

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyebab utama kematian diseluruh dunia. Dari 58 juta kematian di seluruh dunia dalam tahun 2005, tercatat 7,6 juta (13%) diantaranya disebabkan oleh kanker. Kematian yang disebabkan oleh penyakit kanker diperkirakan akan terus meningkat di tahun 2015 dan 11,4 juta orang di tahun 2030 (WHO, 2006 dalam Wirmandiyanthi *et al.*, 2013).

Jenis kanker yang paling umum dijumpai yaitu kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita di berbagai belahan dunia. Kanker ini dapat terjadi pada laki-laki meskipun presentasinya rendah (Smolin & Massie, 2002 *dalam* Moeljopawiro, 2007). Data tahun 1990-an membuktikan bahwa kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak diderita kedua oleh wanita di Indonesia setelah kanker serviks. Namun baru-baru ini data menunjukkan bahwa kanker payudara menjadi kanker yang paling banyak diderita wanita dan menjadi penyebab kematian yang utama. Nilai pengaruh kanker payudara per 100.000 jiwa sebesar 36,2 dan laju kematiannya sebesar 18,6. Kedua nilai ini meningkat dari sebelumnya. Hal ini disebabkan oleh kurangnya fasilitas untuk mendeteksi secara dini dan kurangnya akses untuk pengobatan utama (Iskandarsyah *et al.*, 2013).

Salah satu penyebab kanker adalah mutasi yang terjadi pada gen *PIK3CA*. Gen *PIK3CA* merupakan gen pengkode subunit katalitik p110 $\alpha$  dari enzim PI3K. Gen ini bermutasi dalam berbagai kanker pada manusia. Kasus ini terjadi di sekitar 30% dari beberapa kanker umum, termasuk karsinoma payudara, usus besar, endometrium, dan prostat. Pada keadaan normal, aktivitas PI3K sangat dikendalikan. Keseluruhan efek dari gabungan sinyal PI3K berfungsi untuk meningkatkan stimulasi replikasi seluler dan *survival* dan mengurangi inhibisi pertumbuhan dan apoptosis (Zhao and Vogt, 2008). PI3K memiliki peran yang sangat penting

dalam proses seluler, seperti proliferasi, diferensiasi, *survival*, migrasi (Mangone *et al.*, 2012), pertumbuhan sel, kemotaksis (Knight *et al.*, 2006), transportasi, homeostasis glukosa (Katso *et al.*, 2001), pembelahan serta transformasi sel (Jiménez *et al.*, 2002).

Mutasi dapat terjadi pada ekson 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 13, 18, dan 20. Meskipun umumnya mutasi yang terjadi mengelompok pada ekson 9 dan 20, mutasi pada *PIK3CA* juga ditemukan pada ekson-ekson tersebut meskipun sangat jarang terjadi (Gallia *et al.*, 2006). Kurang lebih 80% mutasi yang paling sering muncul yaitu pada ekson 9 (G1624A:E542K dan G1633A:E545K) yang menyandi ujung C domain heliks dan ekson 20 (A3140G:H1047R) yang menyandi domain kinase dari p110 $\alpha$ . Sedangkan sisanya (kurang lebih 20%) terjadi pada ekson 1-7 yang mengkode domain pengikat protein adaptor (ABD) dan domain C2 (Rudd *et al.*, 2011). Mutasi pada *PIK3CA* ini umumnya terjadi akibat berubahnya asam amino glutamat pada E542 dan E545 menjadi lisin dan histidin pada H1047 menjadi arginin (Bader *et al.*, 2005). Mutasi ini menyebabkan aktivitas lipid kinase meningkat dua kali lipat lebih tinggi, mengakibatkan meningkatnya fosforilasi pada protein AKT dan menginduksi transformasi onkogenik (Kato *et al.*, 2007). Data tersebut dapat dijadikan bukti bahwa mutasi *PIK3CA* berguna dalam prognostik dan penentuan terapi. Kelompok mutasi (pada ekson 9 dan 20 khususnya) membuat gen tersebut menjadi *marker* yang sangat tepat untuk deteksi dini pada kanker atau untuk memonitor perkembangan tumor (Samuels *et al.*, 2004).

PCR digunakan untuk memperbanyak wilayah tertentu dari untai DNA (DNA target) (Cheng *et al.*, 1994). PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi biomarker pada kanker (Kristensen, 2009). Penggunaan PCR untuk kepentingan diagnostik dalam medis disebut juga *PCR-based diagnostic*. Kelebihan dari metode ini adalah biaya yang relatif murah dan efektif untuk prosedur pengujian tradisional (Yang *et al.*, 2004).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan permasalahan dari penelitian ini adalah preparasi kontrol, bagian dari paket sistem deteksi biomarker kanker payudara, kloning gen *PIK3CA* ekson 1, 4, dan 20 pada plasmid pGEM<sup>®</sup>-T *Easy Vector*.

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi :

1. Kloning fragmen DNA gen *PIK3CA* ekson 1, 4, dan 20 untuk persiapan kontrol diagnostik marker kanker payudara.
2. Konfirmasi hasil penelitian dilakukan berturut-turut dengan metode seleksi biru-putih, PCR koloni, ekstraksi plasmid rekombinan, PCR plasmid rekombinan, dan sekuensing.

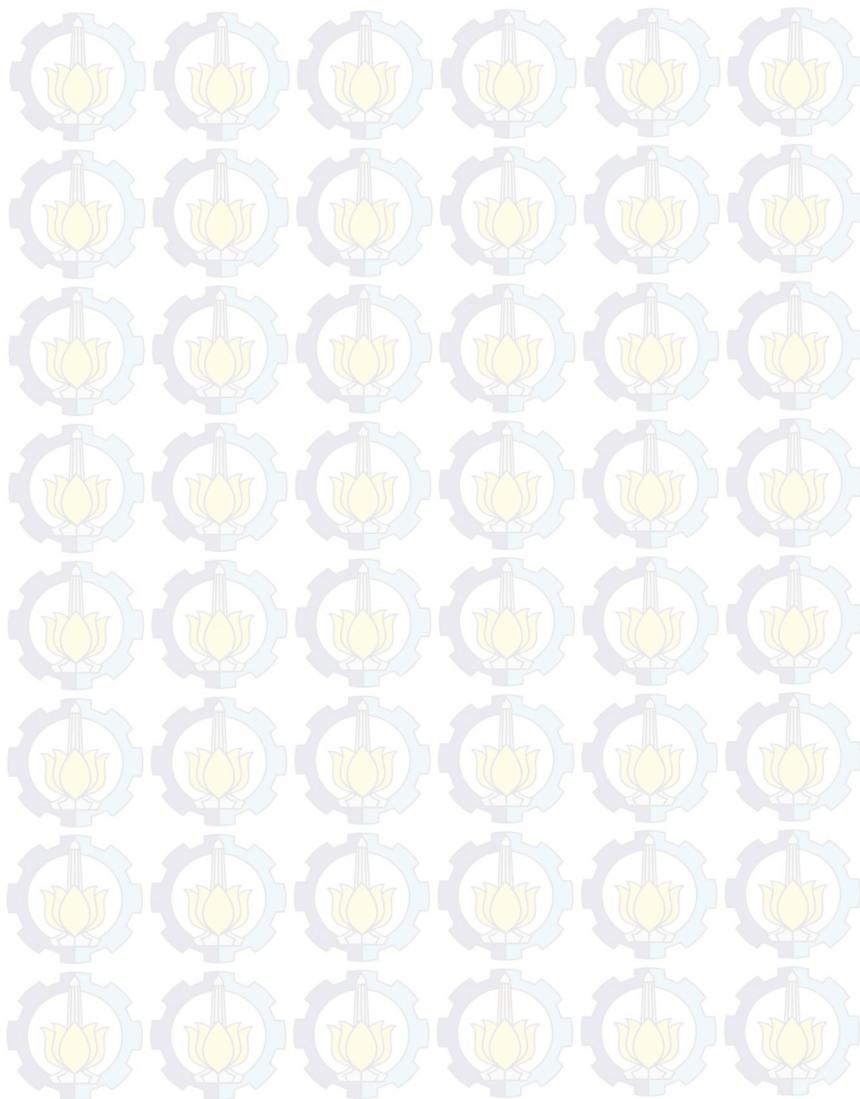
## 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah kloning ekson 1, 4, dan 20 *PIK3CA* sebagai kontrol dalam mempersiapkan sistem deteksi mutasi *PIK3CA* berbasis PCR.

