fragmen III DNA APOBEC3G: lajur 1-10: koloni plasmid no. 10; lajur 12-20: koloni plasmid no.11; lajur 11: plasmid *wild type*



Gambar 20. Analisis hasil isolasi plasmid ulang fragmen III DNA APOBEC3G: lajur 1-7: koloni plasmid no. 11; lajur 8-17: koloni plasmid no. 12; lajur 18: plasmid *wild type*

1.6.1. Identifikasi sisipan dengan enzim restriksi

Koloni no 10 dan 11 yang memiliki *shifting*, selanjutnya dianalisis dengan restriksi enzimatis untuk identifikasi adanya sisipan di dalam plasmid, seperti yang terlihat pada gambar 26. dapat dilihat bahwa pada plasmid dengan plasmid koloni no. 10 yang ditransformasi ulang yang kemudian diambil 10 klon, identifikasi sisipan dengan enzim restriksi EcoRI menunjukkan bahwa pada lajur 1-10 terlihat plasmid dan sisipan yang diduga merupakan fragmen III DNA APOBEC3G, Walau terlihat adanya plasmid dan sisipan DNA, tetapi pola cetak pita DNA kelihatan berbeda. Terdapat 2 macam pola cetak pita DNA; lajur 1-4, 6, 8-10 memiliki pola cetak pita DNA yang sama sedangkan lajur 5 dan lajur 7 mempunyai pola cetak pita DNA yang sama. Pada Gambar 20 merupakan lanjutan hasil identifikasi sisipan dengan enzim restriksi EcoRI, dimana lajur 1-6, 7-9 adalah koloni plasmid no. 11 dan bagian klon-klon yang terletak pada jalur 13-15 (gambar 19), lajur 2-5, lajur 8, lajur 9 (gambar 27) menunjukkan bahwa setelah dipotong dengan Enzim EcoRI, plasmid rekombinan mengalami linierisasi, dan memperlihatkan adanya *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type* yang dipotong dengan EcoRI.



Gambar 21. Analisis hasil identifikasi plasmid rekombinan dengan enzim restriksi. Lajur 1-10: koloni plasmid no. 10; lajur 13-15: koloni plasmid no. 11; Lajur 11: plasmid *wild type* yang dipotong dengan EcoRI; Lajur 12: Marka 2 log Ladder

1.7. Isolasi Plasmid ulang untuk fragmen II

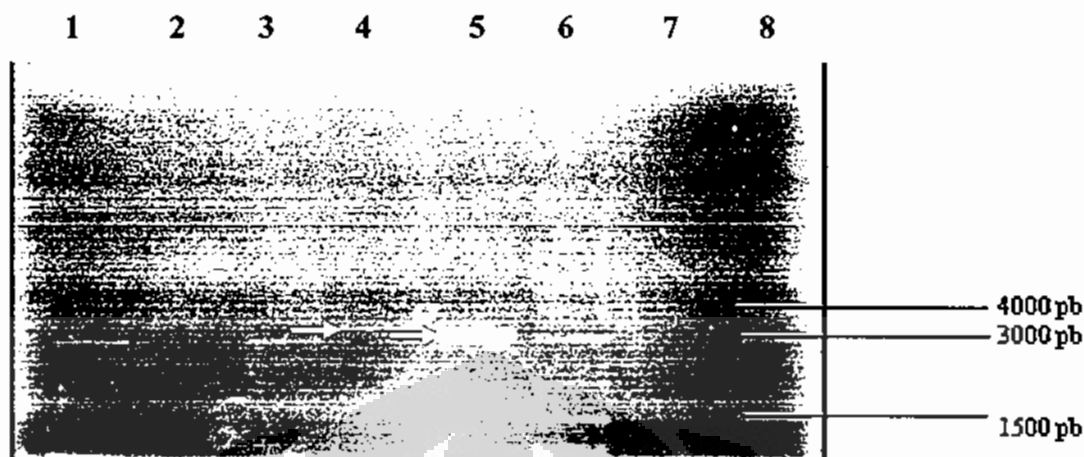
Pada fragmen II DNA APOBEC3G, agar dapat terklon ke dalam vektor kloning pKS, maka dilakukan ligasi dan transformasi kembali. Hasil transformasi dapat dilihat pada gambar 21. dimana hasil isolasi plasmid menunjukkan bahwa pada lajur 4 yaitu koloni plasmid no. 2.12, lajur 8 yaitu koloni plasmid no. 2.16, lajur 13 yaitu koloni plasmid no. 2.20, dan lajur 15 yaitu koloni plasmid no. 2.28, memperlihatkan adanya *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*.



Gambar 24. Analisis hasil isolasi plasmid untuk fragmen II DNA APOBEC3G: lajur 1-10, 12-18: koloni plasmid fragmen II ; lajur 11: plasmid *wild type*

1.7.1. Identifikasi sisipan dengan enzim restriksi

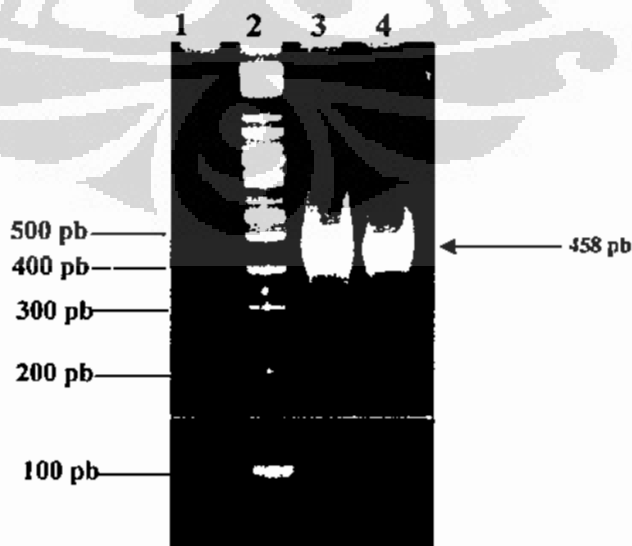
Lajur 4, 8, 13 dan 15 yang memiliki *shifting*, selanjutnya dianalisis dengan restriksi enzimatik untuk identifikasi adanya sisipan di dalam plasmid, seperti yang terlihat pada gambar 22. Hasil elektroforesis menunjukkan pada lajur 1-3 mengalami linierisasi setelah dipotong dengan Enzim EcoRI, tetapi tidak terdapat *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type* yang dipotong dengan Enzim EcoRI. Lajur 4 (koloni plasmid no. 2.28) menunjukkan linierisasi setelah dipotong dengan Enzim EcoRI dan adanya *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type type* yang dipotong dengan Enzim EcoRI.



Gambar 25. Analisis hasil identifikasi plasmid rekombinan dengan enzim EcoRI. Lajur 1: koloni plasmid no. 12; Lajur 2: koloni plasmid no. 16; Lajur 3: koloni plasmid no. 23; Lajur 4: koloni plasmid no. 28; lajur 5: plasmid *wild type* yang dipotong dengan Enzim EcoRI; lajur 6: Marka 2-log ladder

1.7.2. Identifikasi klon fragmen II DNA APOBEC3G dengan PCR

Konfirmasi bahwa plasmid mengandung gen APOBEC3G, yaitu dengan melakukan proses PCR dengan primer *insert* fragmen II APOBEC3G. Hasil yang diperoleh melalui elektroforesis di gel poliakrilamid 8%, yaitu no. koloni 28 terdapat pita fragmen III DNA APOBEC3G yang berukuran 458 pb, seperti yang tampak pada gambar di bawah ini.



Gambar 26. Analisis hasil identifikasi klon dengan PCR. Lajur 1 adalah kontrol negatif; lajur 2: Marka 2 log ladder; lajur 3 dan 4: koloni plasmid no. 2,28

1.8. Isolasi Plasmid ulang untuk fragmen I

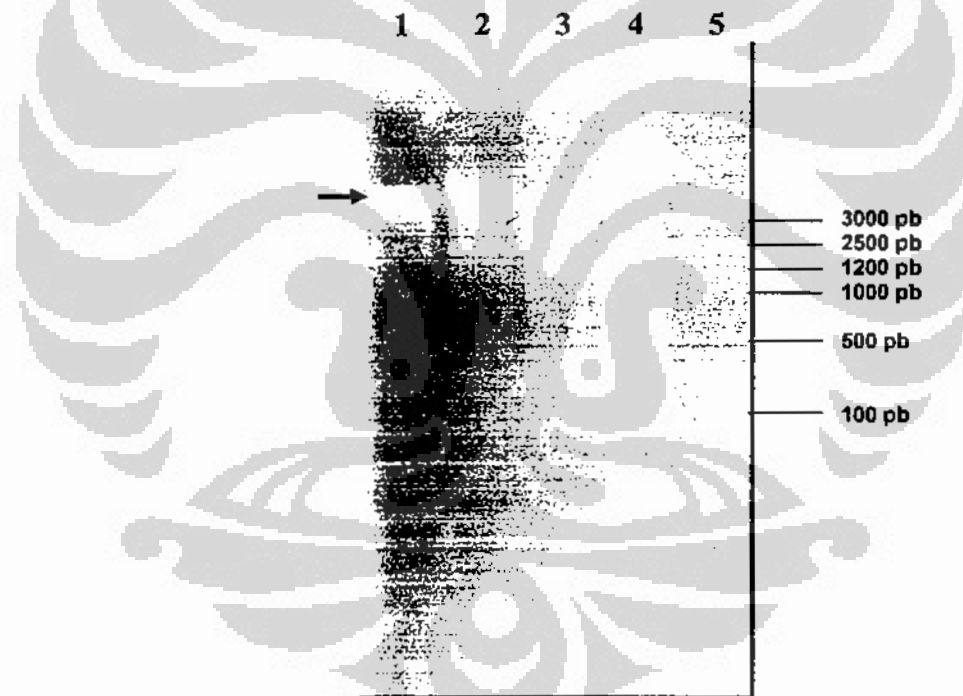
Usaha untuk mendapatkan klon fragmen I DNA APOBEC3G, maka dilakukan ligasi dan transformasi kembali. Hasil transformasi dapat dilihat pada gambar 29, dimana pada lajur 1, 2, 4-8, 10-15, dan 18 menunjukkan bahwa koloni plasmid tidak memperlihatkan *shifting* saat dibandingkan plasmid *wild type*. Sedangkan lajur 3, 16, dan 17 menunjukkan bahwa koloni plasmid memperlihatkan adanya *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type*



