

OPTIMASI PRIMER *P-GLY* PADA SAMPEL SEL KANKER PAYUDARA (*T47D*) DENGAN MENGGUNAKAN REAL TIME PCR

Nur Anisa Wahyuni^{1*}, Siska Alicia Farma¹, Ira Wahyuni²

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Sumatera Barat

²Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Sumatera Barat

*Corresponding author: nuranisawhyn2003@gmail.com

ABSTRACT

T47D cells are human breast cancer cells that are ER/progesterone receptor-positive and originate from pleural fluid. These cells express a mutant of the p53 protein and are very sensitive to the stimulant effects of estradiol. P-glycoprotein (P-gp) is a member of the ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily, which determines a wide range of drug absorption and penetration. This study aims to optimize the p-gly primer in breast cancer cell samples (747d) using real time PCR. This research uses methods including: 1) DNA isolation, 2) real time PCR and 3) electrophoresis. The data obtained were then discussed descriptively to determine the results of optimal p-gly primer optimization in breast cancer cell samples (747d). The results of this study show that BLAST primer P-gly with the Forward sequence 5'GTTTC GCTATTC AAATTGGC3' and the Reverse Sequence 5'GGCATA CCTGGT CATGTC3' obtained a product with a length of 230 bp. From the product sequence alignment results, Length 21, TM 56.46 for Forward and Length 18, TM 54.76 for Reverse are obtained. The results of the Gradient Real time PCR Primer P-gly with an annealing temperature of 51°C-60°C obtained an optimum temperature of 54.5°C.

Keywords : *P-Glycoprotein, Breast cancer, Real time PCR, Primary optimization*

ABSTRAK

Sel *T47D* adalah sel kanker payudara manusia yang bersifat ER/progesterone receptor-positif dan berasal dari cairan pleural. Sel ini mengekspresikan suatu mutan dari protein p53 dan sel ini sangat sensitif terhadap efek stimulan dari estradiol. P-glycoprotein (*P-gp*) adalah anggota dari superfamili transporter ATP binding cassette (ABC), yang menentukan berbagai penyerapan dan penembusan obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan primer *p-gly* pada sampel sel kanker payudara (*747d*) menggunakan real time PCR. Penelitian ini menggunakan metode antara lain: 1) isolasi DNA, 2) real time PCR dan 3) elektroforesis. Data yang diperoleh kemudian dibahas secara deskriptif untuk mengetahui hasil optimasi primer *p-gly* yang optimal pada sampel sel kanker payudara (*747d*). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa BLAST primer *P-gly* dengan sekuens *Forward* nya 5'GTTTC GCTATTC AAATTGGC3' dan Sekuens *Reverse* 5'GGCATA CCTGGT CATGTC3' didapatkan produk dengan panjang 230 bp. Dari hasil penyejajaran sekuens produk diperoleh *Length* 21, TM 56.46 untuk *Forward* dan *Length* 18, TM 54.76 untuk *Reverse*. Hasil dari Gradient *Real time PCR* Primer *P-gly* dengan suhu *annealing* 51°C-60°C didapatkan suhu optimum yaitu 54,5 °C.

Kata kunci : *P-Glycoprotein, Kanker payudara, Real time PCR, Optimasi primer*

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan salah satu tantangan kesehatan global yang paling signifikan di abad ini, menempati posisi sebagai penyebab utama kedua dari kasus kanker pada wanita di seluruh dunia. Penyakit ini ditandai dengan tingkat heterogenitas yang tinggi, baik pada aspek genetik maupun ekspresi fenotipik, yang mempengaruhi respons terhadap terapi dan prognosis pasien (Suwarna, 2020; Mahardika, 2021). Di Indonesia, prevalensi kanker payudara terus meningkat, dengan kasus baru yang cenderung muncul pada usia lebih muda dibandingkan di negara-negara Barat, menimbulkan kebutuhan mendesak untuk strategi deteksi dan terapi yang lebih efektif.

