



## Optimasi Suhu *Annealing* Proses Amplifikasi Gen Luciferase Pengkode Bioluminesensi pada Jamur *Neonothopanus* sp. dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Devi Ulfa Ningsih

Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang

Email: [devi.ulfa61@gmail.com](mailto:devi.ulfa61@gmail.com)

---

### ABSTRAK

Enzim luciferase adalah enzim yang bertanggung jawab dalam mengkatalis rekasi bioluminesensi pada suatu organisme yang mampu memproduksi dan memancarkan cahaya. Pembentukan enzim luciferase dikode oleh gen luciferase. Isolasi gen luciferase dari materi genetik DNA/RNA dapat dilakukan menggunakan teknik PCR. Salah satu tahap yang menentukan keberhasilan proses PCR adalah tahap *annealing* untuk itu diperlukan suhu optimum pada penempelan primer dalam tahap *annealing*. Penelitian ini adalah penelitian deskriptif yang dilaksanakan pada bulan Mei 2019 sampai Desember 2019 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA UNP dan Laboratorium Biomedik FK UNAND. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa suhu optimum amplifikasi gen luciferase jamur *Neonothopanus* sp. menggunakan primer *forward* LuzR dan *reverse* LuzR adalah 56 °C dibuktikan dengan terbentuknya pita yang cukup terang pada hasil elektroforesis.

**Kata kunci:** Optimasi, *Polymerase Chain Reaction*, Suhu *annealing*, Luciferase, *Neonothopanus*.

---

### PENDAHULUAN

Enzim luciferase adalah enzim yang bertanggung jawab dalam mengkatalis rekasi bioluminesensi pada suatu organisme yang mampu memproduksi dan memancarkan cahaya (Dewi *et al.*, 2018). Dalam dogma sentral, pembentukan enzim dalam hal ini protein diawali dengan DNA yang ditranskripsi menjadi RNA kemudian ditranslasikan menjadi protein (Soedigdo, 1973). DNA sebagai materi genetik mengandung kode genetik yang dikemas dalam bentuk gen. Gen sebagai bagian dari DNA mengkode pembentukan protein (enzim) salah satunya enzim luciferase yang pembentukannya dikode oleh gen luciferase.

Informasi mengenai gen luciferase dunia disatukan dalam GenBank pada situs NCBI. Namun hingga saat ini informasi mengenai gen luciferase secara utuh masih belum ada, tetapi data yang tersedia adalah mRNA *partial cds* pada situs NCBI. Untuk mendapatkan sekuen kode genetik diperlukan tahap awal yaitu isolasi DNA/ RNA. Mengacu pada keberadaan informasi di situs NCBI, maka gen luciferase dapat diisolasi dari RNA bukan DNA.

Isolasi RNA merupakan proses pemisahan RNA dari komponen sel yang lainnya. Cara kerja pada isolasi RNA memiliki kemiripan dengan isolasi DNA. Prinsip utama dalam isolasi asam nukleat ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan



asam nukleat dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian asam nukleat (Holme & Hazel, 1998). Kemurnian asam nukleat dikatakan baik jika rasio 260/280 berada pada kisaran 1.8-2.0 (Gallagher, 2011). Jika kemurnian asam nukleat bernilai baik dan terkonsentrasi tinggi maka dapat dilanjutkan ke tahapan berikutnya yaitu isolasi sekuen gen target.

Gen luciferase dapat diisolasi dari RNA menggunakan teknik PCR (*Polymerase chain Reaction*) menggunakan cetakan cDNA. Jika rantai cetakan berupa RNA maka perlu diubah menjadi *complementary* DNA (cDNA) (Naidu dan Hughes, 2003). *Complementary* DNA merupakan cetakan yang di sintesis dari mRNA dengan menggunakan bantuan enzim reverse transcriptase. Menurut Suharsono *et al.* (2008) cDNA lebih aman digunakan dalam beberapa kegiatan molekular dibandingkan dengan RNA (mRNA) secara langsung dengan alasan cDNA lebih stabil dibandingkan RNA. Untuk itu proses PCR menggunakan cetakan berupa cDNA.