Gambar 27 . Analisis hasil isolasi plasmid ulang fragmen I DNA APOBEC3G. Lajur 1-8, 10-18: koloni plasmid untuk fragmen I DNA APOBEC3G; lajur 9: plamid *wild type*.

1.8.1. Identifikasi sisipan dengan enzim restriksi

Koloni yang memiliki *shifting*, selanjutnya dianalisis dengan restriksi enzimatis untuk identifikasi adanya sisipan di dalam plasmid, seperti yang terlihat pada gambar 30, dimana pada lajur 1 merupakan koloni plasmid no.3, dan lajur 2 merupakan koloni plasmid no. 15; memperlihatkan linierisasi setelah dipotong dengan Enzim EcoRI, dan terdapat *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type* yang dipotong dengan Enzim EcoRI. Untuk lajur 3 yang merupakan koloni plasmid no. 16 menunjukkan linierisasi setelah dipotong dengan Enzim EcoRI tetapi tidak terdapat *shifting* saat dibandingkan dengan plasmid *wild type* yang dipotong dengan Enzim EcoRI



Gambar 28. Analisis hasil identifikasi plasmid rekombinan dengan enzim restriksi. Lajur 1: koloni plasmid no.3; lajur 2: koloni plasmid no. 15; lajur 3: koloni plasmid no. 16; lajur 5: plasmid *wild type* yang dipotong dengan Enzim EcoRI; lajur 4: Marka 2 log ladder

1.8.2. Identifikasi klon fragmen I DNA APOBEC3G dengan PCR

Konfirmasi bahwa plasmid mengandung gen APOBEC3G, yaitu dengan melakukan proses PCR dengan primer *insert* fragmen I APOBEC3G. Hasil yang diperoleh melalui elektroforesis di gel poliakrilamid 8%, yaitu koloni plasmid no 3, 15, yang diduga mengandung sisipan fragmen I, ternyata tidak tampak pita fragmen I DNA APOBEC3G yang berukuran 452 pb tersebut, seperti yang tampak pada gambar di bawah ini. Hal ini dapat terjadi karena pada saat PCR, suhu annealing fragmen I DNA APOBEC3G dapat saja berbeda ketika sebelum dan sesudah dimasukkan ke dalam vektor kloning, sehingga perlu dilakukan optimasi suhu kembali.

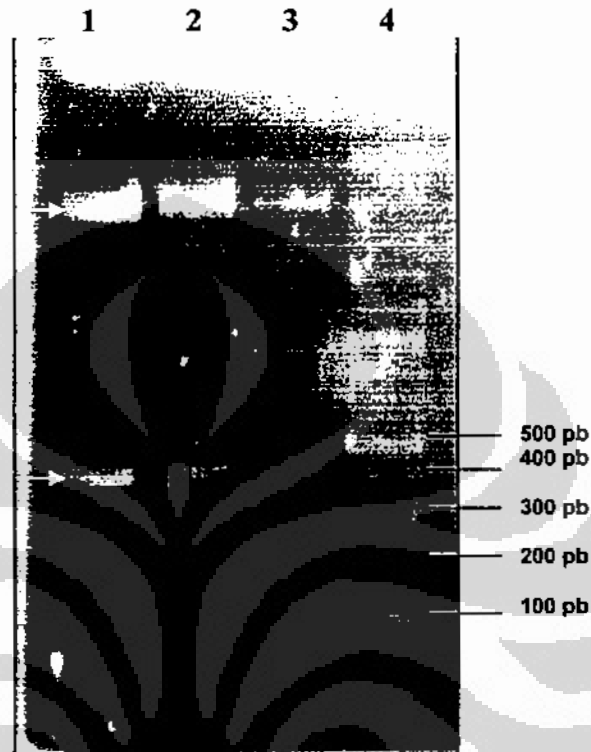


Gambar 29. Analisis hasil identifikasi klon dengan PCR. Lajur 1: kontrol negatif; lajur 2-4: koloni plasmid no. 3 dengan gradien suhu 58-62°C; lajur 5-7: koloni plasmid no. 15 dengan gradien suhu 58-62°C; lajur 8: Marka 2 log ladder.

1.8.3. Identifikasi sisipan dengan dua enzim

Karena identifikasi melalui PCR, belum dapat diketahui dengan jelas apakah plasmid rekombinan mengandung sisipan fragmen I DNA APOBEC3G, maka dilakukan analisis restriksi dengan menggunakan dua enzim yang terletak di antara tempat fragmen I DNA APOBEC3G disisipkan di plasmid. Kedua enzim restriksi tersebut yaitu Pst I dan Xba I. Restriksi ini dilakukan dengan tujuan jika plasmid rekombinan mengandung sisipan dengan ukuran sesuai yang diharapkan, maka hasil elektroforesis akan menunjukkan dua pita DNA yaitu plasmid dan

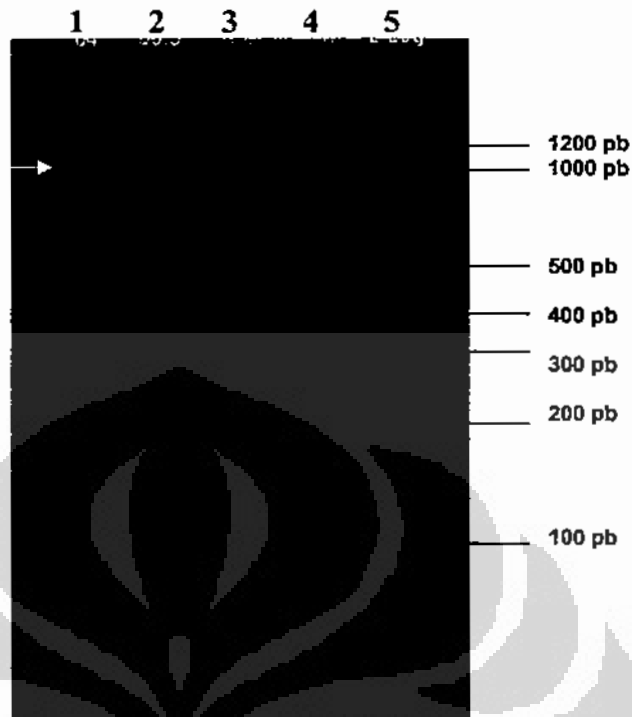
sisipan yang diinginkan. Gambar dibawah ini merupakan hasil dari analisis restriksi dua enzim, yang menunjukkan bahwa adanya dua pita DNA yaitu plasmid pKS dan sisipan yang diinginkan berukuran 452 pb.



Gambar 30. Analisis hasil identifikasi sisipan fragmen I DNA APOBEC3G dengan dua enzim restriksi. Lajur 1 menunjukkan koloni plasmid no.3; Lajur 2 menunjukkan koloni plasmid no. 15; lajur 3 adalah plasmid *wild type* yang dipotong dengan Enzim Pst I dan Xba I; lajur 4 adalah Marka 2 log ladder

1.9 *Overlap Extension* Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G

Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang telah diperoleh, selanjutnya digunakan untuk pola cetak DNA untuk menghasilkan DNA APOBEC3G *full length*. Fragmen-fragmen tersebut disambung satu dengan lainnya menggunakan teknik *overlap extension* PCR. Primer-primer untuk masing-masing fragmen dirancang memiliki daerah *overlap* sebesar ± 100 pb pada ujung 3'. Daerah *overlap* akan menyambung fragmen I, II, dan III sehingga menjadi DNA APOBEC3G *full length* berukuran 1150 pb. Pada gambar 33, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pita sekitar 1150 pb berhasil disintesis, tetapi perlu optimasi lebih lanjut.



Gambar 31. Analisis hasil *overlap extension* fragmen-fragmen APOBEC3G lajur 1: full length 64°C; lajur 2: full length 60°C; lajur 3: full length MgCl₂ 2mM (64°C); lajur 4: full length MgCl₂ 2mM (60°C); lajur 5: marka 2 log-ladder.