## 1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah menyediakan kontrol untuk metode diagnostik kanker payudara berbasis PCR untuk biomarker kanker, *PIK3CA*.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kanker**

Kanker merupakan penyebab utama kematian diseluruh dunia. Dari 58 juta kematian di seluruh dunia dalam tahun 2005, tercatat 7,6 juta (13%) diantaranya disebabkan oleh kanker. Kematian yang disebabkan oleh penyakit kanker diperkirakan akan terus meningkat di tahun 2015 dan 11,4 juta orang di tahun 2030 (WHO, 2006 *dalam* Wirmandiyanthi *et al.*, 2013).

Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan dan penyebaran sel-sel abnormal yang tidak terkendali. Jika persebaran tidak terkontrol, dapat menyebabkan kematian. Kanker disebabkan baik oleh faktor eksternal (tembakau, organisme terinfeksi, bahan kimia, dan radiasi) maupun faktor internal (mutasi genetik, hormon, kondisi kekebalan tubuh, dan mutasi yang muncul dari metabolisme). Faktor-faktor ini dapat bertindak bersama-sama atau secara berurutan untuk memicu atau mendorong perkembangan kanker. Umumnya jarak antara paparan faktor eksternal hingga kanker terdeteksi adalah 10 tahun atau lebih. Kanker dapat diobati dengan pembedahan, radiasi, kemoterapi, terapi hormon, terapi kekebalan tubuh, terapi yang ditargetkan (American Cancer Society, 2014).

#### **2.2 Kanker Payudara**

Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang jaringan payudara. Jaringan payudara tersebut terdiri dari kelenjar susu (kelenjar pembuat air susu), saluran kelenjar (saluran air susu), dan jaringan penunjang payudara. Kanker payudara tidak menyerang kulit payudara yang berfungsi sebagai pembungkus. Kanker payudara menyebabkan sel dan jaringan payudara berubah bentuk menjadi abnormal dan bertambah banyak secara tidak terkendali (Mardiana, 2007).

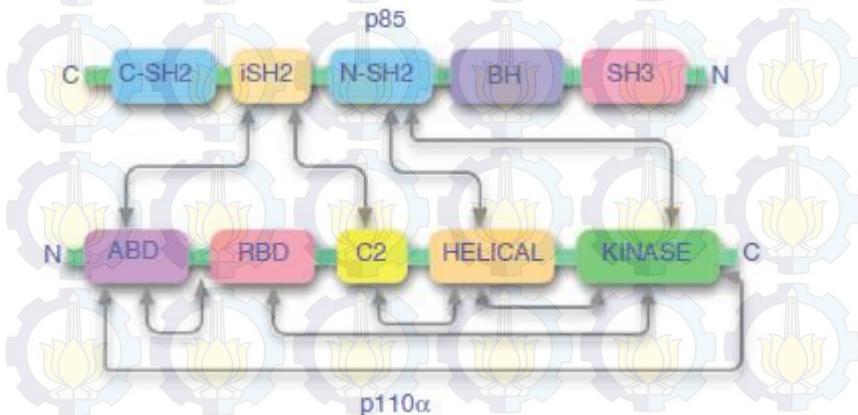
Penyebab kanker payudara sangat beragam, tetapi ada sejumlah faktor risiko yang dihubungkan dengan perkembangan penyakit ini yaitu asap rokok, konsumsi alkohol, umur pada saat menstruasi pertama, umur saat melahirkan pertama, lemak pada makanan, dan sejarah keluarga tentang ada tidaknya anggota keluarga yang menderita penyakit ini (Macdonald dan Ford, 1997).

Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita di berbagai belahan dunia. Kanker ini dapat terjadi pada laki-laki meskipun presentasinya rendah (Smolin & Massie, 2002 *dalam* Moeljopawiro, 2007). Pada tahun 2008, kanker payudara menjadi kanker yang paling banyak diderita wanita di dunia dengan kasus sebanyak 1,38 juta yang didiagnosa (23% dari seluruh penyakit kanker) dan terhitung sebanyak 458.000 jiwa mati per tahunnya (Ferlay *et al.*, *dalam* Iskandarsyah, 2013). Pada umumnya, pengaruh kanker payudara di negara maju lebih besar secara ekonomi daripada di negara berkembang, namun nilai kefatalan kasusnya lebih tinggi di negara berkembang (Jemal *et al.*, *dalam* Iskandarsyah, 2013). Di Indonesia, data tahun 1990-an membuktikan bahwa kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak diderita kedua oleh wanita setelah kanker serviks. Namun baru-baru ini data menunjukkan bahwa kanker payudara menjadi kanker yang paling banyak diderita wanita dan menjadi penyebab kematian yang utama (Iskandarsyah, 2013). Nilai pengaruh kanker payudara per 100.000 jiwa sebesar 36,2 dan laju kematiannya sebesar 18,6. Kedua nilai ini meningkat dari sebelumnya (Ferlay *et al.*, *dalam* Iskandarsyah, 2013). Hal ini disebabkan oleh kurangnya fasilitas untuk mendeteksi secara dini dan kurangnya akses untuk pengobatan utama (Shim *et al.*, *dalam* Iskandarsyah, 2013).

### 2.3 PI3K $\alpha$

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) kelas I adalah protein heterodimer yang terdiri dari subunit katalitik dan subunit regulator, atau disebut juga sebagai adaptor (Zhao & Vogt, 2008). Kelompok enzim ini merupakan enzim lipid kinase yang memfosforilasi cincin

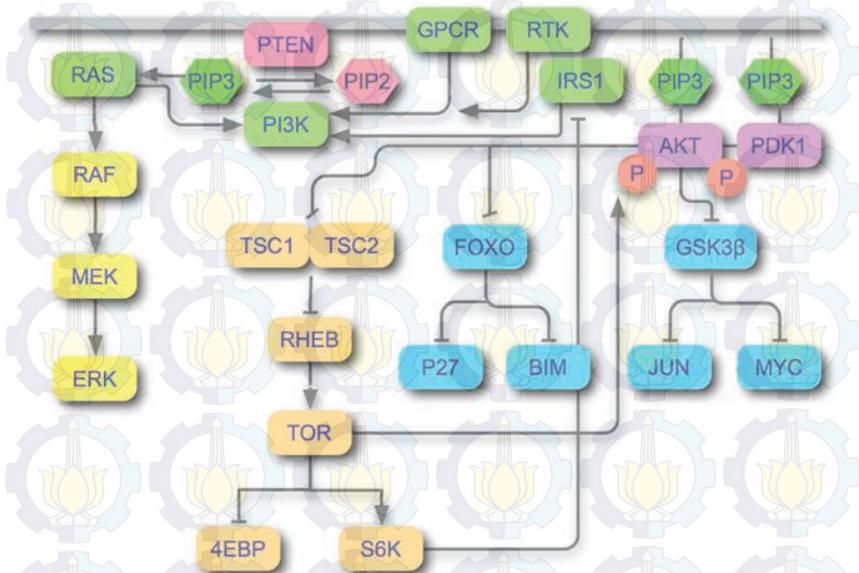
inositol pada fosfoinositida, sehingga bertindak sebagai transduser sinyal. Berdasarkan letak fosforilasi pada cincin inositol, enzim PIK dikelompokkan menjadi 3 famili yaitu phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphoinositide 4-kinase (PI4K), dan phosphoinositide 5-kinase (PI5K). PI3K terbagi lagi menjadi kelas I, II, atau III berdasarkan struktur subunit, regulasi, dan pemilihan substratnya (Samuels dan Ericson, 2006). Namun hanya PI3K kelas I saja yang terlibat dalam kanker, tidak ada data yang menghubungkan antara kelas II atau kelas III dengan onkogenesis. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya perbedaan produk dan spesifitas substrat pada ketiga kelas PI3K. Hanya kelas I yang mampu mengubah  $PIP_2$  (phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) menjadi  $PIP_3$  (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) dimana  $PIP_3$  merupakan komponen sangat penting yang mengendalikan pertumbuhan dan replikasi sel, dan kemampuan menghasilkan molekul *second messenger* ini memberikan potensi onkogenik kepada lipid kinase (Zhao & Vogt, 2008).



Gambar 2.1 Struktur dan Peta Interaksi Domain pada Subunit Regulator, p85, dan Subunit Katalitik, p110 (Zhao & Vogt, 2008).