PCR merupakan teknik untuk mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro* menggunakan primer spesifik yang dapat mengenali daerah sekuen gen target. Primer yang dapat mengamplifikasi daerah sekuen gen luciferase adalah primer *forward* LuzF dan *reverse* LuzR (Kotlobaya *et al.*, 2018). Penggunaan teknik PCR telah diperluas dalam penelitian molekular sebab kemampuannya untuk mengamplifikasi daerah target pada DNA cetakan membutuhkan waktu yang relatif singkat. Pengulangannya berkisar antara 30-50 siklus replikasi yang melipat gandakan molekul DNA target pada setiap siklusnya (Innis *et al.*, 1990).

Penemuan teknik PCR disamping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekular. Komponen- komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah DNA cetakan; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida gen target DNA cetakan; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl<sub>2</sub>) dan enzim DNAPolymerase. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA cetakan; (2) denaturasi DNA cetakan; (3) penempelan primer pada DNA cetakan atau gen target (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pematapan (*postextension*). Tahap 2 sampai dengan 4 merupakan tahapan berulang (*siklus*), di mana pada setiap siklus terjadi penggandaan jumlah DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi adalah suhu *annealing*. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi maka dapat menyebabkan gagalnya amplifikasi karena tidak terjadi penempelan primer dan jika suhu terlalu rendah maka dapat menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom akibatnya DNA yang terbentuk memiliki spesifisitas rendah. Oleh karena itu sangat penting untuk mencari suhu *annealing* yang optimum (Rybicky 2001). Suhu optimum merupakan suhu terbaik



yang dapat diperoleh dengan cara optimasi. Optimasi suhu dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal sehingga dihasilkan produk PCR dengan kualitas yang baik.

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk optimasi suhu *annealing* adalah dengan menggunakan suhu *annealing* yang berkisar hingga 5°C lebih rendah dari  $T_m$  (*Temperature of melting*) pasangan primer (Innis dan (Gelfand 1990). Proses *annealing* memerlukan waktu yang singkat berkisar antara 30 detik atau kurang dari 30 detik jika  $T_a$  (*Temperature of annealing*) dekat dengan  $T_m$  atau kecuali primer tidak terlalu panjang seperti umumnya (Rybicky 2001). Optimasi PCR pada penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu *annealing* dari primer *forward* LuzF dan *reverse* LuzR pada sekuen gen luciferase jamur *Neonothopanus* sp.

## **METODE PENELITIAN**

### **Isolasi Total RNA**

Isolasi total RNA menggunakan TRIzol *reagent* dengan langkah-langkah sebagai berikut: Mengambil jamur yang telah disimpan pada suhu -80 °C kemudian menimbang sampel sebanyak 60 mg. Sampel dimasukkan ke dalam *microtube* ukuran 1,5 ml. Selanjutnya sampel ditumbuk menggunakan *micropestle* sampai hancur dan menambahkan 200 µl TRIzol *reagent* dikerjakan di *fume hood*. Penumbukan dilanjutkan selama satu menit untuk melisiskan sel jamur. Sampel yang sudah halus selanjutnya ditambahkan TRIzol kembali sebanyak 300 µL dan divortex selama 15 detik dilanjutkan dengan inkubasi selama lima menit untuk melanjutkan proses lisis pada sel jamur.

Sel jamur yang sudah lisis selanjutnya ditambahkan kloroform sebanyak 200 µl diinkubasi selama tiga menit sambil dikocok. Setelah itu, larutan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Hasil sentrifus akan menunjukkan 3 lapisan larutan pada *microtube* yaitu *aqueous phase*, *inter phase* dan *organic phase*. Bagian supernatan yang bersih (*aqueous phase*) dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru selanjutnya ditambahkan 500 µl isopropanol dan divortex selama 15 detik dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.

Untuk memisahkan RNA dengan pelarut isopropanol, larutan di sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. RNA yang terpresipitasi di pertahankan di dalam *microtube* sementara supernatannya dibuang. Tahap selanjutnya adalah pencucian RNA dengan menambahkan etanol 75% sebanyak 150 µl dilanjutkan dengan sentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 7.500 rpm. Buang supernatan dan tinggalkan RNA yang mengendap di dalam *microtube*. Keringkan menggunakan *vacuum centrifuge* selama 15 menit dan selanjutnya rehidrasi RNA menggunakan *RNAse-free water*.