2. PEMBAHASAN

Optimasi reaksi PCR untuk mendapatkan DNA APOBEC3G *full length* telah dilakukan dengan menggunakan berbagai kondisi seperti suhu annealing, konsentrasi primer, dan cetakan cDNA. Analisis hasil tidak menunjukkan adanya pita DNA sesuai yang diharapkan yaitu sebesar 1155 pb. Hal tersebut kemungkinan disebabkan kondisi reaksi amplifikasi yang digunakan belum optimal. Oleh karena itu, dilakukan amplifikasi kembali dengan kondisi reaksi PCR yang lainnya. Analisis hasil yang didapat setelah dilakukan amplifikasi dengan berbagai kondisi, DNA APOBEC3G *full length* sulit diperoleh sehingga dibuat strategi untuk memudahkan sintesis, yaitu: membagi sekuens mRNA APOBEC3G menjadi tiga fragmen yang saling *overlap*.

Hasil sintesis fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang diperoleh melalui PCR memperlihatkan selain didapatkan fragmen DNA APOBEC3G juga disertai pita DNA non spesifik. Adanya pita DNA non-spesifik ini kemungkinan

disebabkan pola cetak yang digunakan adalah cDNA APOBEC3G (yang berasal dari RNA CEM-GFP *cell line*), dimana ada bermacam-macam RNA di *cell line* tersebut, sehingga dapat terjadi kompetisi antar RNA, akibatnya kemungkinan primer APOBEC3G dapat juga spesifik pada DNA lain. Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G tersebut diperoleh setelah melalui proses optimasi menggunakan PCR.

Optimasi PCR perlu dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang tepat sehingga dihasilkan produk PCR yang spesifik (Ahmed, 2006). Proses amplifikasi yang optimal bergantung pada beberapa faktor yang meliputi profil suhu, DNA cetakan, konsentrasi primer, enzim DNA *polymerase*, waktu denaturasi, jumlah siklus, dan konsentrasi $MgCl_2$ dalam larutan *buffer*.³⁰

Optimasi suhu *annealing* primer dilakukan dengan metode gradien suhu. Metode tersebut menggunakan variasi suhu *annealing* sehingga memiliki kelebihan karena waktu yang dibutuhkan untuk proses optimasi menjadi lebih efisien. Penentuan nilai gradien suhu yang digunakan berdasarkan nilai T_m masing-masing pasangan primer. Nilai suhu terendah pada gradien suhu *annealing* yang digunakan adalah $5^\circ C$ di bawah T_m masing-masing primer.⁴

Dalam proses optimasi PCR, juga dilakukan peningkatan konsentrasi akhir primer menjadi $25 \mu M$. kondisi konsentrasi akhir primer $0,5 \mu M$ yang biasa dipakai dalam komponen PCR, selalu memberikan hasil negatif saat produk PCR dilakukan elektroforesis dan dibaca melalui *geldoc*. Setelah dicoba dengan menaikkan konsentrasi akhir primer, pada konsentrasi akhir primer $25 \mu M$ memberikan respon yang bagus. Hal ini diduga disebabkan kualitas primer yang kurang bagus.

Kondisi reaksi amplifikasi yang kurang optimal juga dapat mempengaruhi produk PCR yang dihasilkan. Faktor yang dapat menyebabkan tidak terbentuknya pita DNA spesifik adalah adanya penempelan antara pasangan-pasangan primer yang saling berkomplemen pada daerah ujung 3'. Primer-primer tersebut dapat menempel pada ujung 3' yang berkomplemen karena konsentrasi primer yang terlalu tinggi dalam reaksi.²⁴ Konsentrasi cetakan DNA cenderung menurun sedangkan konsentrasi primer tetap dalam reaksi sehingga perbandingan antara konsentrasi primer dan cetakan DNA menjadi berubah dalam reaksi. Konsentrasi

primer dalam reaksi dapat menjadi lebih tinggi dibandingkan konsentrasi cetakan DNA.

Selama proses optimasi, hasil produk PCR sering menunjukkan primer dimer. Produk dimer dapat terjadi karena konsentrasi primer yang terlalu tinggi. Konsentrasi primer yang tinggi dapat meningkatkan *mispriming*, akumulasi produk amplifikasi yang tidak spesifik, dan meningkatkan kemungkinan terjadinya reaksi amplifikasi antar primer yang akan menghasilkan produk dimer.¹⁶

Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G sintetik yang telah berhasil diperoleh kemudian dipurifikasi dengan tujuan untuk menghilangkan garam-garam yang berasal dari campuran bahan untuk teknik PCR sebelumnya. Garam-garam ini dapat mengganggu proses pemotongan DNA sintetik dengan enzim restriksi. Sehingga, dengan proses purifikasi ini diharapkan DNA protease sintetik nantinya dapat dipotong oleh enzim restriksi secara efisien

Pada proses transformasi, koloni *E. coli* dengan plasmid pBluescript *wild type* yang digunakan sebagai kontrol transformasi, dapat tumbuh pada medium agar. Pertumbuhan koloni ini menandakan bahwa proses transformasi berhasil dilakukan. Untuk mengetahui bahwa bakteri yang dapat tumbuh pada proses transformasi bukanlah bakteri kontaminan, serta untuk mengetahui efektivitas kerja antibiotik pada medium pertumbuhan bakteri, maka digunakan kontrol kontaminasi yang merupakan *E. coli* T10 *wild type*. Bakteri ini tidak akan tumbuh jika antibiotik telah ditambahkan pada medium pertumbuhan serta tidak mengalami kerusakan. Hal ini disebabkan *E. coli* T10 *wild type* memiliki sifat sensitif terhadap antibiotik karena tidak memiliki plasmid yang mengandung gen resistensi terhadap antibiotik.

Pada proses transformasi yang dilakukan, *E. coli* T10 *wild type* tidak tumbuh sedangkan *E. coli* yang membawa plasmid pBluescript KS dan *E. coli* yang membawa plasmid pBluescript fragmen gen APOBEC3G dapat tumbuh. Hal ini berarti bahwa koloni *E. coli* yang terlihat tumbuh merupakan *E. coli* yang memiliki plasmid yang mengkode resistensi terhadap antibiotik. Selain itu, dari hasil ini dapat diketahui bahwa antibiotik yang ditambahkan pada medium pertumbuhan bakteri belum mengalami kerusakan, karena dapat menghambat

pertumbuhan bakteri yang sensitif terhadap antibiotik. Namun, koloni *E. coli* transforman yang dihasilkan hanya 5 koloni. Hasil transformasi yang tidak banyak bisa disebabkan karena kondisi sel yang kurang kompeten untuk proses transformasi DNA ke dalam sel. Hal ini bisa dimungkinkan karena pada saat dilakukan proses transformasi tidak dilakukan optimasi sel kompeten. Sel *E. coli* yang tidak kompeten tidak akan dapat digunakan untuk proses transformasi DNA ke dalam sel, karena membran sel tidak dapat dibuat sensitif (*render*) untuk proses memasukkan DNA ke dalam sel.

Selain itu, hasil transformasi dengan jumlah sedikit bisa terjadi karena konsentrasi DNA hasil ligasi juga sedikit, tidak banyak klon hasil ligasi yang dihasilkan. Apabila tidak berhasil dilakukan proses ligasi antara plasmid dengan DNA sisipan, maka plasmid dan DNA sisipan memiliki bentuk linier. Sedangkan hasil ligasi akan menghasilkan DNA rekombinan berbentuk sirkuler. Molekul DNA rekombinan dalam bentuk sirkuler akan lebih mudah ditransformasikan ke dalam sel *E. coli* dibandingkan dengan DNA dalam bentuk linier. Sehingga, apabila DNA hasil ligasi tidak banyak terbentuk, maka koloni klon yang dihasilkan pun juga tidak akan banyak.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Sintesis DNA APOBEC3G yang dibagi menjadi 3 fragmen telah berhasil diperoleh.
2. Fragmen gen I, II dan III APOBEC3G telah terklona ke dalam plasmid pBluescript KS (-)
3. Teknik *overlap extension* PCR menggunakan 3 fragmen gen APOBEC3G menghasilkan pita yang sesuai dengan ukuran gen APOBEC3G (1150 pb).

2. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk penyempurnaan penelitian ini. Saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan adalah:

1. Perlu dilakukan verifikasi sekuen fragmen-fragmen terklona.
2. Perlu dilakukan optimasi PCR untuk mendapatkan gen APOBEC3G *full length* menggunakan fragmen I, II, dan III.