Subunit regulator (p85 $\alpha$ ) terdiri dari satu domain SH3, domain BH (*bcr*-homologous), dua daerah kaya prolin, dan dua domain SH2

(N-SH2 dan C-SH2) yang dipisahkan dengan iSH2 (*inter*-SH2) yang akan berinteraksi dengan subunit katalitik p110 $\alpha$  (Jücker *et al.*, 2002). Kedua domain SH2 akan berikatan dengan sekuens tertentu residu tirosin baik pada protein reseptor yang telah terautofosforilasi atau pada protein adaptor (Foster *et al.*, 2003). Domain BH memediasi pengikatan dengan protein-protein seperti XB-1, Rac, Cdc42, Rab5, dan PTEN. Domain SH3 memediasi pengikatan protein FAK, CAS, Apoptin, Ruk, SNX9, Dynamin, Cbl, dan BCR-ABL (Bell, 2012).



Gambar 2.2 Jalur sinyal PI3K (Zhao & Vogt, 2008).

Keterangan: GPCR, G-protein-coupled-receptor; RTK, receptor tyrosine kinase; Raf, V-Raf murine leukemia viral oncogene homolog; MEK, Map/Erk kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Map, mitogen-activated protein.

Pada keadaan normal, aktivitas PI3K kelas I sangat dikendalikan. Keseluruhan efek dari gabungan sinyal PI3K berfungsi untuk meningkatkan stimulasi replikasi seluler dan *survival* dan mengurangi inhibisi pertumbuhan dan apoptosis (Zhao & Vogt, 2008). Aktivasi RPTK (*Receptor Protein Tyrosine Kinase*) menyebabkan asosiasi PI3K dengan reseptor melalui satu atau dua domain SH2 pada unit adaptor dengan konsensus fosfotirosin. Hal ini menyebabkan aktivasi alosterik pada bagian subunit katalitik. Aktivasi PI3K ini menyebabkan produksi PI-3,4,5-P<sub>3</sub> dalam beberapa detik. Efek phosphoinositide pada sel dimediasi melalui pengikatan spesifik dengan setidaknya dua domain pengikatan protein-lipid, yaitu domain FYVE dan pleckstrin-homology (PH). Protein yang mengandung domain PH merupakan mediator penting untuk induksi pensinyalan PI3K kelas IA. Domain PH ditemukan di banyak protein, termasuk protein serine/treonine kinase 3'-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) dan Akt/PKB, keduanya merupakan pusat untuk mengubah efek aktivitas PI3K yang telah diregulasi (Vara *et al.*, 2004).

PI3K memiliki peran yang sangat penting dalam proses seluler, seperti proliferasi, diferensiasi, *survival*, migrasi (Mangone *et al.*, 2012), pertumbuhan sel, kemotaksis (Knight *et al.*, 2006), transportasi, homeostasis glukosa (Katso *et al.*, 2001), pembelahan serta transformasi sel (Jiménez *et al.*, 2002).

Jalur PI3K, sebuah sistem sinyal transduksi terkait dengan onkogen dan beberapa kelas reseptor dengan banyak fungsi penting sel, kemungkinan merupakan jalur pensinyalan umum kanker pada manusia. Sehingga jalur ini merepresentasikan suatu kesempatan dan tantangan bagi terapi kanker (Liu *et al.*, 2009). Dalam beberapa tahun terakhir, terlihat bahwa jalur PI3K/Akt sering terganggu dalam banyak kanker pada manusia. Jalur ini merupakan penyebab utama tidak hanya dalam perkembangan tumor tetapi juga dalam menanggapi potensi respon tumor terhadap pengobatan kanker. Banyak "agen penarget" baru yang secara khusus dirancang untuk bereaksi pada target yang berhubungan dengan PI3K/Akt (Vara *et al.*, 2004).

Saat ini telah diketahui bahwa agen kemoterapi membunuh sel tumor dengan menginduksi apoptosis serta semakin bertambahnya bukti bahwa eksploitasi jalur *survival*, yang mungkin lebih berkontribusi pada timbulnya penyakit, mungkin juga penting terhadap perkembangan resistensi terhadap pengobatan kemoterapi. Sinyal bertahan hidup yang disebabkan oleh beberapa reseptor dimediasi terutama oleh PI3K/Akt, oleh karena itu jalur ini berperan penting dalam resistensi obat. Bahkan ada penelitian terbaru yang menunjukkan bahwa jalur aktivasi PI3K/Akt terkait dengan resistensi sel tumor terhadap pengobatan kemoterapi dan radiasi (Vara *et al.*, 2004).

Jalur PI3K/Akt/PTEN telah menjadi target utama dalam perkembangan pengobatan seperti agen yang dapat menghambat proliferasi, dan membalikkan represi apoptosis dan resistensi terhadap terapi sitotoksik pada sel kanker. *Inhibitor* dari protein yang terlibat dalam beberapa jalur sinyal PI3K/Akt telah dikembangkan dan beberapa dari obat tersebut telah memasuki uji coba klinis. Obat-obatan tersebut termasuk *inhibitor* yang menargetkan baik regulator *upstream* PI3K/Akt, seperti reseptor faktor pertumbuhan, dan efektor *downstream*, seperti komponen jalur mTOR. Contoh *inhibitor* yang menargetkan jalur PI3K adalah Wortmannin dan LY294002 (Vara *et al.*, 2004).

## 2.4 PIK3CA

Gen *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) terletak pada kromosom 3q26.32. Gen ini memiliki 20 ekson dan mengkode 1.068 asam amino (Peng *et al.*, 2007). Gen pengkode p110 $\alpha$ , *PIK3CA*, bermutasi dalam berbagai kanker pada manusia. Kasus ini terjadi di sekitar 30% dari beberapa kanker umum, termasuk karsinoma payudara, usus besar, endometrium, dan prostat (Zhao & Vogt, 2008). Mutasi pada *PIK3CA* telah dijadikan faktor prognostik positif dan dapat digunakan untuk memprediksi respon terhadap pengobatan yang cocok (Maruyama *et al.*, 2007). Mutasi pada gen ini dapat terjadi pada

ekson 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12, 13, 18, dan 20. Meskipun umumnya mutasi yang terjadi mengelompok pada ekson 9 dan 20, mutasi pada *PIK3CA* juga ditemukan pada ekson-ekson tersebut meskipun sangat jarang terjadi (Gallia *et al.*, 2006). Kurang lebih 80% mutasi yang paling sering muncul yaitu pada ekson 9 (G1624A:E542K dan G1633A:E545K) yang menyandi ujung C domain heliks dan ekson 20 (A3140G:H1047R) yang menyandi domain kinase dari p110 $\alpha$ . Sedangkan sisanya (kurang lebih 20%) terjadi pada ekson 1-7 yang mengkode domain pengikat protein adaptor (ABD) dan domain C2 (Rudd *et al.*, 2011). Mutasi ini umumnya terjadi akibat berubahnya asam amino glutamat pada E542 dan E545 menjadi lisin dan histidin pada H1047 menjadi arginin (Bader *et al.*, 2005). Mutasi ini menyebabkan aktivitas lipid kinase meningkat dua kali lipat lebih tinggi, mengakibatkan meningkatnya fosforilasi pada protein AKT dan menginduksi transformasi onkogenik (Kato *et al.*, 2007). Data tersebut dapat dijadikan bukti bahwa mutasi *PIK3CA* berguna dalam prognostik dan penentuan terapi. Kelompok mutasi (pada ekson 9 dan 20 khususnya) membuat gen tersebut menjadi *marker* yang sangat tepat untuk deteksi dini pada kanker atau untuk memonitor perkembangan tumor (Samuels *et al.*, 2004).

## 2.5 Mutasi Titik

Mutasi titik merupakan salah satu bentuk mutasi gen yang sangat sederhana, dimana terjadi penggantian satu pasangan basa dari satu nukleotida menjadi nukleotida lainnya (Goldberg, 2009). Mutasi titik ini terbagi menjadi dua yaitu transisi, dimana purin digantikan dengan purin dan pirimidin digantikan dengan pirimidin; dan transversi, dimana purin digantikan pirimidin dan sebaliknya (Khurana, 2009). Mutasi titik ini menyebabkan terjadinya *silent mutation*, dimana penggantian basa tetap menghasilkan asam amino yang sama; *missense mutation*, dimana penggantian basa juga dapat mengubah asam amino dan protein yang dihasilkan; dan *nonsense mutation*, dimana kodon yang biasanya tergantikan tersebut berubah menjadi *termination codon* (Khurana, 2009).

