

Determinasi Rentang Konsentrasi Sampel untuk Analisis Genomik dan Proteomik: Implikasi Sensitifitas Deteksi Molekuler

Determination of Sample Concentration Ranges for Genomic and Proteomic Analysis: Implications of the Sensitivity of Molecular Detection

Rista Nikmatu Rohmah¹, Lidwina Faraline Triprisila¹

¹Laboratorium Biologi Molekuler, Institut Biosains, Universitas Brawijaya, Malang 65145, Indonesia

Abstrak

Analisis molekular genomik dan proteomik merupakan dua bidang penelitian yang berfokus pada pemahaman tentang struktur, fungsi, dan interaksi molekul dalam genom dan proteom suatu organisme. Penentuan rentang konsentrasi ini dilakukan agar dapat mengidentifikasi deteksi molekuler secara akurat. Metode yang dilakukan menggunakan sampel DNA dari darah dan protein serum dari tikus normal (*Rattus norvegicus*). Sampel DNA diencerkan pada rentang 25- 100(ng/ul) kemudian dirunning menggunakan gel agarose dan real time PCR CFX96 (Biorad). Sampel protein diencerkan pada rentang 0,5-12(mg/ml) kemudian dirunning menggunakan SDS PAGE-Vertical Electrophoresis Tetracell (Biorad). Sensitivitas analisis genomik menggunakan real time ditentukan pada hasil Cq, Melt Curve dan Melt Peak, sedangkan analisis proteomik ditentukan berdasarkan kualitas pemisahan profil pita protein dan ukuran jarak perpindahan (Rf) yang jelas. Hasil penentuan konsentrasi analisis genomik terbaca secara optimal berada pada rentang konsentrasi 50-100(ng/ul) sedangkan analisis proteomik berkisar pada rentang konsentrasi 1-5(mg/ml). Lebih lanjut, diharapkan penelitian determinasi ini dapat dicoba pada jenis sampel yang lain untuk sensitivitas deteksi molekuler.

Kata Kunci : Determinasi, Molekuler, Real Time PCR, SDS-PAGE, Sensitivitas

Abstract

Molecular analysis, genomics and proteomics are two fields of research that focus on understanding the structure, function and interactions of molecules in the genome and proteome of an organism. Determination of this concentration range is carried out in order to accurately identify molecular detection. The method used uses DNA samples from blood and serum proteins from normal mice (*Rattus norvegicus*). DNA samples were diluted in the range of 25-100(ng/ul) then run using agarose gel and real time PCR CFX96 (Biorad). Protein samples were diluted in the range of 0.5-12(mg/ml) then run using SDS PAGE-Vertical Electrophoresis Tetracell (Biorad). The sensitivity of genomic analysis using real time is determined by the results of Cq, Melt Curve and Melt Peak, while proteomic analysis is determined based on the quality of protein band profile separation and a clear measure of the displacement distance (Rf). The results of determining the concentration of genomic analysis are optimally read in the concentration range of 50-100(ng/ul) while the proteomic analysis ranges in the concentration range of 1-5(mg/ml). Furthermore, it is hoped that this determination research can be tried on other types of samples for molecular detection sensitivity.

Keywords : Determination, Molecular, Real Time PCR, SDS-PAGE, Sensitivity

1. Pendahuluan

Analisis Molekular Genomik adalah studi tentang genom suatu organisme, yang merupakan kumpulan lengkap dari semua informasi genetik yang dimiliki oleh organisme. Genom mencakup semua urutan DNA yang mengkode protein dan bagian non-koding lainnya sedangkan analisis proteomik merupakan studi tentang profil lengkap dari semua protein yang dihasilkan oleh sel atau organisme pada kondisi tertentu. Ini melibatkan analisis ekspresi, struktur, fungsi, dan regulasi protein dalam sistem biologis. Analisis molekuler memiliki peran yang sangat penting dalam

penentuan sensitivitas deteksi molekuler, dengan memberikan pendekatan ilmiah yang mendalam untuk mengidentifikasi, mengukur, dan memahami batas terendah di mana suatu metode atau alat dapat mendeteksi molekul target.

Sensitivitas deteksi molekuler yang tinggi sangat penting dalam memastikan bahwa penelitian dan aplikasi di bidang biologi molekular menghasilkan hasil yang akurat, terpercaya, dan relevan. Sebagai aplikasinya dari penentuan konsentrasi dalam analisis genomik dan proteomik antara lain untuk Identifikasi dan kuantifikasi ekspresi gen dalam analisis genomik, deteksi mutasi genetik yang langka dalam analisis genetik dan diagnostik penyakit, Identifikasi protein dalam analisis proteomik dan deteksi dan pemantauan penyakit infeksius, seperti deteksi virus atau bakteri dalam sampel klinis serta Identifikasi kontaminan dalam makanan atau lingkungan. Maka dari itu pentingnya penelitian ini dilakukan adalah untuk menjembatani penentuan metode deteksi dan interpretasi hasil deteksi molekular secara akurat.