DAFTAR PUSTAKA

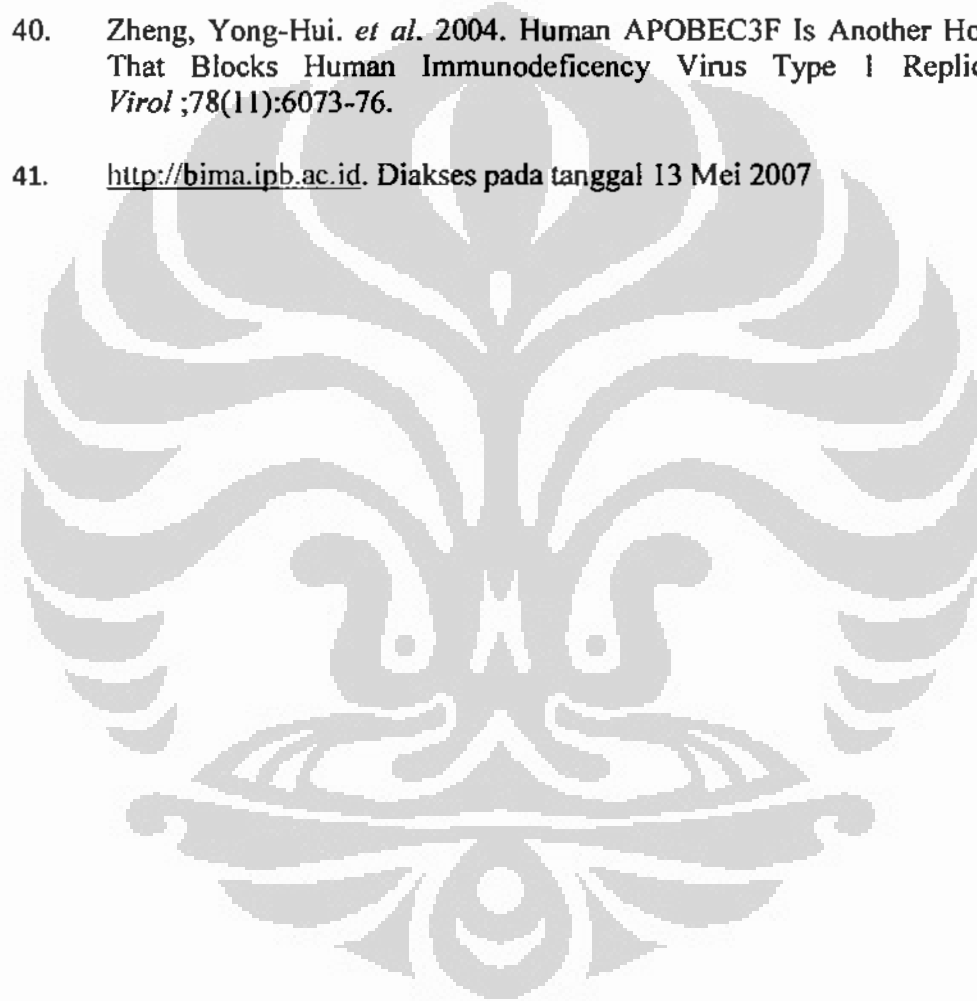
1. Ahmed, Z. 2006. Optimization of PCR conditions in vitro for maximum amplification of DNA from *Xanthomonas campestris* 13551. *Journal of Applied Sciences Research* 2(3): 112--122.
2. Anonymous. HIV. Didapat dari: <http://stanleychien.tripod.com/hiv.html>. Diakses tanggal 13 Maret 2008.
3. Blanc, D., Patience, C., Schulz, T. F., Weiss, R., and Spire, B. 1993. Transcomplementation of VIF- HIV-1 mutants in CEM cells suggests that VIF affects late steps of the viral life cycle. *Virology* 193, 186-192
4. Brinkmann. 2007. Using gradient PCR to determine optimum annealing temperature. (?): 1 hlm.<http://www.brinkmann.com/support.html> Diakses tanggal 12 November 2007.
5. Brown, T. A. 2006. *Gene cloning & DNA analysis: An introduction*. 5th ed. Blackwell Publishing, Manchester: xx + 386 hlm.
6. Cerboni C., Neri F., Casartelli N., *et al.*, 2007. Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Gen Virol*; 88: 242-250.
7. Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. 2005. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*; 435: 108-14. Epub 2005 Apr 13. <http://amedeo.com/lit.php>
8. Cooper, G.M. dan R.E. Hausman. 2004. *The Cell: A Molecular Approach*. 3rd Edition. ASM Press. Washington, D.C.
9. Djoerban, Zubairi dr. 1993. *Seluk Beluk AIDS. Kelompok Studi Khusus AIDS FKUI-RSCM dan Pusat Penelitian Kesehatan UI*. Jakarta.
10. Glick, B. R. & J. J. Pasternack. 1998. *Molecular biotechnology: Principles and Application of recombinant DNA*. 2nd ed. ASM Press, Washington
11. Griffiths, A. J., W. M. Gelbart, J. H. Miller & R. C. Lewontin. 1999. *Modern Genetic Analysis*. W.H. Freeman and Company, New York.
12. Goncalves, J. Santa-Marta Mariana. 2004. *HIV-I Vif and APOBEC3G: Multiple Roads to One Goal*. URJA-Centro de Patogenese Molecular. Faculdade de Farmacia. Universidade de Lisboa. Portugal.

13. Gu, Y., dan W. I. Sundquist. 2003. Good to CU. *Nature* 424:21–22.
 14. Harris, R.s., K.N. Bishop, A.M. Sheehy, H.M. Craig, S.K. Petersen-Mahrt, I.N. Watt, M.S. Neuberger, dan M.H. Malim. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113:803-809.
 15. HIV Protein Attacks Body's Innate Protection System That Could Prevent Virus Replication. Oregon Health & Science University. Didapat dari: <http://www.sciencedaily.com> Diakses tanggal 13 Mei 2007.
 16. Innis, M.H. & D.H. Gelfand. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
 17. Khan, M.A., S. Kao, E. Miyagi, H. Takeuchi, R. Goila-Gaur, S. Opi, C.L. Gipson, T.G. Parslow, H. Ly and K. Strebel. 2005. Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with Human Immunodeficiency Virus type 1 nucleoprotein complexes. *J. Virol.* 79: 5870-5874.
 18. Kobayashi, M. *et al.* APOBEC3G Targets Specific Virus Species. 2004. *J Virol*;78(15):8238-44.
 19. Luciw, P.A. 1996. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication. *Dalam:* Fields, B.N., D.M Knipe, dan P.M. Howley (eds). Fields Virology. Volume 2. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.
 20. Mangeat, B., *et al.* 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424: 99-103.
 21. Marin, M., K.M. Rose, S.L. Kozak dan D. Kabat. 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature Med.* 9: 1398-1403.
 22. Mehle, A., B. Strack, P. Ancuta, C. Zhang, M. McPike dan D. Gabuzda. 2004. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitinproteasome pathway. *J Biol Chem* 279: 7792–98
 23. Micklos, D.A. dan G.A. Freyer. 1990. DNA Science: A First Course in Recombinant DNA Technology. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Mangeat B, Turelli P. *et al.* 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*;424:99-103.

24. Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor.
25. Newman, E.N.C., R.K. Holmes, H. M. Craig, K.C. Klein, J.R. Lingappa, M.H. Malim dan A.M. Sheehy. 2006. Antiviral Function of APOBEC3G Can Be Dissociated from Cytidine Deaminase Activity. *Current Biol.* 15: 166-170.
26. Pavlakis, G.N. 1997. The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type I. *Dalam: DeVita, V.T., S. Hellman, S.A. Rosenberg (eds). AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention*. 4th edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.
27. QIAGEN. 2003. Miniprep Handbook 4: Purification of plasmid DNA, large plasmid (> 100 kb), low copy plasmid & cosmid, plasmid DNA prepared by other method. QIAGEN, Australia
28. QIAGEN. 2003. MinElute handbook for: PCR purification kit, gel extraction, reaction clean up kit. QIAGEN, Australia
29. Rubbert A, Behrens G, Ostrowski M. 2006. Pathogenesis on HIV-1 Infection. *HIV Medicine*.
30. Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Vol 3. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York.
31. Sardjito, Drs. 1993 *Seluk Beluk AIDS*. Kelompok Studi Khusus AIDS FKUI-RSCM dan Pusat Penelitian Kesehatan UI. Jakarta.
32. Sheehy, A.M., N.C. Gaddis, J.D. Choi, dan M.H. Malim. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646-650.
33. Stowell, Dan. The Molecules of HIV. Diunduh dari: <http://www.mcl.d.co.uk/hiv>.
34. Stratagene. 1999. pBluescript II phagemid vectors. Stratagene Company, USA.
35. Takaori Akifumi, Kondo. 2006. APOBEC Family Proteins: Novel Antiviral Innate Immunity. *Int J Hematol.* 83:213-216.
36. Wong, D. W. S. 1997. *The ABCs of gene cloning*. Chaoman & Hall, New York.
37. Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. ANDI,

Yogyakarta.