Kanker payudara berada pada urutan ke-2 dari sejumlah kanker yang diderita wanita Amerika Serikat, Indonesia, dan negara lain pada umumnya. (Medina & Kittrell 2003). Sel T47D adalah sel kanker payudara manusia yang bersifat ER/progesterone receptor-positif dan berasal dari cairan pleural. Sel ini mengekspresikan suatu mutan dari protein p53 dan sel ini sangat sensitif terhadap efek stimulan dari estradiol (Schafer et al.,2000). Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun (ATCC, 2012). *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara in vitro karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall et al., 2003).

P-glycoprotein (P-gp) adalah anggota dari superfamili transporter ATP binding cassette (ABC) (Hashimoto et al.,2017), yang menentukan berbagai penyerapan dan penembusan obat (Jeong and Chiou, 2006; Finch A, 2014). P-glikoprotein (P-gp) merupakan protein yang membentuk membran, berfungsi untuk memompa transmembrane efluks. Berdasarkan letaknya di membrane plasma, P-gp aktif mengangkut *xenobiotic* dari intraseluler ke ruang ekstraseluler (Waiting, D. 2010). P-glikoprotein (P-gp) merupakan protein yang membentuk membran, berfungsi untuk memompa transmembrane efluks. Berdasarkan letaknya di membrane plasma, P-gp aktif mengangkut *xenobiotic* dari

intraseluler ke ruang ekstraseluler (Waiting, D. (2010). P-gp adalah transporter ABC yang termasuk dalam superfamili pompa multidrug resistance (MDR). Fungsi transporter obat ABC rumit (Subramanian *et al.*, 2016). Dalam kondisi fisiologis, xenobiotik dikeluarkan dari sel normal oleh protein membran ini sementara pada sel tumor, di mana terdapat ekspresi berlebihan P-gp, obat antikanker diangkut ke matriks ekstraseluler oleh pompa ini. Fenomena ini menjaga konsentrasi obat intraseluler dalam sel tumor di bawah ambang terapeutik yang dapat menyebabkan efek sitotoksik suboptimal dari obat antitumor (Jain *et al.*, 2018).

Primer berperan penting dalam penempelan pada daerah spesifik cetakan DNA dan juga mengawali sintesis rantai DNA selanjutnya. Primer merupakan urutan sekuen basa oligonukleotida pendek, umumnya berukuran 18-25 basa nukleotida. Ukuran primer yang terlalu pendek krang dari 18 basa akan menurunkan spesifitas karena primer akan menempel di sembarang tempat (misspriming). Primer forward akan menempel pada ujung DNA 5'-fosfat yang komplemen dengan bagian dari cetakan DNA. Primer reverse akan menempel pada ujung rantai DNA antisense 3'-OH dan hasil sintesis rantai ini akan membentuk rantai okazaki karena arah sintesis rantai baru oleh enzim polimerase berjalan dari ujung 5' menuju ujung 3' (Sambrook & Russel, 2001; Yuwono, 2006).

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode yang dapat digunakan dalam pengujian rutin untuk mengidentifikasi jenis spesifik, karena mudah, cepat dan memungkinkan untuk mendeteksi beberapa jenis pada saat yang sama. Metode tersebut membutuhkan tahapan tambahan berupa visualisasi hasil amplifikasi setelah proses PCR selesai, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk deteksi relatif lebih lama (Ramadhanil *et al.*, 2023). Kemampuan primer yang didesain dalam mengamplifikasi atau memperbanyak daerah yang diinginkan dapat diuji melalui reaksi PCR. Prinsip dari reaksi PCR adalah memperbanyak suatu urutan DNA secara eksponensial dengan *in vitro* menggunakan primer yang spesifik, yang selanjutnya akan di elektroforesis untuk mengidentifikasi pita DNA yang dihasilkan. Pada saat melakukan PCR perlu ditentukan kondisi optimal pemeriksaan meliputi jumlah/konsentrasi campuran/*mix* yang digunakan serta waktu dan

suhu optimal saat reaksi terjadi. Masing-masing komponen PCR memiliki fungsi yang penting dalam reaksi PCR (Badriyya & Achyar, 2020).