### **Pengukuran Kuantitas RNA**



Pengukuran dilakukan pada tingkat kemurnian RNA dengan panjang gelombang  $\lambda 260/\lambda 280$  dan konsentrasi RNA pada panjang gelombang  $\lambda 260$  menggunakan alat nanodrop dengan terlebih dahulu memblank alat menggunakan larutan blanko sebanyak 2  $\mu$ l. Kemudian pengukuran dilakukan pada sampel dengan mengambil 2  $\mu$ l RNA.

### **Sintesis cDNA**

Sintesis cDNA dimulai dengan pengenceran konsentrasi RNA yang di peroleh menjadi 100 ng/ $\mu$ l. Selanjutnya pembuatan mix reaksi sintesis cDNA dengan menambahkan 10  $\mu$ l RNA, 1  $\mu$ l enzim reverse transcriptase, 4  $\mu$ l 5X trans buffer dan 5  $\mu$ l *nuclease-free water* untuk memenuhi jumlah volumenya menjadi 20  $\mu$ l. Reaksi ini dirunning selama 10 menit pada tahap *annealing* dengan suhu 25 °C, *reverse transcription* 15 menit pada suhu 42 °C, *inaktivasi* 5 menit pada suhu 85 °C dan penyimpanan akhir pada suhu 12 °C.

### **Optimasi Teknik Amplifikasi Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Daerah gen luciferase diamplifikasi menggunakan primer forward LuzF (5'-ATG CGC ATT AAC ATT AGC CTC-3') dan primer reverse LuzR (5'-TCA CTT GGC GTT TTC TAC AAT C-3') (Kotlobaya *et al.*, 2018). Reaksi PCR dilakukan pada 8 suhu *annealing* yang berbeda dengan masing-masing tabung 25  $\mu$ l reaksi, yang terdiri dari 12,5  $\mu$ l DreamTaq Green PCR Master Mix 2x, 1  $\mu$ l masing-masing primer LuzF dan LuzR 0,04 mM, dan 1  $\mu$ l cDNA cetakan, dan ddH<sub>2</sub>O 9,5  $\mu$ l sampai volumenya mencapai 25  $\mu$ l. Tahapan reaksi yang digunakan adalah denaturasi awal 95 °C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri atas denaturasi 95 °C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) dilakukan pada suhu 60 °C, 59 °C, 58 °C, 56 °C, 54 °C, 52 °C, 51 °C dan 50 °C selama 45 detik, elongasi pada suhu 72 °C selama 1 menit. Siklus dilanjutkan dengan elongasi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit dan penyimpanan sementara produk PCR pada suhu 12 °C sampai hasil amplifikasi di ambil.

### **Elektroforesis**

Analisis produk PCR menggunakan teknik elektroforesis dengan konsentrasi gel agarose 1,7% (0,85 g bubuk agarose dalam 50 ml buffer TAE 1X). Larutan dipanaskan menggunakan *microwave* hingga bening. Selanjutnya memasukkan larutan ke dalam cetakan dan menunggu sampai agar memadat. Kemudian memasukkan agar yang telah padat ke dalam bak elektroforesis yang telah berisi 500 ml buffer TAE 1X. Sebanyak 5  $\mu$ l produk PCR yang akan dianalisis dicampur dengan 1  $\mu$ l loading dye dan 5  $\mu$ l gel red menggunakan teknik *up and down*, selanjutnya memasukkan larutan ke dalam setiap sumur pada gel agarose. Selain produk PCR, pada proses elektroforesis juga disertakan DNA ladder 100 bp untuk menentukan ukuran pita DNA hasil PCR. Running



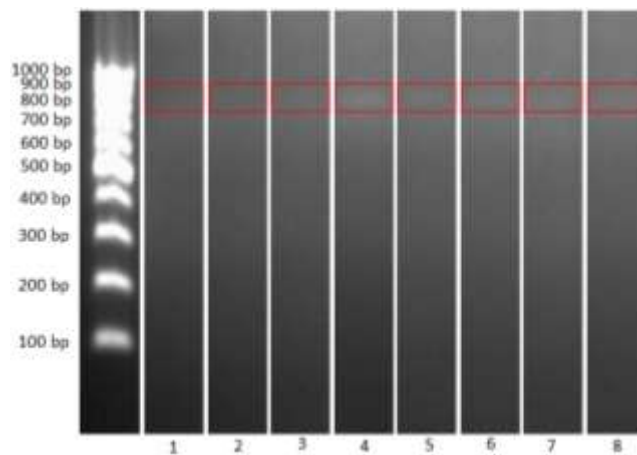
elektroforesis pada tegangan listrik 100 volt selama 45 menit. Kemudian visualisasi dan analisis hasil PCR menggunakan UV transiluminator.

### Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil pita elektroforesis yang terbentuk pada gel agarose. Kemudian data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk gambar.

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil optimasi suhu *annealing* amplifikasi gen luciferase menggunakan primer *forward* LuzF dan *reverse* LuzR didapatkan hasil yang ditampilkan pada Gambar 1. Optimasi suhu *annealing* dilakukan terhadap delapan variasi suhu yang berbeda. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suhu terbaik dalam tahap *annealing* adalah pada suhu 56 °C sumur ke-4 ditandai dengan adanya pita yang cukup terang pada kisaran panjang 800 *base pair* saat divisualisasikan menggunakan UV Transiluminator.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Optimasi Suhu *Annealing* Amplifikasi Gen Luciferase Menggunakan Primer *forward* LuzR dan *reverse* LuzR, secara berurutan sumur satu sampai 8 adalah 60 °C, 59 °C, 58 °C, 56 °C, 54 °C, 52 °C, 51 °C, dan 50 °C.

Profil pita Gen Luciferase jamur *Neonothopanus* sp. dapat dilihat pada Gambar 1. Weeden *et al.* (1992) menyebutkan pita DNA yang redup atau tidak jelas disebabkan konsentrasi DNA total yang terlalu kecil. Pada penelitian ini pita cDNA yang dihasilkan tidak begitu terang meskipun sudah menggunakan konsentrasi 100 ng/ $\mu$ l. Haris *et al.* (2003) Dalam penelitiannya menyebutkan jika pita hasil elektroforesis terlalu tipis maka perlu meningkatkan konsentrasi DNA yang digunakan. Selain itu alasan lain mengapa pita hasil elektroforesis terlalu tipis adalah dipengaruhi oleh situs penempelan primer pada DNA cetakan, kemudian kompetisi primer untuk menempel pada DNA cetakan



sehingga ada DNA yang diamplifikasi dengan jumlah banyak dan fragmen yang lain sedikit . Tidak lebih dari 5000 pasang basa (pb) akan dihasilkan apabila situs penempelan primer masih berada pada jarak yang dapat diamplifikasi (Grattapaglia *et al.*, 1992).

Dari hasil pengamatan pada Gambar 1. Memperlihatkan bahwa pita sebesar 800 bp dapat terbaca pada sumur 4 dan 5. Namun pita yang paling terang ditunjukkan pada sumur ke-4. Pita paling terang menandakan proses amplifikasi gen paling optimum. Suryanto (2003) menyatakan proses penempelan primer pada DNA cetakan membutuhkan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu rendah akan mengakibatkan primer menempel pada DNA yang bukan situsya, sebaliknya suhu yang terlalu tinggi mengakibatkan proses amplifikasi tidak terjadi. Penentuan suhu *annealing* biasanya digunakan suhu 5 °C lebih rendah dari nilai  $T_m$  nya, selain itu juga dapat ditentukan dengan pembuatan rentang suhu optimasi pada gradien PCR dengan rentang 10 °C dari  $T_m$  nya. Melting temperatur ( $T_m$ ) adalah temperatur di mana 50 % untai ganda DNA terpisah. Pemilihan  $T_m$  suatu primer sangat penting karena  $T_m$  primer akan berpengaruh sekali di dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR.  $T_m$  berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer (Handoyo dan Rudiretna, 2001)

Penelitian ini menggunakan rentang suhu 10 °C. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan ( $T_m - 5$ ) °C sampai dengan ( $T_m + 5$ ) °C (Handoyo dan Rudiretna, 2001), Tujuannya adalah mendapatkan suhu *annealing* yang masih dalam rentang  $T_m$  primer. Lebih lanjut Handoyo dan Rudiretna (2001) menyebutkan dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan perlu diperhatikan adanya *mispriming* pada daerah target dan nontarget, dan keberhasilan suatu proses PCR akan ditentukan oleh eksperimen.  $T_m$  ditentukan pada catalog primer berdasarkan *design* primer yang dilakukan oleh *creator*.  $T_m$  dapat dilihat pada seluruh primer yang digunakan baik itu *forward* maupun *reverse*. Pada penelitian ini suhu  $T_m$  primer *forward* adalah 54,8% sedangkan *reverse* adalah 53,4%. Dua perbedaan suhu ini dijadikan patokan untuk menentukan suhu optimasi *annealing*. Suhu tertinggi adalah 60 °C sementara suhu terendahnya adalah 50 °C.