38. Zennou, V, D. Perez-Caballero, H. Gottlinger danb P.D. Bieniasz. 2004. APOBEC3G incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type Particles. *J. Virol.* 78:12058-12061.
39. Zhang, H. et al. 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424: 94-98
40. Zheng, Yong-Hui. *et al.* 2004. Human APOBEC3F Is Another Host Factor That Blocks Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication. *J Virol* ;78(11):6073-76.
41. <http://bima.ipb.ac.id>. Diakses pada tanggal 13 Mei 2007



LAMPIRAN I

Rancangan Primer pada mRNA APOBEC3G untuk Fragmen-fragmen APOBEC3G

SQ Sequence 1717 BP; 493 A; 419 C; 426 G; 379 T; 0 other;

```

ctgccaggg gagggccca gagaaaacca gaaagagggt gagagactga ggaagataaa      60
gcgtcccagg gcctcctaca ccagcgctg agcaggaagc gggaggggcc atgactacga      120
ggccttggga ggtcacttta gggaggctg tcctaaaacc agaagcttgg agcagaaagt      180

                                     atgaagcct
gaaacctggt tgctccagac aaagatctta gtcgggacta gccggccaag gatgaagcct      240

cacttcag (1F)
cacttcagaa acacagtga gcaatgtat cgagacacat tctcctaca cttttataat      300
agaccatcc tttctcgtcg gaataccgtc tggctgtgct acgaagtga aacaaaggg      360
ccctcaaggc cccctttgga cgcaagatc tttcggaggc aggtgtattc cgaacttaag      420
taccaccag agatgagatt ctccactgg ttcagcaagt ggaggaagct gcatcgtgac      480
caggagtatg aggtcactg gtacatatcc tggagccct gcacaaagtg tacaagggat      540

                                     ccgctc
atggccacgt tectggcca ggaccgaag gttaccctga ccattcttctg tgeccgctc      600

tactacttct g (594F)
tactacttct gggaccaga ttaccaggag gcgttcgca gcctgtgtca gaaaagagac      660

      cgtg ccaccatgaa gatc (684R)
ggtcgcgtg ccaccatgaa gatcatgaat tatgacgaat ttcagcactg ttggagcaag      720
ttcgtgtaca gccaaagaga gctatctgag ccttggaaata atctgctaa atattatata      780
ttactgcaca tcatgctggg ggagattctc agacactega tggatccacc cacattcaact      840
ttcaacttta acaatgaacc ttgggtcaga ggacggcatg agacttacct gtgttatgag      900

                                     ttctatgc
gtggagcgca tgcacaatga cactgggtc ctgctgaacc agcgcagggg ctttctatgc      960

aaccaggctc (953F)
aaccaggctc cacataaaca cggtttctt gaaggccgcc atgcagagct gtgcttctg      1020

      ttggaa gctggacctg g (1052R)
gacgtgattc ccttttgaa gctggacctg gaccaggact acagggttac ctgcttcacc      1080
tcttgagcc cctgctcag ctgtgccag gaaatggcta aattcattc aaaaaacaaa      1140
cacgtgagcc tgtgcatctt cactgcccgc atctatgatg atcaaggaag atgtcaggag      1200
gggctgcgca cctggcca ggctggggcc aaaatttcaa taatgacata cagtgaattt      1260
aagcactgct gggacacctt tgtggaccac cagggatgct ccttcagcc ctgggatgga      1320

                                     ctcca gaatcaggaa
ctagatgagc acagccaaga cctgagtggg aggctgcggg ccatttctcca gaatcaggaa      1380

aac (1155R)
aactgaagga tgggcctcag tctetaagga aggcagagac ctgggttgag cctcagaata      1440
aaagatcttc ttccaagaaa tgcaaacagg ctgttcacca ccattctcag ctgatcacag      1500
acaccagcaa agcaatgcac tectgacca gtatattctt ttaaaaatta gagtgcatta      1560
ctttgaatca aaaatttatt tatatttcaa gaataaagta ctaagattgt gctcaatca      1620
cagaaaagtt tcaaacctac taatccagcg acaatttgaa tcggttttgt aggtagagga      1680
ataaatgaa atactaaatc tttctgtaa aaaaaa      1717

```

//

Sumber: Genbank NM_021822

LAMPIRAN 2

Posisi relatif primer *full length* gen APOBEC3G

5' → F
232 pb

mRNA APOBEC3G

← 3' R
1386 pb

Keterangan:

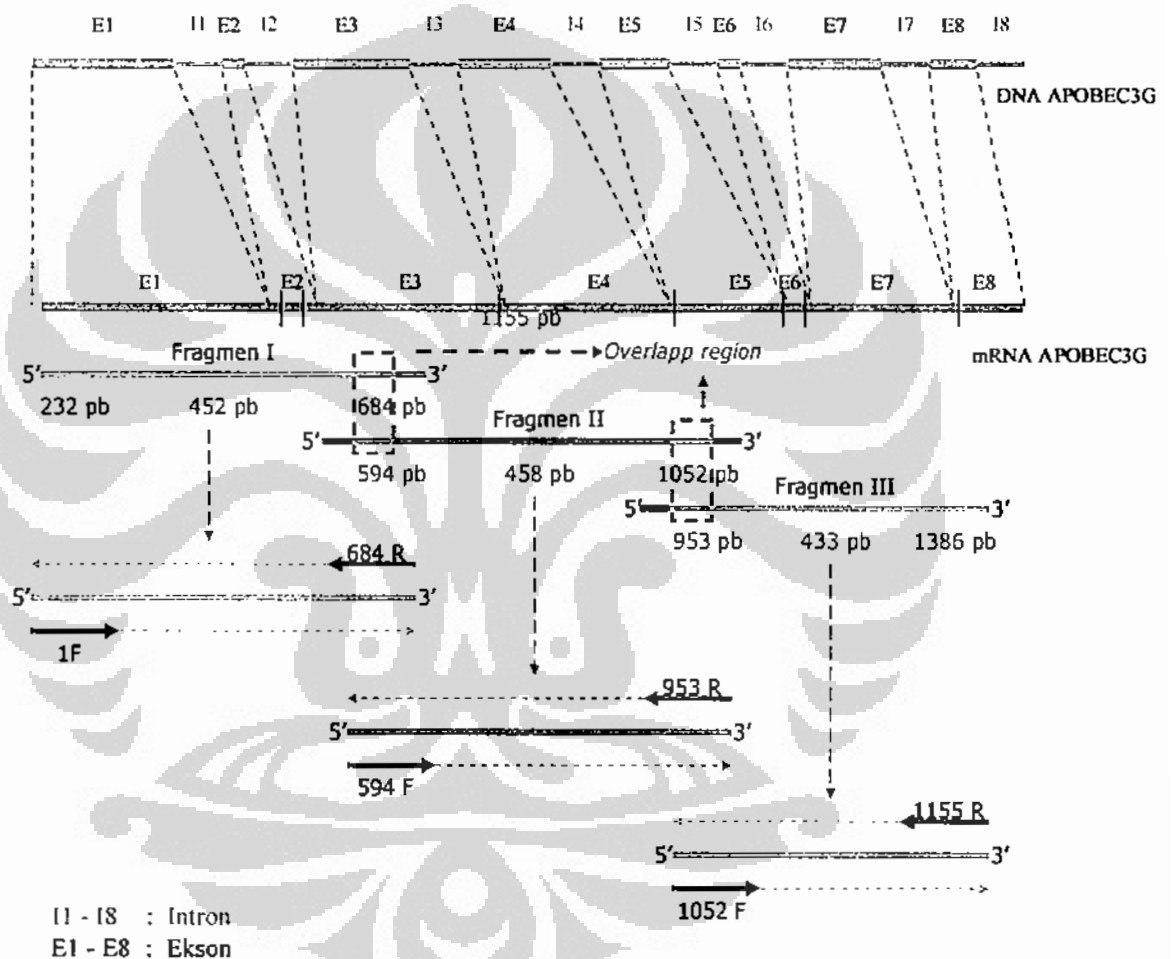
F: Forward

R: Reverse

Referensi: *GenBank Accession Number* NM_021822

LAMPIRAN 3

Posisi relatif primer pada DNA APOBEC3G untuk menghasilkan fragmen-fragmen overlap gen APOBEC3G



Referensi: *GenBank Accession Number* NM_021822

RIWAYAT HIDUP



1. Nama : Angela Fuzairi
2. NPM : 610501202X
3. Alamat : Jl. Percetakan Negara No: 4, Jakarta Pusat
4. Agama : Katolik
5. Tempat/Tanggal lahir : Palembang, 22 Januari 1984
6. Riwayat Pendidikan :
- | | | |
|-----|--------------------------------|------------------|
| SD | : SD Xaverius I Putri | Lulus tahun 1995 |
| SMP | : SMP Xaverius Maria | Lulus tahun 1998 |
| SMA | : SMU Xaverius 3 | Lulus tahun 2001 |
| S1 | : Universitas Sriwijaya | Lulus tahun 2005 |
| | Jurusan Biologi Fakultas MIPA | |
| S2 | : Universitas Indonesia | Lulus tahun 2008 |
| | Program Magister Ilmu Biomedik | |
| | Kekhususan Mikrobiologi | |

SINTESIS DAN PENKLONAN FRAGMENT-FRAGMENT DNA APOBEC3G KE DALAM VEKTOR *pBluescript* KS (-)

Angela Fuzairi, Lamtorogung Prayitno, Budiman Bela

*Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Institute of
Human Virology and Cancer Biology the University of Indonesia (IHVCB-UI)*