Untuk mendeteksi adanya mutasi titik ada beberapa metode. DNA target diamplifikasi menggunakan PCR menggunakan DNA polimerase seperti Taq polimerase yang banyak digunakan untuk amplifikasi. Tingkat kesalahan Taq polymerase adalah  $10^{-4}$  hingga  $10^{-5}$  per nukleotida dan sangat dipengaruhi oleh kondisi reaksi (seperti konsentrasi magnesium klorida dan dNTPs, pH, dan temperatur). Metode-metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi titik seperti DGGE/TGGE, SSCP, HET, RNaseA cleavage, CCM (*chemical cleavage method*), *enzyme mismatch cleavage* (EMC), dan lain-lain (Nollau *et al.*, 1997).

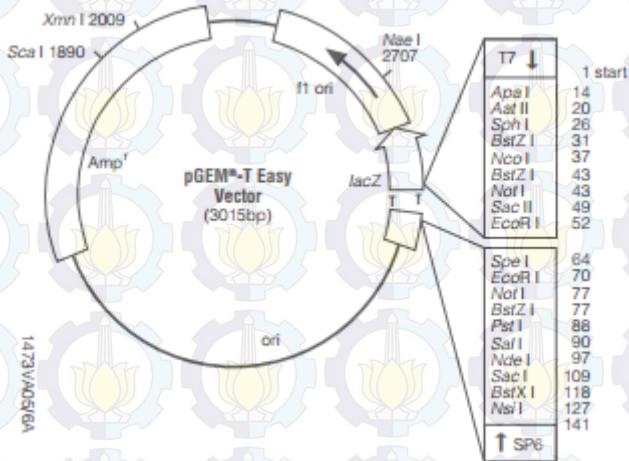
## 2.6 *Escherichia coli* DH5a

Strain dari bakteri *E.coli* DH5a tidak memiliki sifat patogen, dan dikembangkan secara khusus untuk kloning dalam laboratorium. Strain ini dibuat pertama kali oleh Doug Hanahan sebagai strain untuk kloning dengan beberapa mutasi yang dapat menambah efisiensi saat transformasi (Taylor *et al.*, 1993). Mutasi-mutasi tersebut adalah lacZ Delta M15: memungkinkan seleksi biru putih untuk sel rekombinan; endA1: mengurangi kemungkinan degradasi oleh endonuklease sehingga memastikan tingkat transfer plasmid yang lebih tinggi; recA1: mengurangi rekombinasi homolog agar *insert* lebih stabil (Togni *et al.*, 1988). Struktur genomik strain ini yaitu kromosom melingkar tunggal yang terdiri dari 4.686.137 nukleotida, 4.359 gen, dan 4.128 gen pengkode protein. Strain ini juga memiliki plasmid dan memiliki kemampuan untuk menerima plasmid insersi dengan baik. Strain *E.coli* ini dikembangkan di dalam laboratorium untuk prosedur kloning dalam laboratorium sehingga tidak memiliki habitat alami karena bakteri strain ini secara alami tidak ada di alam (Durfee *et al.*, 2008).

## 2.7 Vektor Plasmid (pGEM®-T)

Plasmid adalah molekul untai ganda berbentuk sirkuler yang dapat membelah dalam bakteri tanpa tergantung pada genom bakteri tersebut. Plasmid setidaknya tersusun atas titik awal replikasi (*ORI*

atau *origin of replication*), gen terpilih atau *selection gene* (yang umumnya gen resisten antibiotik), dan titik kloning atau *cloning site* untuk menginsersi DNA asing ke dalam plasmid. Vektor plasmid umumnya berukuran 2,5 hingga 5 kb panjangnya, tergantung karakteristik yang ditunjukkan. Karena ukuran plasmid tidak terbatas, pada prinsipnya, kita dapat mengkloning jumlah DNA berapa pun. Secara praktek, karena ukuran plasmid tidak terbatas, vektor plasmid umumnya digunakan untuk mengkloning fragmen hingga ukuran 5 kb panjangnya. Fragmen panjang juga dapat diinsersikan ke dalam plasmid, meskipun semakin panjang yang diinsersikan maka semakin sulit juga kloning dilakukan karena kemungkinan keberhasilannya semakin kecil (Mulhardt, 2007).



Gambar 2.3 Peta pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega Corporation, 2015).

Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T adalah suatu sistem yang efektif untuk mengkloning produk PCR. Plasmid ini memiliki T-overhang pada ujung 3' yang dapat meningkatkan efisiensi ligasi produk PCR ke dalam plasmid dengan mencegah resirkularisasi dan menyediakan

*overhang* yang kompatibel untuk produk PCR yang dihasilkan enzim polimerase termostabil tertentu (Promega Corporation, 2015).

## 2.8 PCR

*Polymerase Chain Reaction* atau PCR merupakan teknologi biokimia dalam bidang molekular yang digunakan untuk memperbanyak satu atau beberapa DNA menjadi banyak salinan dari urutan DNA tertentu. Dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1983, PCR sekarang menjadi teknik umum dan sangat sering diperlukan di laboratorium penelitian medis dan biologi untuk berbagai aplikasi (Bartlett *et al.*, 2003). Aplikasi ini termasuk kloning DNA untuk sekuensing, DNA berbasis filogeni, atau analisis fungsional gen, diagnosis penyakit keturunan, identifikasi DNA *fingerprint* (dalam ilmu forensik dan menguji paternitas), serta deteksi dan diagnosis penyakit menular (Mullis, 1993).

PCR digunakan untuk memperbanyak wilayah tertentu dari untai DNA (DNA target). Sebagian besar metode PCR biasanya memperbanyak fragmen DNA antara 0,1 dan 10 pasangan kilo basa (kb), meskipun beberapa teknik memungkinkan untuk amplifikasi fragmen dalam ukuran hingga 40 kb (Cheng *et al.*, 1994). Jumlah produk yang diamplifikasi ditentukan oleh substrat yang tersedia di reaksi, yang menjadi pembatas sebagai reaksi berlangsung (Carr *et al.*, 2012).

Persiapan PCR dasar memerlukan beberapa komponen dan reagen (Sambrook *et al.*, 2001). Komponen-komponen ini meliputi:

- a. DNA cetakan yang berisi wilayah DNA target yang harus diamplifikasi
- b. Dua primer yang komplementer terhadap ujung 3' pada masing-masing sense dan anti-sense dari untai DNA target
- c. Taq polymerase atau DNA polymerase lain dengan suhu optimum sekitar 70°C

- d. Deoxynucleoside triphosphates (dNTP, nukleotida yang mengandung gugus triphosphate) blok penyusun yang digunakan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA baru
- e. Larutan buffer, menyediakan lingkungan kimia yang cocok untuk aktivitas optimum dan stabilitas DNA polymerase
- f. Kation bivalen, magnesium atau ion mangan. Umumnya  $Mg^{2+}$  yang digunakan, tetapi  $Mn^{2+}$  dapat dimanfaatkan untuk mutagenesis DNA diperantarai PCR, konsentrasi  $Mn^{2+}$  lebih tinggi dapat meningkatkan kesalahan selama sintesis DNA
- g. Monovalen kation kalium ion

Langkah-langkah PCR yaitu inisiasi, denaturasi, *annealing*, elongasi, elongasi akhir, dan *hold* akhir. Langkah inisiasi terdiri dari pemanasan reaksi untuk suhu 94-96 ° C (atau 98°C jika polimerase yang digunakan sangat termostabil), yang dilakukan selama 1-9 menit. Hal ini hanya diperlukan untuk DNA polimerase yang memerlukan aktivasi panas dengan hot-start PCR. Langkah denaturasi adalah siklus reguler pertama dan terdiri dari reaksi pemanasan 94-98°C selama 20-30 detik. Hal ini menyebabkan DNA *melting* dari cetakan DNA dengan merusak ikatan hidrogen diantara basa-basa komplementer, menghasilkan molekul DNA beruntai tunggal (Sharkey *et al.*, 1994). Ketika langkah *annealing*, suhu diturunkan menjadi 50-65°C selama 20-40 detik memungkinkan proses *annealing* primer ke cetakan DNA beruntai tunggal. Biasanya suhu *annealing* adalah sekitar 3-5°C di bawah  $T_m$  (suhu *melting*) dari primer yang digunakan. Ikatan stabil hidrogen DNA-DNA hanya terbentuk ketika urutan primer sangat cocok dengan urutan cetakan. Polimerase akan mengikat primer dan cetakan dan mulai pembentukan DNA (Chien *et al.*, 1976). Suhu pada tahap elongasi ini tergantung pada DNA polimerase yang digunakan; Taq polymerase memiliki aktivitas optimum pada suhu 75-80°C, dan umumnya suhu 72°C digunakan dengan enzim ini. Pada langkah ini DNA polimerase mensintesis untai DNA baru yang komplementer dengan untai DNA cetakan dengan menambahkan dNTP yang sesuai template arah ujung 5 'ke 3', mengkondensasi gugus 5'-fosfat dari

dNTP dengan grup 3'-hidroksil di bagian akhir yang muncul pada untai DNA yang diperpanjang. Waktu pemanjangan tergantung, baik pada DNA polimerase yang digunakan dan pada panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Sebagai praktisnya, pada suhu optimal, DNA polimerase akan mempolimerisasi seribu basa per menit. Dalam kondisi optimum, yaitu, jika tidak ada keterbatasan karena membatasi substrat atau reagen, pada setiap langkah ekstensi, jumlah target DNA dua kali lipat, yang mengarah ke amplifikasi eksponensial (geometris) fragmen DNA spesifik (Lawyer *et al.*, 1993).