Berdasarkan hasil elektroforesis terhadap penggunaan primer LuzF dan LuzR maka kondisi suhu *annealing* 56°C paling tepat untuk mengamplifikasi sekuen gen luciferase jamur *Neonothopanus* sp, Pada kasus lain, Asy'ari & Noer (2005) menyebutkan bahwa percobaan optimasi produk PCR berukuran  $\leq 2,1$  kb dapat dihasilkan pada kondisi PCR standar, dengan melakukan optimasi suhu *annealing* dan waktu ekstensinya, sedangkan produk PCR lebih dari 2,1 kb memerlukan optimasi variabel lainnya, terutama konsentrasi ion  $Mg^{2+}$ .

Pada penelitian ini, meskipun menggunakan primer LuzF dan LuzR hasil publikasi penulis sebelumnya, optimasi suhu *annealing* tetap harus dilakukan, mengingat fragmen target gen luciferase yang diamplifikasi adalah berbeda dengan



species reference yaitu *Neonothopanus nambi*.

## PENUTUP

Kesimpulan penelitian ini adalah suhu optimum amplifikasi gen luciferase jamur *Neonothopanus* sp. menggunakan primer *forward* LuzR dan *reverse* LuzR adalah 56 °C dibuktikan dengan terbentuknya pita yang cukup terang pada hasil elektroforesis.

## REFERENSI

- Asy'ari, Mukhammad dan Noer, Syaifuddin. 2005. Optimasi Konsentrasi MgCl<sub>2</sub> dan Suhu Annealing pada Proses Amplifikasi Multifragmens MtDNA dengan Metoda PCR. Bioteknologi ITB. (Jurnal)
- Dewi, K., Delianis, P., Sakti, I. M., and Haeruddin. 2018. Fenomena Bioluminesensi Ikan Lomek (*Harpadon nehereus*) Berasal dari Bakteri Luminesen. JPHPI, 21(3): 451-459.(Jurnal)
- Gallagher, S. R. 2001. Quantification of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. Current Protocols in Molecular Biology, 93(1). (Jurnal)
- Grattapaglia, D., Chaparro, J., Wilcox, P., McCord, S., Werner, D., Amerson, H., McKeand, S., Bridgwater, F., Whetten, R., O'Malley, D, Sederoff, R., 1992. Mapping in Wood Plants with RAPD Markers: Application to Breeding in Forestry and Horticulture. In: Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series CSSA/ASHS/AGA. 1 November 1992. Minneapolis. hlm. 37-40.(Jurnal)
- Handoyo, D., and Rudiretna, A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. Unitas, 9(1): 17-29.(Jurnal)
- Haris, N., Hajrial. A, Nurita. T.M, dan Agus. P. 2003. Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) berdasarkan metode amplified fragment length polymorphisms (AFLP). Menara Perkebunan 71(1): 1-15.(Jurnal)
- Holme dan Hazel. 1998. Studi Pendahuluan Variasi Genetik Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Lokal Berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA. Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang. (Jurnal)
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. 1990. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press Inc. (Jurnal)
- Kotlobaya, A. A., et al. 2018. Genetically Encodable Bioluminescent System From Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(50): 12728-12732.(Jurnal)
- Rybicky EP. 2001. PCR Primer Design and Reaction Optimisation In Molecular Biology Techniques Manual. South Africa: Departement of Microbiology University Cape Town.(Jurnal)



- Soedigdo, P. (1973). Tinjauan Ulang Mengenai Biokimia DNA dan RNA serta Biosintesa Protein. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 7(2), 41-56.(Jurnal)
- Suryanto D. 2003. Melihat keanekaragaman organisme melalui beberapa teknik genetika molekuler. *USU Digital Library [terhubung berkala]*. <http://www.library.usu.ac.id/modules.php> [23 November 2013].(Jurnal)
- Weeden, NF., GM., Timmerman, M., Hemmat., BE., Kneen, and MA., Lodhi. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD Markers. In: *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Joint Plant Breeding Symposia Series, November 1, 1992, Minneapolis, MN. Crop Science Society of America, Madison, WI.(Jurnal)