2. Bahan dan Metode

2.1. Analisis SDS PAGE

2.1.1 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu serum dari tikus (*Rattus norvegicus*). Persiapan sampel dilakukan dengan menambahkan sampel buffer ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1). Dipanaskan sampel pada suhu 100oC selama 5 menit

2.1.2 Persiapan Separating Gel dan Stacking Gel

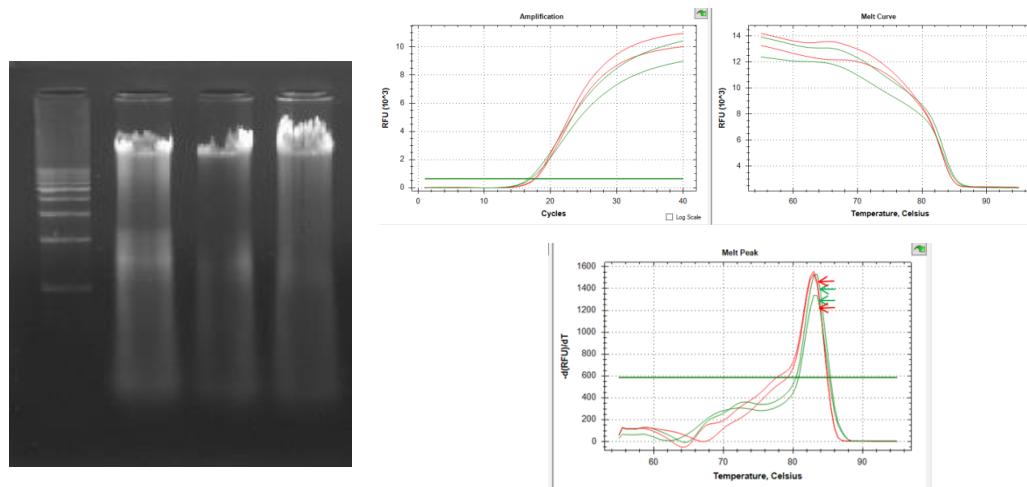
□ Persiapan Separating Gel dan Stacking Gel (Mini-PROTEAN® Tetra cell System by BIORAD). Membuat separating gel 12,5 % dengan cara Disiapkan tabung propileh 50 mL , 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung, 2,75 ml 1 M Tris pH 8,8, tabung ditutup dan digoyang perlahan, aquabides 1,505 ml tabung ditutup dan digoyang perlahan, 75 uL SDS10 % tabung ditutup dan digoyang perlahan, 75 uL APS 10 % tabung ditutup dan digoyang perlahan, 6,25 uL TEMED tabung ditutup dan digoyang perlahan kemudian ituang kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 mL (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung). Secara perlahan ditambahkan aquades diatas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang. Dibiarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan) diantara batas air dan gel yang terbentuk. Setelah itu, buang air yang menutup separating gel. Sesudah separating gel memadat. Disiapkan stacking gel 3 % dengan cara yang sama seperti prosedur no. 2 diatas , dengan volume larutan sebagai berikut : Bisakrilamida 30%0,45 mL, terdiri dari 1 M Tris pH 6,8 0,38 mL, Aquabides 2,11 mL, SDS 10 % 30 uL , APS 10 % 30 uL dan TEMED 5 uL. Running buffer di tuang dalam gel box kemudian plate Separating dan Stacking gel yang sudah memadat dalam plate kaca di letakkan pada running module, Sampel protein kemudian dimasukkan ke dalam gel melalui ujung atas stacking gel sebanyak 20 uL/ sumur lalu dirunning pada plate 1 dengan tegangan 100 V, selama 45 menit