Langkah elongasi akhir, terkadang dilakukan pada suhu 70-74°C selama 5-15 menit setelah siklus PCR terakhir untuk memastikan bahwa setiap DNA beruntai tunggal yang tersisa sepenuhnya diperpanjang. Dan langkah terakhir adalah *hold*, yang dilakukan pada suhu 4-15°C untuk waktu yang tidak tertentu dan dapat digunakan untuk penyimpanan jangka pendek (Rychlik *et al.*, 1990).

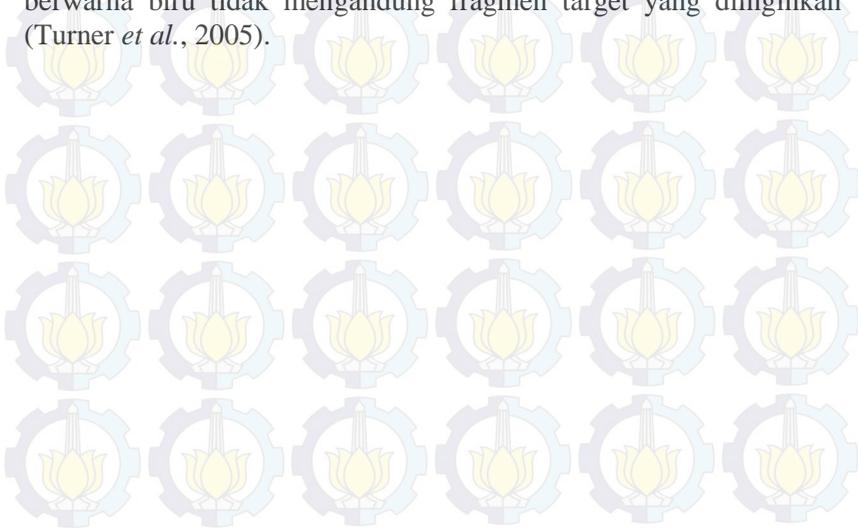
## 2.9 PCR-based Diagnostic

PCR digunakan untuk memperbanyak wilayah tertentu dari untai DNA (DNA target) (Cheng *et al.*, 1994). PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi biomarker pada kanker (Kristensen, 2009). Penggunaan PCR untuk kepentingan diagnostik dalam medis disebut juga *PCR-based diagnostic*. Kelebihan dari metode ini adalah biaya yang relatif murah dan efektif untuk prosedur pengujian tradisional (Yang dan Rothman, 2004). Salah satu contoh PCR yang digunakan sebagai diagnosa adalah allele-specific PCR yang mendiagnosa berdasarkan variasi nukleotida tunggal (Newton *et al.*, 1989).

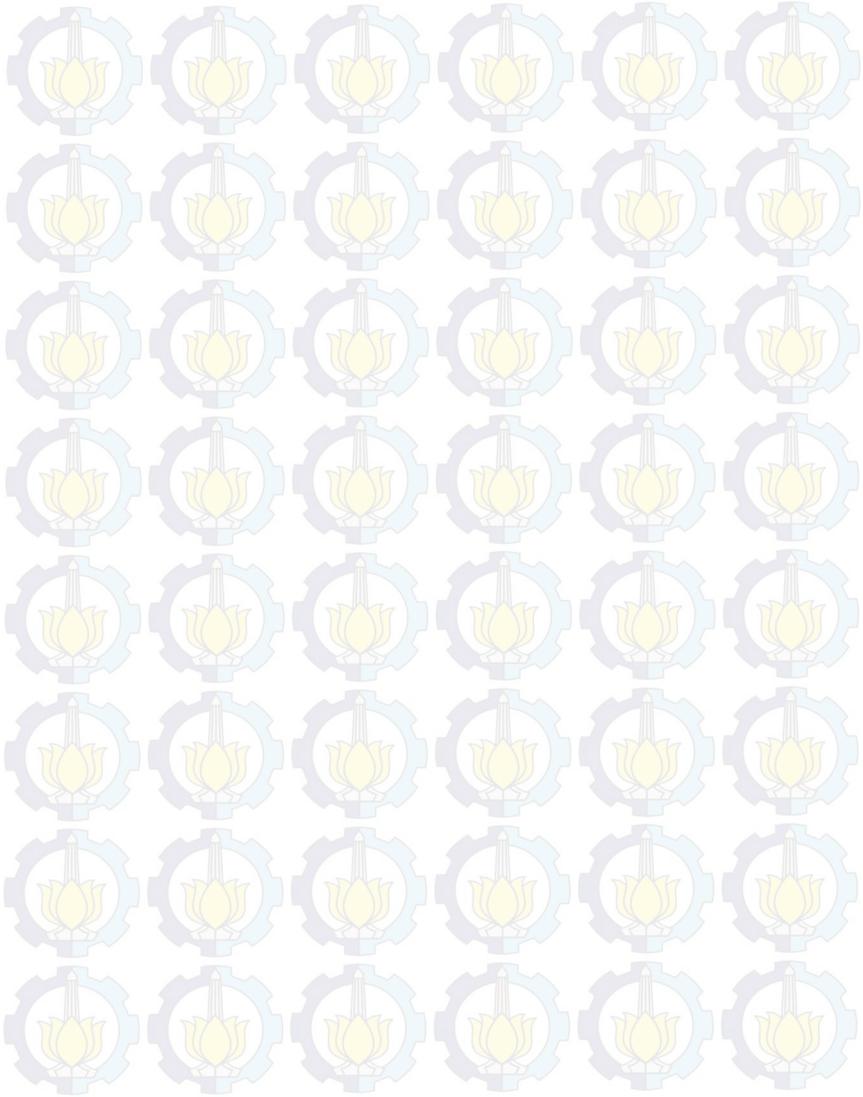
## 2.10 Seleksi Biru-Putih

Prosedur paling efisien dan umum digunakan untuk menyeleksi keberhasilan plasmid rekombinan, yang dapat dilakukan dalam satu cawan transformasi, adalah *blue-white screening* atau

seleksi biru-putih. Metode ini juga melibatkan inaktivasi dengan menginsersi gen dan menggunakan produksi senyawa yang berwarna biru sebagai indikator. Dalam kasus ini, gen *lacZ* yang mengkode enzim  $\beta$ -galactosidase, dikontrol melalui promoter *lac* (Turner *et al.*, 2005).  $\beta$ -galactosidase merupakan salah satu enzim yang digunakan untuk memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa dan secara normal dikode oleh *lacZ* pada kromosom *E. coli*. Beberapa strain *E. coli* memiliki gen *lacZ* yang termodifikasi, yaitu yang tidak memiliki segmen *LacZ*, disebut dengan *lacZ'* (Brown, 2010). Jika strain *E. coli* *host* tersebut mengekspresikan *repressor lac*, maka ekspresi gen *lacZ* pada vektor dapat diinduksi oleh *isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) dan enzim yang diekspresikan dapat memanfaatkan substrat sintesis *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside* (X-gal) yang menghasilkan produk berwarna biru. Inaktivasi dengan menginsersi pada *lacZ* pada produk plasmid rekombinan dapat mencegah terbentuk warna biru. Koloni berwarna putih tidak memiliki ekspresi  $\beta$ -galactosidase dan kemungkinan memiliki fragmen target yang telah diinsersikan, sedangkan yang berwarna biru tidak mengandung fragmen target yang diinginkan (Turner *et al.*, 2005).



**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan mulai April hingga Juli 2015 di Laboratorium Biologi Molekular Kesehatan dan Diagnostik, Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Bogor.