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik sintesis dan amplifikasi rantai Dioxiribonucleic Acid (DNA) dalam jumlah banyak dalam waktu singkat (McPherson & Moller, 2007). Teknik PCR dilakukan secara *in vitro* menggunakan reaksi enzimatik pada potongan DNA yang pendek sebagai cetakan. Prinsip terjadinya reaksi dalam PCR adalah dengan adanya sifat komplementer antara rantai DNA target melalui bantuan enzim polimerase, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), buffer PCR, magnesium klorida dan oligonukleotida sebagai primer yang ketika semua dicampurkan reaksinya akan dipicu dengan perubahan suhu di dalam mesin thermocycler (Handoyo & Rudiretna, 2000). Bagian sekuen DNA target yang akan diamplifikasi harus diketahui terlebih dahulu sebelum dilakukan amplifikasi dengan mendesain primer forward (F') dan primer reverse (R') yang sesuai. salah satu faktor penting dalam keberhasilan PCR adalah pemilihan primer yang memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi (Nuryadi, 2020).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode antara lain: 1) isolasi DNA, 2) real time PCR dan 3) elektroforesis. Data yang diperoleh kemudian dibahas secara deskriptif untuk mengetahui hasil optimasi primer *p-gly* yang optimal pada sampel sel kanker payudara (T47d).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Real-Time PCR adalah satu teknik PCR yang dapat mendeteksi dan menyajikan perkembangan reaksi PCR secara kontinyu (real time) sehingga jumlah DNA di awal reaksi dapat dihitung secara kuantitatif. Analisis menggunakan Real time PCR memiliki sensitivitas tinggi dan lebih spesifik oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui perbedaan antara metode PCR Konvensional dengan Real Time. untuk produk PCR tertentu. Real time PCR juga meliputi Real Time-RT PCR dimana PCR dilakukan secara Real Time menggunakan enzim *Reverse Transcriptase* secara langsung pada waktu

yang bersamaan. Real Time-RT PCR memiliki tambahan siklus *Reverse Transcription* yang memacu perubahan molekul DNA dari molekul RNA. Real Time-RT PCR diperlukan karena RNA kurang stabil dibandingkan dengan DNA (Kurniawati, 2019).

PCR didasarkan pada kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA baru yang melengkapi untai cetakan yang diinginkan. Prinsip reaksi PCR adalah amplifikasi eksponensial sekuens DNA secara *in vitro* menggunakan primer spesifik yang kemudian dilakukan elektroforesis untuk mengidentifikasi kelompok DNA yang dihasilkan (Syamsurizal *et al.*, 2019). Selain primer, keberhasilan PCR juga dipengaruhi oleh suhu annealing (T_a). Suhu annealing adalah suhu yang diperlukan oleh primer untuk menempel pada DNA cetakan secara stabil. Pemilihan suhu annealing yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan yang tidak spesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan sulit terbentuknya ikatan primer dan DNA template (Fauziah *et al.* 2023).

PCR adalah teknik yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik dari gen tertentu. Prinsip PCR dan Real time PCR (PCR kuantitatif) dalam mengamplifikasi DNA pada dasarnya sama. Perbedaannya adalah jumlah salinan teramplifikasi yang teramplifikasi pada PCR konvensional baru diketahui pada fase akhir (fase plateau) dari proses amplifikasi dan diinterpretasikan dalam bentuk visualisasi pita DNA pada gel agarosa, sedangkan pada Real time PCR, jumlah salinan teramplifikasi dapat diketahui selama siklus amplifikasi berlangsung (*In real time*), mulai dari kondisi amplifikasi optimal (fase eksponensial) yaitu fase linier ketika reaksi amplifikasi melambat hingga fase plateau yaitu ketika reaksi amplifikasi mulai berhenti (Farma *et al.*, 2020).