APOBEC3G, *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*, merupakan protein manusia yang dapat mengganggu replikasi HIV dengan memasukkan dirinya ke dalam partikel virus dan merusak susunan materi genetik virus. Beberapa studi terbaru menunjukkan bahwa APOBEC3G manusia mengatur infektivitas HIV-1 dengan mendeaminasi dC menjadi dU pada rantai minus DNA yang baru dibentuk, menyebabkan hipermutasi G menjadi A dari rantai plus DNA viral. Induksi hipermutasi oleh APOBEC3G dapat menyebabkan pembentukan stop kodon pada ORF protein virus dan memicu degradasi DNA virus oleh glikosilase DNA urasil yang selanjutnya dapat menghambat replikasi HIV. Protein ini layak untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka pengembangan anti retrovirus yang berbasis pada mekanisme penghambatan replikasi HIV-1 melalui jalur APOBEC3G. Sebagai langkah awal, diperlukan sistem ekspresi gen APOBEC3G yang akan diperoleh melalui sintesis dan kloning gen APOBEC3G ke dalam vektor ekspresi DNA rekombinan. Untuk mendapatkan mRNA APOBEC3G yang akan digunakan sebagai pola cetak dalam sintesis cDNA APOBEC3G, dilakukan ekstraksi RNA dari sel CEM-GFP menggunakan Rneasy Mini Kit. Agar DNA APOBEC3G lengkap dapat diperoleh dengan lebih mudah, sintesis DNA seret ganda APOBEC3G menggunakan reaksi RT-PCR dua tahap, dibagi atas tiga daerah pada gen APOBEC3G dengan susunan nukleotida yang bertumpang tindih (*overlapping*) pada bagian ujung segmen DNA yang akan berfungsi sebagai penyambung fragmen-fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G utuh. Hasil eksperimen menunjukkan ketiga fragmen APOBEC3G yang masing-masing berukuran 452 pb, 458 pb, dan 433 pb berhasil dibentuk lewat reaksi PCR dengan menggunakan enzim Pfx dan diklona ke dalam vektor plasmid. DNA APOBEC3G yang dibagi menjadi 3 fragmen telah berhasil didapat, seperti yang diharapkan. Pekerjaan lanjutan akan dilakukan untuk verifikasi sekuen fragmen-fragmen terklona dan menyambung ketiga fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G yang utuh yang kemudian akan diklona ke dalam vektor ekspresi.

Kata Kunci:

Kloning APOBEC3G, HIV, Vif

1. PENDAHULUAN

APOBEC3G merupakan suatu protein yang diekspresikan terutama pada limfosit T manusia.²⁰ Beberapa studi terbaru menunjukkan bahwa APOBEC3G manusia menghambat infektivitas HIV-1 dengan mendeaminasi dC menjadi dU pada rantai minus DNA yang baru dibentuk, menyebabkan hipermutasi G menjadi A dari rantai plus DNA viral. Induksi hipermutasi oleh APOBEC3G menyebabkan stop kodon pada ORF protein virus atau memicu degradasi DNA virus oleh glikosilase DNA urasil yang selanjutnya dapat menghambat replikasi HIV. APOBEC3G manusia juga memiliki aktivitas antiretroviral pada lentivirus lainnya dan virus leukemia murin (MLV) dengan mekanisme yang sama.¹

Virus HIV mengkode protein yang berperan sebagai faktor infektifitas, yang disebut vif (*Viral Infectivity Factor*).¹⁵ Protein vif dapat menghalangi perakitan APOBEC3G manusia ke dalam virion dengan cara mendegradasi APOBEC3G melalui jalur ubiquitin yang difasilitasi oleh vif. Hal ini memungkinkan HIV-1 dapat bereplikasi dalam sel yang memproduksi APOBEC3G.²

Kekebalan terhadap semua jenis obat antiretrovirus yang digunakan dalam terapi infeksi HIV-1 telah ditemukan. Kenyataan ini mendorong dilakukannya usaha-usaha untuk menemukan obat antiretrovirus jenis baru yang diharapkan lebih efektif dalam menghambat replikasi virus HIV-1. Selama ini penelitian yang telah digunakan dengan kultur virus terasa kurang praktis untuk digunakan skrining kandidat anti HIV-1 dalam jumlah banyak. Di samping itu juga dipertimbangkan dari aspek fasilitas laboratorium yang diperlukan untuk kultur virus. Untuk mempermudah skrining kandidat anti HIV dalam jumlah banyak, baik berupa bahan alam atau sintetik, diperlukan sistem skrining yang cepat, aman, dan murah dibandingkan dengan kultur virus. Salah satu alternatif sistem yang dikembangkan untuk mencapai tujuan ini ialah dengan menggunakan interaksi antara protein rekombinan APOBEC3G dan vif HIV-1.

2. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk memperoleh DNA sintetik APOBEC3G sel CEM-GFP. Sedangkan tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk memperoleh fragmen-fragmen DNA sintetik APOBEC3G, dan memperoleh klon plasmid pembawa fragmen-fragmen DNA.

Manfaat yang bisa didapatkan dari penelitian ini antara lain : fragmen-fragmen DNA sintetik APOBEC3G yang didapat, kemudian akan disambung menjadi DNA APOBEC3G yang utuh, dan akan dipakai untuk ekspresi protein rekombinan APOBEC3G, dalam rangka studi interaksi protein Vif HIV-1 dan APOBEC3G serta molekul-molekul penghambat interaksi tersebut.

3. BAHAN DAN CARA KERJA

3.1. Galur bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* galur T10. *Escherichia coli* galur T10 digunakan dalam proses propagasi plasmid karena sifat efisiensi transformasinya yang tinggi. galur *E.coli* ini ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) agar dan cair.

3.2. SEL CEM-GFP

DNA APOBEC3G yang digunakan berasal dari kultur sel CEM-GFP yang merupakan suatu galur sel limfosit T, yang merupakan sel non permissive terhadap infeksi HIV-1/Δvif. Sel ini akan digunakan dalam ekstraksi mRNA APOBEC3G yang kemudian diekstraksi RNA.

3.3. Plasmid

Vektor plasmid yang digunakan dalam penelitian ini adalah pBluescript II KS(-) (Stratagene, 1999) sebagai vektor kloning.

3.4. Primer

Pasangan primer yang digunakan merupakan pasangan primer *sense* dan *antisense* yang spesifik terhadap ORF (*Open Reading Frame*) mRNA APOBEC3G. Penentuan sekuen primer dilakukan berdasarkan sekuen mRNA yang mengkode APOBEC3G yang dibagi menjadi tiga daerah dengan susunan nukleotida yang bertumpang tindih (*overlapping*) pada bagian ujung segmen DNA yang akan berfungsi sebagai penyambung fragmen-fragmen tersebut menjadi DNA APOBEC3G utuh. Sekuen primer yang digunakan adalah:

Nama	Sekuen (5' → 3')
1F	CCTGCGGTACCAT GTTATGAAGCCTCACTTCAG
684R	GATCTTCATGGTGGCACG
594F	CCGCCTCTACTACTTCTG
1052R	TCCAGGTCCAGCTTCCAA
953F	TTCTATGCAACCAGGCTC
1155R	GGCCCGAATTCGTTTTCTGATTCTGGAG

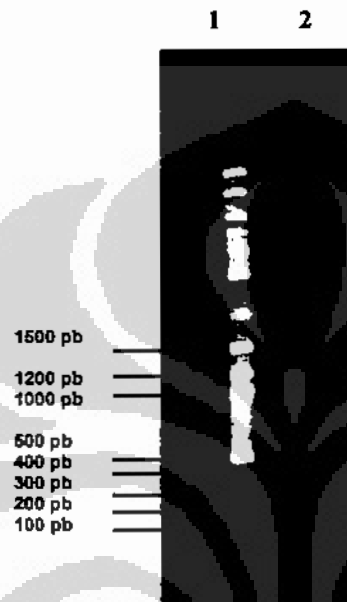
3.5. ALUR PENELITIAN

Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahap penelitian, yaitu kultur sel CEM-GFP, panen sel CEM-GFP, ekstraksi RNA sel, proses transkriptase balik menjadi cDNA APOBEC3G, amplifikasi ketiga fragmen gen APOBEC3G, konstruksi plasmid pembawa fragmen-fragmen DNA APOBEC3G⁹, ligasi fragmen-fragmen DNA APOBEC3G ke plasmid⁹, seleksi *blue-white screening*⁹, isolasi plasmid, analisis sisipan dengan enzim restriksi, analisis sisipan dengan PCR

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Hasil Ekstraksi RNA

Hasil analisis RNA pada gel agarose 1% memperlihatkan bahwa RNA sel CEM-GFP dapat terlihat dengan jelas.



Gambar 1. Analisis hasil ekstraksi RNA melalui elektroforesis dengan gel agarosa 1%. Lajur 1: M: Marka 2 log-ladder; Lajur 2. RNA sel di agarose 0,8%

Sintesis Fragmen-fragmen APOBEC3G

Fragmen-fragmen APOBEC3G yang dibagi menjadi fragmen I, II, dan III, berhasil diperoleh dengan menggunakan cetakan cDNA APOBEC3G (yang berasal dari RNA CEM-GFP *cell line*). Hasil analisis pada gel agarosa 1% menunjukkan bahwa pita DNA fragmen APOBEC3G I, II, dan III, yang masing-masing berukuran 452 pb, 458 pb, dan 433 pb dapat dihasilkan walau disertai dengan pita DNA non-spesifik (gambar 2 dan 3). Karena Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang didapat juga disertai dengan pita DNA non spesifik, maka dilakukan isolasi gel untuk mendapatkan fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang spesifik.