### **3.2 Metode yang Digunakan**

#### **3.2.1 Desain Primer dan Penambangan Data**

Penambangan data dilakukan untuk mencari lokasi mutasi titik yang terjadi di gen *PIK3CA*. Penambangan data ini dilakukan dengan cara mencari referensi dari literatur dan penelitian terkait. Dari studi literatur tersebut didapatkan bahwa mutasi titik terjadi pada ekson 1, 4, 7, 9, dan 20 (Bachman *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2014; Rudd *et al.*, 2011; Loibl *et al.*, 2014; Mangone *et al.*, 2012). Dari kelima ekson tersebut, akan dibuat rekombinan dari ekson 1, 4, dan 20. Data sekuens ekson-ekson tersebut selanjutnya digunakan untuk mendesain primer. Sekuens tersebut dapat diakses di NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Urutan awal sekuens digunakan untuk mendesain *forward primer* dan urutan akhir sekuens digunakan untuk mendesain *reverse primer* dengan panjang masing-masing kurang lebih sebanyak 20 nukleotida. Hasil primer yang telah didesain tersebut dicek menggunakan Oligo Calc (<http://simgene.com/OligoCalc>) untuk mencegah terbentuknya dimer dan struktur *hairpin loop*. Kemudian primer yang telah didesain dipesan dari PT. Genetika Science.

Tabel 3.1 Primer yang Akan Digunakan

Ekson	Orientasi	Primer
1	<i>Forward</i> (5' ke 3')	GTT TCT GCT TTG GGA CAA CCA TAC
	<i>Reverse</i> (3' ke 5')	CAA TTT CTC GAT TGA GGA TCT TTT
4	<i>Forward</i> (5' ke 3')	GCT GTA TAA TGC TTG GGA GG
	<i>Reverse</i> (3' ke 5')	CTT ATC AAT GTC TCG AAT ATT TAC
20	<i>Forward</i> (5' ke 3')	TTT TTT CCT TCT CCA TCA TTT CTA
	<i>Reverse</i> (3' ke 5')	GTT TCA GGA GAT GTG TTA CAA

### 3.2.2 Pembuatan Buffer TAE 1X

Untuk membuat buffer TAE (Tris-hidroksimetil-aminometana, asam asetat glasial, dan EDTA) 1X, digunakan rumus pengenceran  $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ . Sehingga untuk mendapatkan larutan TAE dengan pengenceran 1X, ke dalam botol Schott dimasukkan 20 ml TAE 50X dan ditambahkan aquabides hingga 1.000 ml, kemudian dihomogenkan.

### 3.2.3 Pembuatan Agarose

Bubuk agarose ditimbang dengan menggunakan neraca analitik sesuai ukuran (1 gram untuk membuat 1% gel agarose, 1,5 gram untuk membuat 1,5% gel agarose) lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan larutan buffer TAE 1X yang telah disiapkan sebelumnya sebanyak 100 ml. Lalu dimasukkan *magnetic stirring bar* ke dalam erlenmeyer dan dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate stirrer*. Ditunggu hingga larutan menjadi tidak berwarna dan hampir mendidih. Setelah agak mendidih, diangkat, dan ditunggu hingga suhunya hangat kuku. Untuk mempercepat penurunan suhu, bagian bawah erlenmeyer dialiri dengan air mengalir. Sementara menunggu, bagian ujung penyangga sisir cetakan *well* ditambahkan *tissue* agar *well* yang terbentuk tidak terlalu dalam. Setelah suhu larutan hangat kuku, larutan agarose dituangkan ke dalam cetakan dan segera dipasang sisir cetakan *well*-nya. Lalu ditunggu hingga agarose mengeras.

### 3.2.4 Isolasi DNA Genomik Jaringan Kanker Payudara

Sampel jaringan kanker payudara merupakan koleksi Laboratorium Biologi Molekuler Kesehatan dan Diagnostik, Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Kultur kanker payudara yang berasal dari pasien A yang telah disimpan dalam *freezer* diambil dan diletakkan di es batu. Jaringan kanker payudara dipotong dan diambil secukupnya lalu diletakkan ke dalam *tube* 1,5 ml yang telah dilabeli “A” dan dilisiskan menggunakan PureLink® Lysate-Mini Kit yang terdiri dari PureLink® Genomic Digestion Buffer, Proteinase K, RNase A, dan PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer. Potongan jaringan dimasukkan ke dalam *tube* yang steril lalu ditambahkan PureLink® Genomic Digestion Buffer sebanyak 180 µl dan Proteinase K 20 µl ke dalam *tube* tersebut. *Tube* dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu 55°C. Setelah 2 jam, *tube* disentrifugasi dengan cara menekan “Pulse” selama beberapa detik, kemudian supernatan dipindahkan ke dalam *tube* baru yang steril. Kemudian ditambahkan RNase A sebanyak 20 µl lalu diinkubasi selama 2 menit dengan suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer sebanyak 200 µl dan etanol 96% sebanyak 200 µl ke dalam *tube* lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 23°C selama 3 menit. Kemudian supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam Spin Column® *tube*. Spin Column® *tube* tersebut lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 23°C selama 3 menit. Cairan pada bagian bawah *tube* dibuang lalu ditambahkan Wash Buffer 1 sebanyak 500 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan, suhu, dan waktu yang sama seperti sebelumnya. Setelah disentrifugasi, cairan pada bagian bawah Spin Column® *tube* dibuang dan Spin Column® *tube* dipasang kembali. Selanjutnya ditambahkan Wash Buffer 2 sebanyak 500 µl ke dalam Spin Column® *tube* tersebut dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan, suhu, dan waktu yang sama seperti sebelumnya. Cairan bagian bawah Spin Column® *tube* dibuang dan Spin Column® *tube* dipasang kembali. Kemudian *tube* disentrifugasi kembali

dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 23°C selama 7 menit. Lalu cairan dalam Spin Column® tube dipindahkan ke dalam tube baru yang steril berukuran 1,5 ml dan diberi label “A”. ke dalam tube tersebut ditambahkan *nuclease-free water* sebanyak 200 µl. Dan diinkubasi selama 3 menit dengan suhu ruang. Kemudian tube disentrifugasi kembali selama 3 menit dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 23°C sehingga didapatkan DNA genomik murni. Lalu tube diletakkan ke dalam *ice box*.

### **3.2.5 Uji Kualitatif DNA Genomik Jaringan Kanker dengan Agarose Electrophoresis**

Agarose 1% dimasukkan ke dalam elektroforesis dan larutan *buffer* TAE dituangkan ke dalam elektroforesis hingga seluruh bagian agarose agak tenggelam. *Loading dye* ThermoScientific diambil dengan menggunakan pipet mikro dan diletakkan di atas parafilm secukupnya. Kemudian sebanyak 2 µl DNA Ladder 1kB diambil dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam *well* pertama pada agarose. *Loading dye* ditambahkan 5 µl DNA dari tube berlabel “A”, diresuspensi, dan dimasukkan ke dalam *well* kedua pada agarose. Kemudian elektroforesis di *run* dan ditunggu selama 40 menit. Setelah selesai, agarose direndam dalam larutan Ethidium Bromide (EtBr) selama 5 menit. *UV-transilluminator* dibersihkan dengan alkohol 98%. Tempat untuk meletakkan agarose dibasahi dengan alkohol 98% dan ditutup dengan plastik *wrap*. Setelah agarose direndam selama 5 menit, agarose diletakkan di atas *UV-transilluminator* yang telah dilapisi dengan plastik *wrap*. *UV-transilluminator* dinyalakan dan dilihat pita pada agar. Jika pita masih belum terlihat jelas, ditunggu dulu selama 5 menit. Hasil yang jelas dapat didokumentasikan.

### **3.2.6 Amplifikasi Gen *PIK3CA* dan Uji Konfirmasinya**

Proses amplifikasi dilakukan sebanyak dua kali, untuk optimasi suhu *annealing* primer dan *scale up*. Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk PCR dikeluarkan dari *freezer* dan dicairkan dengan *thawing*. Tiga buah tube 0,2 ml disiapkan dan diberi label sesuai

ekson yang akan diamplifikasi. Reaksi PCR untuk optimasi suhu *annealing* dilakukan dengan menyiapkan sebanyak 12,5  $\mu\text{L}$  DreamTaq Green PCR Polymerase, *Forward primer* sebanyak 0,25  $\mu\text{L}$ , *Reverse primer* sebanyak 0,25  $\mu\text{L}$ , MilliQ *nuclease-free water* sebanyak 5,5  $\mu\text{L}$ , dan DNA genomik sebagai *template* sebanyak 0,25  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam masing-masing *tube* 0,2 ml dengan menggunakan pipet mikro. Kemudian *tube* dihomogenkan dengan *tapping*, lalu di *spin down*. Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: *pre heat* dengan suhu 95°C selama 5 menit, *denaturation* dengan suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* dengan gradient suhu 50-60°C selama 30 detik, *extension* dengan suhu 72°C selama 30 detik, *completion* dengan suhu 8°C, *top heat* dengan suhu 103°C. Lalu “View Gradient Temperature” diklik untuk melihat suhu dan dimana *tube* harus diletakkan, kemudian “Experiment” diklik dan diatur volume yang dipakai (25  $\mu\text{L}$ ). Setelah itu “Start Run” diklik hingga PCR panas sesuai suhu *top heat*. Setelah mencapai suhu *top heat*, ditunggu hingga suhu  $\pm 60^\circ\text{C}$  dan diklik “Pause”, tutup dibuka dan *tube* 0,2 ml tersebut diletakkan. Tutup PCR ditutup dan diklik “Start” sehingga proses PCR berjalan. Setelah proses PCR selesai, tutup dibuka, dan *tube* diambil, lalu diletakkan pada *ice box* untuk selanjutnya diuji kualitatif dengan menggunakan agarose elektroforesis. Selanjutnya PCR didinginkan dengan cara mengatur suhunya hingga 25°C.