Selanjutnya kandidat primer yang dipilih dilakukan uji spesifisitas secara *in silico* menggunakan Primer-*BLAST* berdasarkan database *Refseq representative genomes*. Primer-*BLAST* merupakan alat yang digunakan untuk mendesain primer yang spesifik dan dapat digunakan juga untuk menganalisis spesifisitas primer terhadap sekuens yang ada didalam database NCBI.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTTTCGCTATTCAAATTGGC	21	56.46	42.86	5.00	2.00
Reverse primer	GGCATACCTGGTCATGTC	18	54.76	55.56	7.00	7.00

Products on target templates
 >NM_001348945.2 Homo sapiens ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), transcript variant 1, mRNA

```

product length = 230
Forward primer 1 GTTTCGCTATTCAAATTGGC 21
Template 633 TG..T..... 653

Reverse primer 1 GGCATACCTGGTCATGTC 18
Template 862 ..... 845
    
```

>NM_000927.5 Homo sapiens ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), transcript variant 3, mRNA

```

product length = 230
Forward primer 1 GTTTCGCTATTCAAATTGGC 21
Template 581 TG..T..... 601

Reverse primer 1 GGCATACCTGGTCATGTC 18
Template 810 ..... 793
    
```

Gambar 1. Hasil *Primer-BLAST*

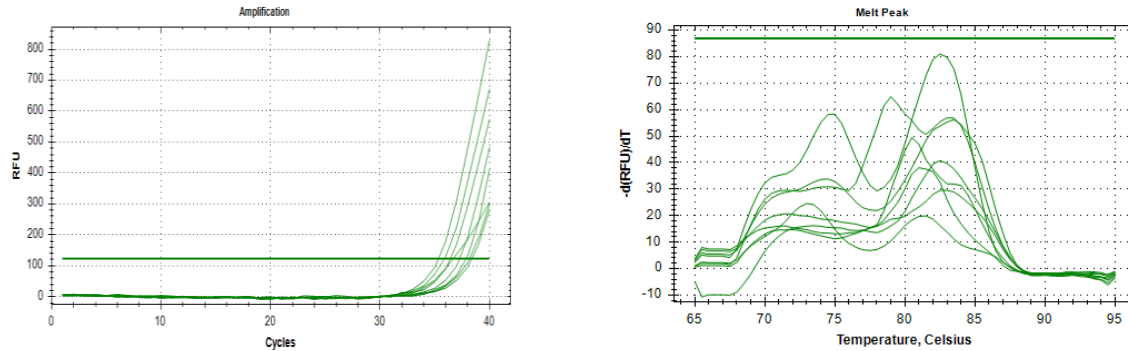
Penyejajaran menggunakan *Primer-BLAST* memungkinkan melakukan pencarian kesamaan urutan terhadap beberapa pengkalan data yang terdapat di Genbank NCBI. Dari hasil penyejajaran sekuens produk diperoleh *Length* 21, *TM* 56.46 dan *Self 3' Complementarity* 2.00 untuk *Forward Primer* serta 7.00 untuk *Reverse Primer*. Semakin kecil *Self 3' complimentarity* akan semakin baik. *Self 3' complementarity* maksimum adalah 3, dan maksimum pengulangan satu basa yang sama secara berurutan adalah 4 basa.

Komponen reaksi *Real Time PCR* dicampurkan sesuai komposisi yang telah ditentukan. Selanjutnya mesin PCR disetting, yaitu dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 30 detik, denaturasi siklus pada suhu 95°C selama 5 detik, gradien annealing untuk primer *P-gly* pada suhu 51°C – 60°C dengan interval suhu 51.0, 51.6, 52.8, 54.5, 56.7, 58.5, 59.5, 60.0, elongasi pada suhu 65°C selama 5 detik, mengatur siklus sebanyak 40 kali, elongasi akhir pada suhu 95°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	60.0	P-Gly	BCRP									
B	59.5	P-Gly	BCRP									
C	58.5	P-Gly	BCRP									
D	56.7	P-Gly	BCRP									
E	54.5	P-Gly	BCRP									
F	52.8	P-Gly	BCRP									
G	51.6	P-Gly	BCRP									
H	51.0	P-Gly	BCRP									