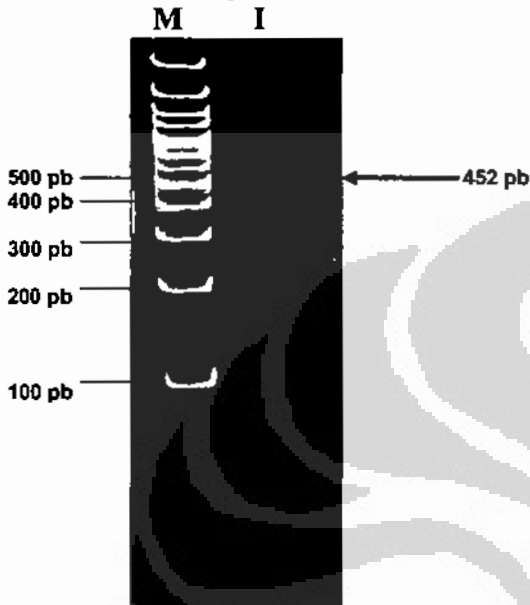


Gambar 2. Analisis hasil: fragmen I DNA APOBEC3G; Lajur 1: fragmen I; Lajur 2: M= Marka 2 Log ladder

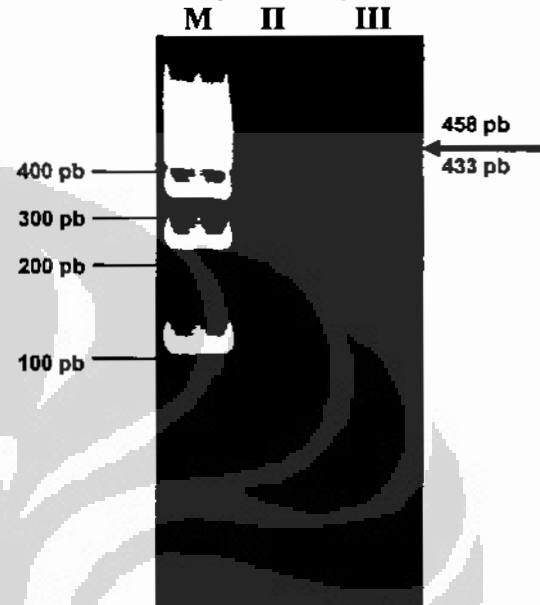


Gambar 3. Analisis hasil fragmen II dan fragmen III DNA APOBEC3G; M: Marka 2 log

Selanjutnya fragmen-fragmen tersebut dipurifikasi menggunakan PCR purification kit dengan Qiacac II(Qiagen). Pada gambar 4 dan 5, dari hasil purifikasi terlihat pita DNA spesifik APOBEC3G dengan ukuran amplikon sesuai dengan yang diharapkan, kecuali pada fragmen III APOBEC3G, masih terdapat pita non-spesifik.



Gambar 4. Analisis hasil purifikasi fragmen I DNA APOBEC3G dengan PCR purification kit (Qiagen) (M: Marka 2 log ladder)
Identifikasi klon dengan PCR



Gambar 5. Analisis hasil purifikasi fragmen II dan III DNA APOBEC3G dengan PCR purification kit (Qiagen) (M: Marka 2 log ladder)

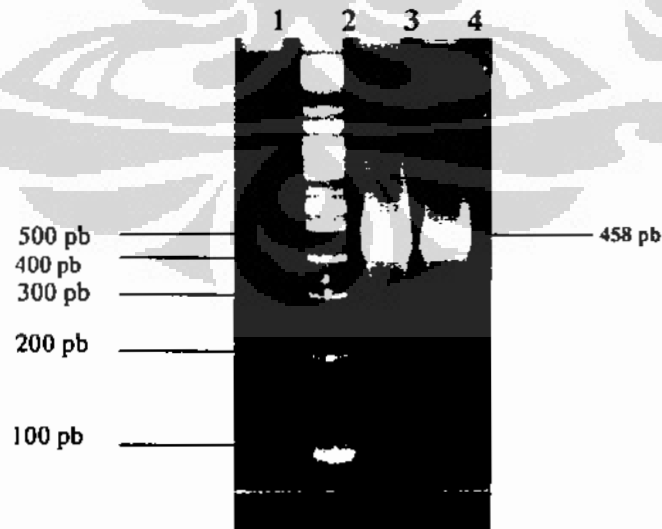
Untuk konfirmasi bahwa plasmid mengandung gen APOBEC3G, yaitu dengan melakukan proses PCR dengan primer *insert* (fragmen APOBEC3G). Hasil yang diperoleh melalui elektroforesis di agarosa 1%, yaitu koloni-koloni putih yang tumbuh, yang diharapkan mengandung Fragmen I (lajur 1-4) dan II (lajur 6-8), tidak ada. Seharusnya pada gel agarosa tersebut, terdapat ukuran fragmen I dan II yang masing-masing besarnya 452 pb dan 458 pb. Sedangkan untuk koloni-koloni putih yang mengandung fragmen III, dengan lajur 9-13, hanya lajur 11-13, terdapat pita fragmen III DNA APOBEC3G yang berukuran 433 pb(-), seperti yang tampak pada gambar 6. Selanjutnya fragmen III DNA APOBEC3G dilakukan sekuensing untuk menguji kebenaran klon.



Gambar 6. Analisis hasil identifikasi klon yang mengandung sisipan DNA APOBEC3G dengan PCR. lajur 1-4: klon yang diduga mengandung fragmen I DNA APOBEC3G; lajur 6-8: klon yang diduga mengandung fragmen II DNA APOBEC3G; lajur 9-13: klon yang diduga mengandung fragmen III DNA APOBEC3G; Lajur 5: Marker 2 Log Ladder.

Identifikasi klon fragmen II DNA APOBEC3G dengan PCR

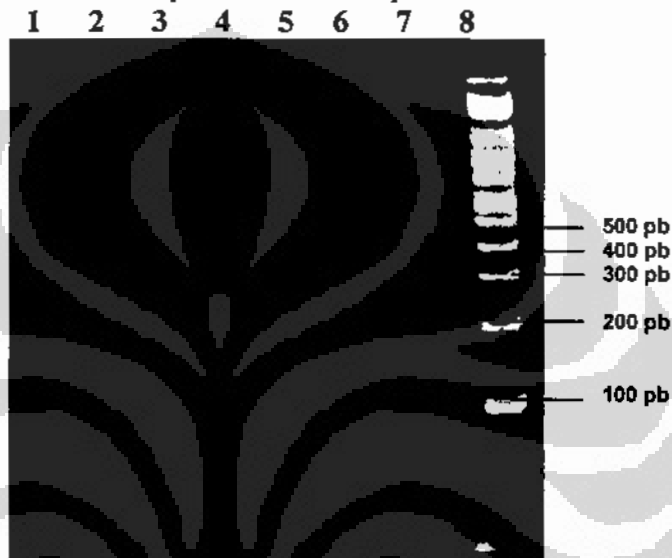
Untuk konfirmasi bahwa plasmid mengandung gen APOBEC3G, yaitu dengan melakukan proses PCR dengan primer *insert* fragmen II APOBEC3G. Hasil yang diperoleh melalui elektroforesis di gel poliakrilamid 8%, yaitu no. koloni 28 terdapat pita fragmen III DNA APOBEC3G yang berukuran 458 pb, seperti yang tampak pada gambar berikut:



Gambar 7. Analisis hasil identifikasi klon dengan PCR. Lajur 1 adalah kontrol negatif; lajur 2: Marker 2 log ladder; lajur 3 dan 4: koloni plasmid no. 2.2

Identifikasi klon fragmen I DNA APOBEC3G dengan PCR

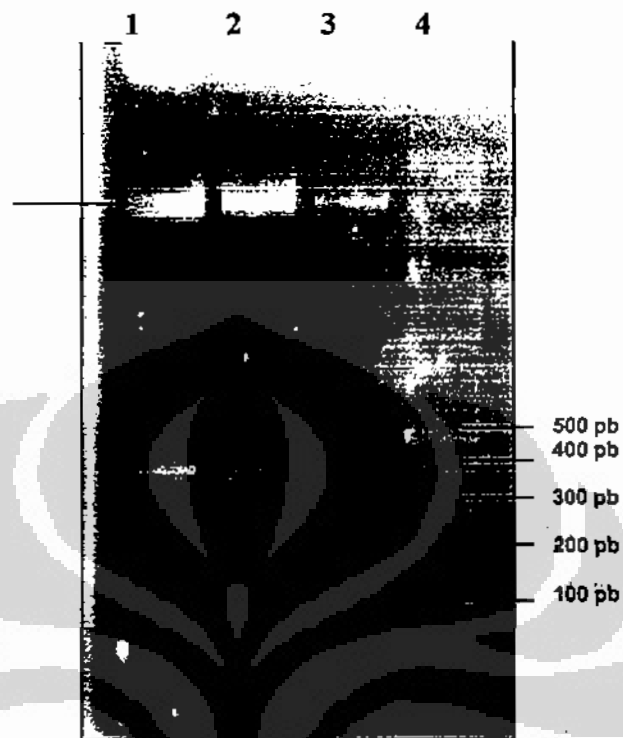
Untuk konfirmasi bahwa plasmid mengandung gen APOBEC3G, yaitu dengan melakukan proses PCR dengan primer *insert* fragmen I APOBEC3G. Hasil yang diperoleh melalui elektroforesis di gel poliakrilamid 8%, yaitu koloni plasmid no 3, 15, yang diduga mengandung sisipan fragmen I, ternyata tidak tampak pita fragmen I DNA APOBEC3G yang berukuran 452 pb tersebut, seperti yang tampak pada gambar di bawah ini. Hal ini perlu dilakukan optimasi suhu kembali.