Cara kerja uji kualitatif hasil PCR sama dengan uji kualitatif genom. Namun *marker* yang digunakan adalah GeneRuler 1kb plus sebanyak 4  $\mu\text{L}$  dan konsentrasi agarose yang digunakan adalah 1,5%, sedangkan volume sampel hasil PCR yang dipakai adalah 5  $\mu\text{L}$ . Hasil yang didapatkan divisualisasikan dengan *UV-transilluminator* dan dari visualisasi tersebut dipilih *band* yang paling tebal untuk selanjutnya setelah optimasi suhu *annealing* dilakukan PCR kembali dengan suhu *annealing* paling optimal untuk *scale up*.

### 3.2.7 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan Wizard SV<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-Up System. Sebanyak 45  $\mu\text{L}$  hasil PCR

dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml lalu ditambahkan 45  $\mu\text{l}$  *membrane binding solution* dan diresuspensi. Kemudian campuran tersebut dipindahkan ke dalam *mini column*. Disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 22°C selama 3 menit. Cairan yang terdapat pada *collection tube* dibuang dan ditambahkan 700  $\mu\text{l}$  *membrane wash solution* ke dalam *mini column*. *Mini column* disentrifugasi dengan kecepatan, suhu, dan waktu yang sama dengan yang sebelumnya. Cairan yang terdapat pada *collection tube* dibuang dan ditambahkan 500  $\mu\text{l}$  *membrane wash solution* ke dalam *mini column*. *Mini column* disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 22°C selama 3 menit. Cairan yang terdapat pada *collection tube* dibuang lalu *collection tube* dipasang kembali. Selanjutnya *mini column* disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 22°C selama 5 menit kemudian supernatan dibuang. Perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Selanjutnya ke bagian tengah *mini column* ditambahkan *nuclease-free water* sebanyak 35  $\mu\text{l}$ . Penambahan ini berfungsi untuk mengelusi hasil amplifikasi gen yang menempel pada *silica gel*.

Selanjutnya hasil purifikasi produk PCR diuji kualitatif dengan menggunakan agarose elektroforesis. *Marker* yang digunakan adalah 1kb plus dan konsentrasi agarose yang digunakan adalah 1,5%. Kemudian hasil purifikasi tersebut divisualisasikan dengan menggunakan *UV-transilluminator*. Hasil visualisasi yang didapatkan dapat didokumentasikan. Jika hasil visualisasi menunjukkan *band* yang tebal, maka produk PCR dapat dilanjutkan ke tahap ligasi.

### 3.2.8 Ligasi Produk PCR ke dalam pGEM®-T

*Tube* berisi hasil produk PCR dan *tube* berisi plasmid pGEM®-T disentrifugasi selama 5 detik dengan menekan tombol "Pulse". *Tube* 2X Rapid Ligation Buffer dihomogenkan dengan *vortex* kemudian disentrifugasi selama 5 detik dengan menekan tombol "Pulse". Lalu sebanyak 7,5  $\mu\text{l}$  2X Rapid Ligation Buffer, 1  $\mu\text{l}$  pGEM®-T, 5  $\mu\text{l}$  produk PCR, 0,5  $\mu\text{l}$  air terdeionisasi, dan 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase dimasukkan ke dalam *tube* berukuran 0,2 ml.

Campuran tersebut diresuspensi menggunakan pipet dan diinkubasi selama satu jam dalam suhu ruang.

### **3.2.9 Pembuatan Medium**

#### **3.2.9.1 Medium Luria Bertani (LB) Cair**

Sebanyak 1,5 gr *Bacto tryptone*, 0,75 gr *yeast extract*, dan 0,75 gr NaCl ditambah dengan 150 ml akuades dan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah selesai disterilisasi dengan autoklaf, medium yang sudah hangat kuku dapat langsung ditambahkan ampicillin dengan perbandingan 1 ml medium : 1 µl ampicillin.

#### **3.2.9.2 Medium Luria Bertani (LB) Padat**

Sebanyak 1 gr *Bacto trypton*, 1,5 gr *bacto agar*, 0,5 gr NaCl, dan 0,5 gr *yeast extract* dimasukkan ke dalam botol Schott dan ditambahkan 100 ml akuades. Medium disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Kemudian medium didiamkan pada suhu ruang hingga tidak terlalu panas dan dapat ditambahkan ampicillin, IPTG dan X-Gal untuk seleksi biru-putih.

#### **3.2.10 Preparasi Sel Bakteri Kompeten**

Sel bakteri *Escherichia coli* DH5α diambil dari freezer -80°C diinokulasikan ke dalam medium LB sebanyak 5 ml dan diinkubasi selama satu malam. Kemudian dari kultur dipindahkan ke dalam 50 ml medium LB cair dan bakteri dikulturkan dan ditunggu hingga OD (*optical density*) kultur mencapai 0.5 - 0.6 pada 600 nm (kira-kira selama 2 jam). Lalu kultur diinkubasi dalam *box* berisi es selama 15 menit. Kultur diambil sebanyak 1,5 ml dan dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml sebanyak 10 *tube* kemudian disentrifugasi selama kurang lebih 10 menit dengan kecepatan 3.000 rpm dan suhu 4°C. Bagian supernatan dibuang dan pelet diresuspensi ke dalam 1,5 ml 0.1 M MgCl<sub>2</sub> yang telah didinginkan dengan es batu dan diresuspensi dengan hati-hati. Selanjutnya sel disentrifugasi kembali selama 15

menit dengan kecepatan 3.000 rpm dan suhu 4°C. Bagian supernatan dibuang dan sel diresuspensi ke dalam 750 µl CaCl<sub>2</sub> 0.1 M yang telah didinginkan dengan es batu kemudian sel diinkubasi selama 20 menit di dalam *box* berisi es batu. Selanjutnya sel disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C kemudian supernatan dibuang. Sel kemudian diresuspensi ke dalam 75 µl CaCl<sub>2</sub> 0.1 M dan 5 µl gliserol 80%, kemudian suspensi dipindahkan ke dalam *tube* 1,5 ml. Selanjutnya sel bakteri *E. coli* DH5α kompeten disimpan dalam *freezer* dengan suhu -80°C. Sebanyak 3 *tube* sel bakteri kompeten di *streak* pada medium LB padat, LB padat dengan kanamycin, dan LB padat dengan ampicillin.

### 3.2.11 Transformasi Sel Bakteri Kompeten

Sel bakteri kompeten *Escherichia coli* strain DH5α dari *freezer* dengan suhu -80°C dan dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml. *Tube* diletakkan didalam *box* berisi es batu. Sebanyak 10 µl hasil ligasi dan 100 µl sel bakteri *E.coli* DH5α kompeten dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml, diresuspensi, dan diinkubasi di dalam *box* berisi es selama 30 menit. Selanjutnya bakteri dan plasmid diberi perlakuan *heat shock* dengan cara dipanaskan dalam wadah berisi air panas dengan suhu 42°C selama 90 detik. Kemudian segera *tube* dimasukkan ke dalam *box* berisi es batu selama kurang lebih 5 menit. Selanjutnya ke dalam *tube* ditambahkan medium LB cair sebanyak kurang lebih 400 µl. Selanjutnya *tube* digoyangkan selama 2 jam dengan menggunakan *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 37°C. Lalu *tube* diletakkan di dalam *box* berisi es dan segera dilakukan seleksi biru-putih.