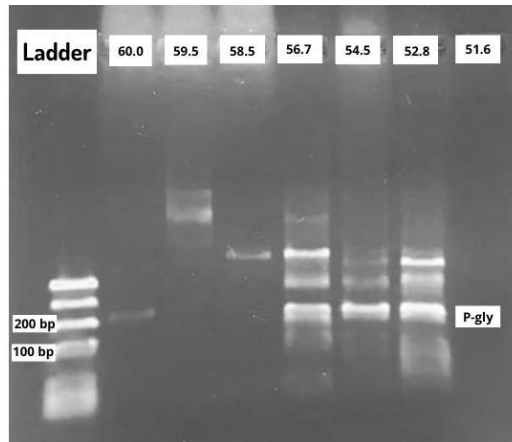
Gambar 2. Gradient suhu *annealing*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil dengan Real time PCR dilihat dari serapan *fluoresens* SYBR *green* yang diukur selama amplifikasi berlangsung. Nilai serapan diukur berdasarkan titik potong kurva amplifikasi dengan garis ambang (*threshold*) yang disebut dengan nilai Ct (*cycle threshold*) seperti yang terlihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 3. Amplifikasi dan Titik Lebur Primer

Optimasi dilakukan untuk memperoleh suhu *annealing* yang optimal dapat dilakukan amplifikasi menggunakan *gradient* Real time PCR. Penentuan suhu *annealing* yang digunakan didasarkan pada nilai T_m yang memiliki kedua primer. Variasi suhu yang digunakan dalam *gradient* Real time PCR yaitu antara 51.0°C-60.0°C. Sampel sel kanker payudara (747D) sesuai dengan yang diamplifikasi menggunakan primer yang telah didesain ampikon gen nya berukuran 230 bp. Berdasarkan hasil elektroforesis (Gambar 4) diperoleh suhu optimum adalah 54,5°C pada primer memiliki pita yang tebal. Pemilihan suhu yang terlalu tinggi dapat menghambat terbentuknya primer dimer pada DNA *template*, sedangkan suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan primer yang tidak spesifik pada DNA *template*.



Gambar 4. Hasil Elektroforesis

Penggunaan tegangan listrik dalam elektroforesis gel perlu diperhatikan, karena tegangan listrik yang terlalu besar dapat mengakibatkan panas yang dapat mengubah bentuk fragmen DNA. Tegangan listrik yang terlalu besar dapat menyebabkan terjadinya smile effect. Hal ini bisa disebabkan karena kepadatan gel yang tidak sempurna, sehingga gel menjadi rusak. Smile effect dapat terjadi karena beberapa faktor, di antaranya kepadatan gel agarose yang tidak merata (tidak seragam), adanya kotoran dalam gel agarosa dan perubahan arah medan Listrik (Cramer & Westermeier, 2012).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan hasil dari BLAST primer *P-gly* dengan sekuens *Forward* nya 5'GTTTC GCTATTC AAATTGGC3' dan Sekuens *Reverse* 5'GGCATA CCTGGT CATGTC3' didapatkan produk dengan panjang 230 bp. Penyejajaran menggunakan *Primer-BLAST* memungkinkan melakukan pencarian kesamaan urutan terhadap beberapa pengkalan data yang terdapat di Genbank NCBI. Dari hasil penyejajaran sekuens produk diperoleh *Length* 21, TM 56.46 untuk *Forward* dan *Length* 18, TM 54.76 untuk *Reverse*. Hasil dari Gradient Real time PCR Primer *P-gly* dengan suhu *annealing* 51°C-60°C didapatkan suhu optimum yaitu 54,5 °C.