2.1.2 Real time PCR

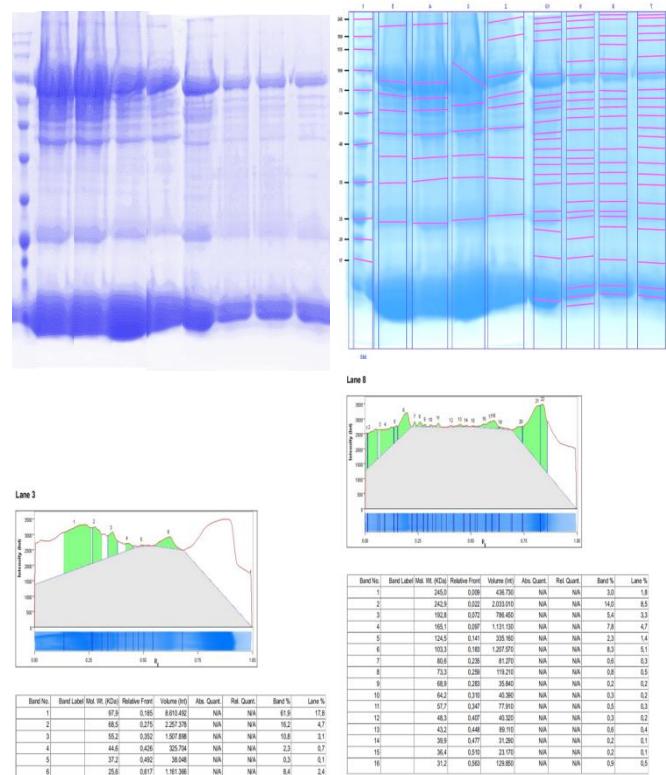
Analisis ekspresi mRNA menggunakan kit SensiFast SYBR™ No-ROX Kit. Amplifikasi gen target menggunakan primer GAPDH. Komponen reagen realtime terdiri dari 2x SensiFast SYBR® No-ROX mix, 10uM primer Forward, 10uM primer Reverse, nuclease free water, dan DNA template. Komponen reagen realtime dirunning menggunakan Bio-Rad CFX96 Real Time PCR Systems. Siklus yang digunakan untuk primer Per2 dan P75NTR sebagai berikut : Aktivasi enzim 95C 2 menit, denaturasi 95C selama 5 detik, annealing pada suhu 60C selama 30 detik, siklus selama 40 siklus. Siklus yang digunakan untuk primer BDNF sebagai berikut : Aktivasi enzim 95C 2 menit, denaturasi 95C selama 5 detik, annealing pada suhu 52C selama 30 detik, siklus selama 40 siklus. Nilai Fold Change (Level Ekspresi gen) dihitung dengan menggunakan metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3. Hasil dan Pembahasan

DNA darah yang diisolasi dari hewan coba tikus diuji secara kualitatif menggunakan gel agarose 1% dan diukur menggunakan real time PCR CFX96. Pada gel agarose menunjukkan profil pita DNA yang sama dengan konsentrasi 25, 50 dan 100(ng/ul), akan tetapi pada saat dirunning menggunakan real time PCR menunjukkan adanya kualitas peak yang berbeda. Sampel dengan rentang konsentrasi 50 dan 100 ng/ul (peak merah) relatif lebih optimal dan lebih jelas dibandingkan dengan sampel yang mempunyai konsentrasi 25 ng/ul. Penentuan konsentrasi ini sangatlah penting untuk penentuan Cq pada setiap sampel dengan menyamakan konsentrasi untuk keberhasilan real time PCR (Setyawati & Zubaidah, 2021)



Gambar 1. Profil Pita DNA dirunning menggunakan gel agarose 1% dan real time PCR CFX96 (Biorad) sampel darah hewan coba dengan rentang konsentrasi 0,5-12 mg/ml



Gambar 2. Profil Pita protein sampel serum hewan coba dengan rentang konsentrasi 0,5-12 mg/ml

Analisis proteomik yang dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan SDS-PAGE-Vertical Electrophoresis Tetracell (Biorad) bertujuan untuk memantau purifikasi protein yang didasarkan pada pemisahan protein berdasarkan ukuran, maka dapat pula digunakan untuk menentukan berat molekul relative suatu protein. Adapun hasil yang didapatkan dalam analisis proteomik dengan profil pita protein dan ukuran jarak perpindahan (Rf) (Gambar 2.) Hasil optimal penentuan konsentrasi analisis proteomik, berkisar pada rentang konsentrasi 1-5(mg/ml), dimana terlihat hasil yang akurat dan terseparasi secara jelas ukuran volume jarak perpindahannya (Rf) (Bare & Fatchiyah, 2018)

4. Kesimpulan

Konsentrasi sampel analisis genomik terbaca secara optimal berada pada rentang konsentrasi 50-100(ng/ul) sedangkan analisis proteomik berkisar pada rentang konsentrasi 1-5(mg/ml). Penelitian ini dilakukan untuk memudahkan peneliti dalam mencapai keberhasilan running menggunakan real time PCR dan SDS PAGE sehingga penelitian dapat dilakukan secara optimal dan efisien.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Institut Biosains yang sudah menyiapkan peralatan dan bahan penelitian

Daftar Pustaka

Bare Y., & Fatchiyah. 2018. PROFIL PROTEIN PADA ORGAN TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2 (DMT2). *Biologi dan Pendidikan Biologi*. (2018), 11:1 p.1-12

Setyawati & Zubaidah. 2021. Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *INDONESIAN JOURNAL OF LABORATORY*. Vol 4 (1) 2021, 36-40