### 3.2.12 Seleksi Biru-Putih

Sebanyak 100 µl (10 mg/µl) ampicillin, 100 µl (80 µg/ml) larutan X-Gal Thermo Scientific, dan 100 µl (0.5 mM) larutan IPTG Thermo Scientific ditambahkan ke dalam 100 ml medium LB padat yang telah diautoklaf yang masih cair dan hangat kuku, setelah itu dihomogenkan dengan cara dikocok dan dituang ke cawan Petri (kira-kira 20 ml per cawan). Seluruh proses penuangan dan

penambahan ampicillin, larutan X-Gal, dan larutan IPTG dilakukan di dalam *laminar air flow*. Kemudian medium didiamkan pada suhu ruang hingga medium mengeras. Sel bakteri transforman masing-masing sebanyak 100  $\mu\text{l}$  dan 50  $\mu\text{l}$  dituangkan ke dalam medium LB yang telah ditambahkan X-Gal dan IPTG dalam keadaan steril kemudian diratakan dengan menggunakan Drigalski steril. Setelah rata, cawan Petri disegel dengan plastik *wrap* dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama satu malam. Koloni bakteri yang positif berisi plasmid rekombinan akan berwarna putih sedangkan bakteri yang negatif akan berwarna biru. Koloni putih kemudian dipisahkan ke cawan Petri baru yang telah diberi petak dan nomor.

### 3.2.13 PCR Koloni

Sebanyak 5,5  $\mu\text{l}$  *nuclease-free water*, 0,25  $\mu\text{l}$  *forward primer*, 0,25  $\mu\text{l}$  *reverse primer*, dan 6,25  $\mu\text{l}$  DreamTaq DNA Polymerase dimasukkan ke dalam *tube* 0,2 ml. *Forward primer* dan *reverse primer* yang digunakan adalah primer yang sama untuk mengamplifikasi gen *PIK3CA* (Tabel 3.1). Total volume campuran adalah 12,5  $\mu\text{l}$ . Lalu koloni sel bakteri kompeten yang berwarna putih diambil sedikit dengan tusuk gigi steril dan digunakan sebagai templat PCR. Masing-masing *tube* diberi label sesuai dengan nomor koloni di cawan Petri. *Tube* dihomogenkan dengan *vortex* dan disentrifugasi selama 5 detik. Selanjutnya *tube* dimasukkan ke dalam *thermal cycler* (Kyratec PCR Thermal Cycler). Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: *pre heat* dengan suhu 95°C selama 5 menit, *denaturation* dengan suhu 95°C selama 30 detik, suhu *annealing* disesuaikan dengan suhu optimal masing-masing ekson selama 30 detik, *extension* dengan suhu 72°C selama 30 detik, *completion* dengan suhu 8°C, *top heat* dengan suhu 103°C.

Selanjutnya hasil PCR diuji kualitatif dengan menggunakan agarose elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan agarose 1% dan *marker* GeneRuler 1kb plus sebanyak 4  $\mu\text{l}$ . Hasil visualisasi PCR koloni yang paling tebal diinokulasi ke dalam 5 ml medium LB cair yang telah ditambahkan 5  $\mu\text{l}$  ampicillin dengan menggunakan pipet

*tip.* Kemudian inokulum diinkubasi selama satu malam pada *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 37°C.

### 3.2.14 Ekstraksi Plasmid

Ekstraksi plasmid dilakukan menggunakan *High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)*. Sebanyak 1,5 ml sel transforman dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 1 menit. Supernatan dibuang lalu dimasukkan 1,5 ml sel transforman lagi ke dalam *tube* tersebut. Lalu *tube* disentrifugasi kembali dengan kecepatan, suhu, dan waktu yang sama kemudian supernatan dibuang kembali. Lalu pelet diresuspensi dengan 200 µl *PD1 Buffer* dan dihomogenkan dengan vortex. Campuran tersebut ditambahkan 200 µl *PD2 Buffer* lalu dicampur dengan cara membolak-balikkan *tube* secara perlahan sebanyak 10 kali dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ke dalam *tube* tersebut ditambahkan 300 µl *PD3 Buffer* lalu dicampur dengan cara membolak-balikkan *tube* secara perlahan sebanyak 10 kali dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 3 menit. Lalu supernatan dipindahkan ke dalam *PD Column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 30 detik. Cairan dalam *collection tube* dibuang. Kemudian sebanyak 400 µl *WI Buffer* ditambahkan ke dalam *PD Column* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 30 detik. Cairan dalam *collection tube* dibuang. Selanjutnya sebanyak 600 µl ditambahkan *Wash Buffer* ke dalam *PD Column* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 30 detik. Cairan dalam *collection tube* dibuang dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 3 menit. Cairan dalam *collection tube* dibuang dan ditambahkan sebanyak 35 µl *Elution Buffer* di bagian tengah *PD Column* lalu diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Selanjutnya *tube* disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C selama 2 menit.

Hasil ekstraksi plasmid diuji kualitatif dengan menggunakan agarose elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan agarose 1,5%

dan *marker* GeneRuler 1kb sebanyak 4  $\mu$ l. Kemudian agarose divisualisasi dengan menggunakan *UV-transilluminator*. Hasil visualisasi yang didapatkan dapat didokumentasikan. Jika hasil visualisasi yang didapatkan sesuai dengan data ukuran plasmid pGEM<sup>®</sup>-T (Promega, 2010) dan data ukuran panjang ekson 1, 4, dan 20 *PIK3CA* dari NCBI, maka hasil ekstraksi plasmid diamplifikasi untuk memperbanyak gen.

### 3.2.15 PCR Plasmid

Plasmid yang didapatkan dari ekstraksi menggunakan *High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)* diamplifikasi dengan PCR *thermal cycler*. Sebanyak 10,5  $\mu$ l *nuclease-free water*, 0,5  $\mu$ l *forward primer*, 0,5  $\mu$ l *reverse primer*, 12,5  $\mu$ l DreamTaq DNA Polymerase, dan hasil ekstraksi plasmid sebagai *template* sebanyak 1  $\mu$ l dimasukkan ke dalam *tube* 0,2 ml. Total volume campuran adalah 25  $\mu$ l. Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: *pre heat* dengan suhu 95°C selama 5 menit, *denaturation* dengan suhu 95°C 30 detik, *annealing* disesuaikan dengan suhu optimal masing-masing ekson selama 30 detik, *extension* dengan suhu 72°C selama 30 detik, *completion* dengan suhu 8°C, *top heat* dengan suhu 103°C.

Selanjutnya hasil PCR plasmid divisualisasi dengan menggunakan agarose elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan agarose 1,5% dan *marker* GeneRuler 1kb plus sebanyak 4  $\mu$ l. Lalu hasil PCR plasmid tersebut divisualisasikan dengan menggunakan *UV-transilluminator*. Hasil visualisasi yang didapatkan dapat didokumentasikan.

### 3.2.16 Sekuensing

Pembacaan basa nukleotida penyusun gen target dilakukan dengan menggunakan mesin Applied Biosystem<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer yang akan dilakukan oleh PT. Genetika Science berdasarkan metode Sanger (Sanger *et al*, 1977). DNA polimerase yang digunakan (*Taq* polimerase) mensintesis fragmen asam nukleat berpendar (penggabungan antara dideoksinukleotida dengan rhodamin) yang dipisahkan dengan elektroforesis kapiler. Hasil

sekuensing yang didapatkan akan berupa *file* yang akan di-BLAST dalam *database* NCBI untuk mengkonfirmasi bahwa plasmid sudah mengandung *insert* yang diinginkan serta mengetahui adanya mutasi.

### 3.2.17 Pembuatan Stok Gliserol

Jika hasil sekuensing menunjukkan hasil yang positif mengandung *insert*, maka bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  kompeten yang mengandung plasmid pGEM<sup>®</sup>-T dan ekson yang diinginkan disimpan dengan cara membuat stok gliserol. Sebanyak 250  $\mu$ l bakteri *E.coli* DH5 $\alpha$  kompeten yang telah mengandung *insert* dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml yang telah diberi label. Kemudian ditambahkan 750  $\mu$ l gliserol 80% dan disimpan dalam *freezer* -80°C.

### 3.3 Analisa Data

Analisa data dilakukan secara deskriptif kualitatif yaitu meliputi:

1. Pengamatan koloni bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  positif mengandung *insert* (*white colony*)
2. Konfirmasi hasil penelitian dilakukan berturut-turut dengan metode seleksi biru-putih, PCR koloni, ekstraksi plasmid rekombinan, PCR plasmid rekombinan, dan sekuensing.
3. Hasil sekuensing di analisa dengan BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*).