DAFTAR PUSTAKA

- ATCC. 2012. *Thawing, Propagating, and Cryopreserving Protocol: NCI-PBCF-HTB133 (T47D) Breast Carcinoma (ATCC®HTB-133TM)*. Manassas: Physical Science Oncology Center Network Bioresource Core Facility.
- Badriyya, E., & Achyar, A. (2020). Primer Construction to detect SNP rs11196205 Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2) Using Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR to detect Type-2 Diabetes Mellitus. *Bulletin of Scientific Contribution*, 4(2), 151. <https://doi.org/10.24036/0202042108497-0-00>.
- Burdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M., dan Speirs, V. 2003. Breast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res.*, 5(2): 89-95.
- Cramer, R. & Westermeier, R. (2012). *Difference gel electrophoresis (DIGE)*. Humana Press Inc. New York, 401 pp.
- Farma, S. A., Handayani, D., & Putri, D. H. (2020). Optimization of Annealing Temperature of HIF-1 A and 18s rRNA in Blood of Swimming Athletes Using RT-PCR. *International Conference on Biology, Sciences and Education (ICoBioSE 2019)*, 34–38.
- Fauziah N, Achyar A, Zulyusri Z, Atifah Y, Advinda L, Violita V. 2023. Specific primer design and optimization of annealing temperature for amplification gene peroxidase (POD) in *Oryza sativa* L. *BSC.31;7(2):46*.
- Handoyo, D. and Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas* 9(1), pp. 17–29.
- Hashimoto, N., Nakamichi, N., Yamazaki, E., Oikawa, M., Masuo, Y., Schinkel, A. H. and Kato, Y. (2017) 'P Glycoprotein in skin contributes to transdermal absorption of topical corticosteroids', *International Journal of Pharmaceutics*.

- Jain, S., Grandits, M., & Ecker, G. F. (2018). Interspecies comparison of putative ligand binding sites of human, rat and mouse P-glycoprotein. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122, 134–143.
- Jeong H, Chiou WL. (2006). Role of Pglycoprotein in the hepatic metabolism of tacrolimus. *Xenobiotica*;36(1):1-13.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, S., & Hayati, I. N. (2019). Aplikasi polymerase chain reaction (PCR) konvensional dan real time-pcr untuk deteksi virus vnn (viral nervous necrosis) pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Techno-Fish*, 3(1), 19-30.
- Mahardika, M.P. dan Saifudin, A., 2021. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Sulforaphane pada Brokoli (*Brassica oleracea* L.) dan Aktivitas Sitotoksik terhadap Sel Kanker T47D. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 18(1), hh.86-98
- McPherson, M., & Moller, S. (2007). *Polimerase Chain Reaction (PCR)*. Taylor& Francis
- Nuryady, Moh Mirza, et al. Desain dan optimasi primer gen pengkode MRPA *Trypanosoma evansi* dan penerapan pada pembelajaran biologi molekuler. *Jurnal Penelitian dan Pengkajian Ilmu Pendidikan: e-Saintika*, 2020, 4.2: 223-233.
- Ramadhanil, S., Putri, F. R., & Farma, S. A. (2023). Desain primer dan analisis in silico gen glutathione peroxidase-1 pada *Rattus norvegicus*. *Tarumanagara Medical Journal*, 5(2), 374–383. <https://doi.org/10.24912/tmj.v5i2.25751>.
- Syamsurizal, S., Handayani, D., Kadri, H., & Badriyya, E. (2019). Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic. *Journal of Physics: Conference Series*, 1317, 1–8. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012090>.

Schafer JM, Lee ES, O'Regan RM, Yao K, and Jordan VC. 2000. Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice. *Clinical Cancer Research* 6: 4373-4380.

Subramanian, N., Condic-Jurkic, K., & O'Mara, M. L. (2016). Structural and dynamic perspectives on the promiscuous transport activity of P-glycoprotein. *Neurochemistry International*, 98, 146–152.

Suwarna, E.R., 2020. Isolasi Senyawa Aktif Fraksi N-Heksana dari Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) dan Uji Aktivas Antikanker Payudara dalam Formula Sediaan Nanopartikel self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) terhadap Sel T47D dan MCF-7.

Waiting, D. (2010). Oral bioavailability of P-glycoprotein substrate drugs do not differ between ABCB 1-1 D and ABCB 1 wild type dogs', pp. 453 –460

Yuwono, T. (2006). *Biologi molekuler*. Jakarta: Erlangga.