Gambar 8. Analisis hasil identifikasi klon dengan PCR. Lajur 1: kontrol negatif; lajur 2-4: koloni plasmid no. 3 dengan gradien suhu 58-62°C; lajur 5-7: koloni plasmid no. 15 dengan gradien suhu 58-62°C; lajur 8: Marker 2 log ladder.

1.8.3. Identifikasi sisipan dengan dua enzim

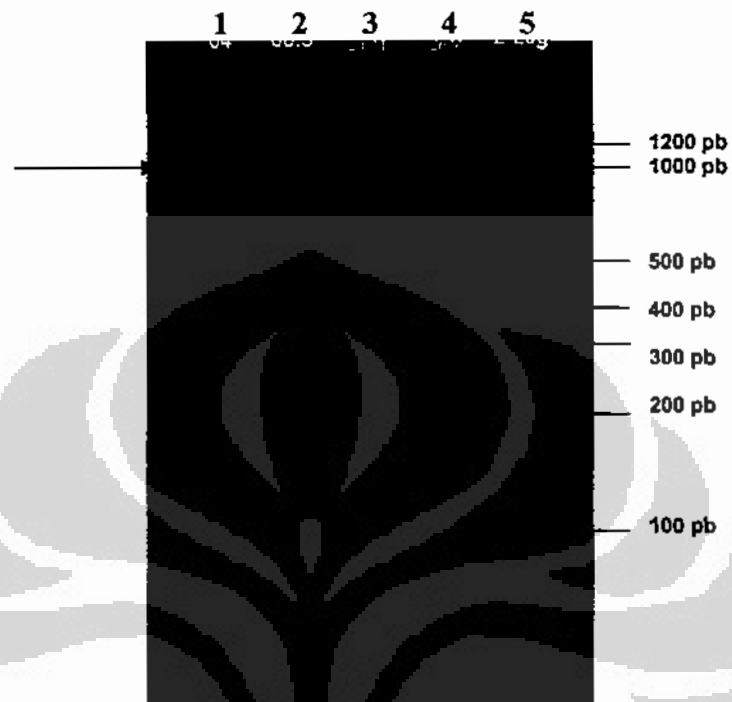
Karena identifikasi melalui PCR, belum dapat diketahui dengan jelas apakah plasmid rekombinan mengandung sisipan fragmen I DNA APOBEC3G, maka dilakukan analisis restriksi dengan menggunakan dua enzim yang terletak di antara tempat fragmen I DNA APOBEC3G disisipkan di plasmid. Kedua enzim restriksi tersebut yaitu Pst I dan Xba I. Gambar 9 merupakan hasil dari analisis restriksi dua enzim, yang menunjukkan bahwa adanya dua pita DNA yaitu plasmid pKS dan sisipan yang diinginkan berukuran 452 pb.



Gambar 9. Analisis hasil identifikasi sisipan fragmen I DNA APOBEC3G dengan dua enzim restriksi. Lajur 1 menunjukkan koloni plasmid no.3; Lajur 2 menunjukkan koloni plasmid no. 15; lajur 3 adalah plasmid *wild type type* yang dipotong dengan Enzim Pst I dan Xba I ; lajur 4 adalah Marker 2 log ladder

1.9 *Overlap Extension* Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G

Dengan didapatnya fragmen-fragmen DNA APOBEC3G, selanjutnya dilakukan *overlap extension* untuk menyambung fragmen-fragmen DNA APOBEC3G menjadi DNA APOBEC3G yang lengkap (1150 pb). Pada gambar 10, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pita sekitar 1150 pb berhasil disintesis, tetapi perlu optimasi lebih lanjut.



Gambar 10. Analisis hasil *overlap extension* fragmen-fragmen APOBEC3G lajur 1: full length 64°C; lajur 2: full length 60°C; lajur 3: full length MgCl₂ 2mM (64°C); lajur 4: full length MgCl₂ 2mM (60°C); lajur 5: marker 2 log-ladder.

PEMBAHASAN

Hasil sintesis fragmen-fragmen DNA APOBEC3G yang diperoleh melalui PCR memperlihatkan selain didapatkan fragmen DNA APOBEC3G juga disertai pita DNA non spesifik. Adanya pita DNA non-spesifik ini kemungkinan disebabkan pola cetak yang digunakan adalah cDNA APOBEC3G (yang berasal dari RNA CEM-GFP *cell line*), dimana ada bermacam-macam RNA di *cell line* tersebut, sehingga dapat terjadi kompetisi antar RNA, akibatnya kemungkinan primer APOBEC3G dapat juga spesifik pada DNA lain. Fragmen-fragmen DNA APOBEC3G tersebut diperoleh setelah melalui proses optimasi menggunakan PCR.

Dalam proses optimasi PCR, juga dilakukan peningkatan konsentrasi akhir primer menjadi 25 μ M. kondisi konsentrasi akhir primer 0,5 μ M yang biasa dipakai dalam komponen PCR, selalu memberikan hasil negatif saat produk PCR dilakukan elektroforesis dan dibaca melalui *geldoc*. Setelah dicoba dengan menaikan konsentrsi akhir primer, pada konsentrasi akhir primer 25 μ M memberikan respon yang bagus. Hal ini diduga disebabkan kualitas primer yang kurang bagus. Selama proses optimasi, hasil produk PCR sering menunjukkan primer dimer. Produk dimer dapat terjadi karena konsentrasi primer yang terlalu tinggi. Konsentrasi primer yang tinggi dapat meningkatkan *mispriming*, akumulasi produk amplifikasi yang tidak spesifik,

dan meningkatkan kemungkinan terjadinya reaksi amplifikasi antar primer yang akan menghasilkan produk dimer.³

Pada proses transformasi, koloni *E. coli* dengan plasmid pBluescript *wild type* yang digunakan sebagai kontrol transformasi, dapat tumbuh pada medium agar. Pertumbuhan koloni ini menandakan bahwa proses transformasi berhasil dilakukan. Untuk mengetahui bahwa bakteri yang dapat tumbuh pada proses transformasi bukanlah bakteri kontaminan, serta untuk mengetahui efektivitas kerja antibiotik pada medium pertumbuhan bakteri, maka digunakan kontrol kontaminasi yang merupakan *E. coli* T10 *wild type*. Bakteri ini tidak akan tumbuh jika antibiotik telah ditambahkan pada medium pertumbuhan serta tidak mengalami kerusakan. Hal ini disebabkan *E. coli* T10 *wild type* memiliki sifat sensitif terhadap antibiotik karena tidak memiliki plasmid yang mengandung gen resistensi terhadap antibiotik.

Selain itu, hasil transformasi dengan jumlah sedikit bisa terjadi karena konsentrasi DNA hasil ligasi juga sedikit, tidak banyak klon hasil ligasi yang dihasilkan. Apabila tidak berhasil dilakukan proses ligasi antara plasmid dengan DNA sisipan, maka plasmid dan DNA sisipan memiliki bentuk linier. Sedangkan hasil ligasi akan menghasilkan DNA rekombinan berbentuk sirkuler. Molekul DNA rekombinan dalam bentuk sirkuler akan lebih mudah ditransformasikan ke dalam sel *E. coli* dibandingkan dengan DNA dalam bentuk linier. Sehingga, apabila DNA hasil ligasi tidak banyak terbentuk, maka koloni klon yang dihasilkan pun juga tidak akan banyak.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

Sintesis DNA APOBEC3G yang dibagi menjadi 3 fragmen telah berhasil diperoleh, fragmen gen I, II dan III APOBEC3G telah terklona ke dalam plasmid pBluescript KS (-), dan teknik *overlap extension* PCR menggunakan 3 fragmen gen APOBEC3G menghasilkan pita yang sesuai dengan ukuran gen APOBEC3G (1150 pb). Saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan adalah perlu dilakukan verifikasi sekuen fragmen-fragmen terklona dan optimasi PCR untuk mendapatkan gen APOBEC3G *full length* menggunakan fragmen I, II, dan III.

PUSTAKA

1. Zheng, Yong-Hui. *et al.* 2004. Human APOBEC3F Is Another Host Factor That Blocks Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication. *J Virol* ;78(11):6073-76.
2. Kobayashi, M. *et al.* APOBEC3G Targets Specific Virus Species. 2004. *J Virol* ;78(15):8238-44.
3. Innis, M.H. & D.H. Gelfand. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego
4. Ahmed, Z. 2006. Optimization of PCR conditions in vitro for maximum amplification of DNA from *Xanthomonas campestris* 13551. *Journal of Applied Sciences Research* 2(3): 112--122.

5. Brinkmann. 2007. Using gradient PCR to determine optimum annealing temperature. (?): 1 hlm.<http://www.brinkmann.com/support.html> Diakses tanggal 12 November 2007.
6. Mangeat, B., *et al.* 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424: 99-103.
7. Stratagene. 1999. pBluescript II phagemid vectors. Stratagene Company, USA.
8. Muladno. 2002. Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor.
9. Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Vol 3. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York.
10. QIAGEN. 2003. Miniprep Handbook 4: Purification of plasmid DNA, large plasmid (> 100 kb), low copy plasmid & cosmid, plasmid DNA prepared by other method. QIAGEN, Australia
11. QIAGEN. 2003. MinElute handbook for: PCR purification kit, gel extraction, reaction clean up kit. QIAGEN, Australia

