

## Optimasi Primer *BCRP* Sampel Sel Kanker Payudara (*T47D*) Dengan Menggunakan Real Time PCR

Septiasri Anggun<sup>1\*</sup> Yuni Ahda<sup>1</sup>, Ira Wahyuni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Sumatera Barat

[Septiaanggun11@gmail.com](mailto:Septiaanggun11@gmail.com)

### ABSTRACT

*BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) primers are a pair of short oligonucleotides (strands of DNA or RNA) specifically designed to amplify (duplicate) certain DNA segments of the BCRP gene through a process called Polymerase Chain Reaction (PCR). The BCRP gene encodes a membrane transport protein that plays an important role in the resistance of various types of drugs, including chemotherapy drugs, in cancer cells. The methods used are: DNA isolation, real time PCR, electrophoresis. To determine the results of BCRP primer optimization on breast cancer samples (T47D). the results of this study using BLAST primer BCRP on the forward sequence 5'AAAGGCA TAGATCCT AAAGA TTGTC3' and reverse sequence 5'TCTTTC TCAGCTG TTTTCC GGA3' product length 225 bp. The alignment of the product sequences is Length 25, TM 57.61. The results of gradient Real Time PCR BCRP with annealing temperature 51°C- 60°C obtained the optimum temperature of 54.5°C. qPCR provides data that is easy to interpret with standard workflows, while ImageJ requires manual analysis and expertise, making it more difficult to interpret results accurately.*

**Keywords :** *Primary Optimization Primary BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, Real Time PCR*

### ABSTRAK

Primer *BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)* adalah sepasang oligonukleotida pendek (untaian DNA atau RNA) yang dirancang secara spesifik untuk mengamplifikasi (menduplikasi) segmen DNA tertentu dari gen *BCRP* melalui proses yang disebut *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Gen *BCRP* mengkodekan protein transpor membran yang berperan penting dalam resistensi berbagai jenis obat, termasuk obat kemoterapi, pada sel kanker. Metode yang digunakan yaitu: isolasi DNA, real time PCR, elektroforesis. Untuk mengetahui hasil optimasi primer *BCRP* pada sampel kanker payudara (*T47D*). hasil penelitian ini menggunakan BLAST primer *BCRP* pada sekuens *forward* 5'AAAGGCA TAGATCCT AAAGA TTGTC3' dan sekuens *reverse* 5'TCTTTC TCAGCTG TTTTCC GGA3' produk Panjang 225 bp. Penyejajaran sekuens produk adalah *Length* 25, *TM* 57.61. Hasil dari gradient Real Time PCR *BCRP* dengan suhu *annealing* 51°C-60°C didapatkan suhu optimum yaitu 54,5°C. qPCR menyediakan data yang mudah diinterpretasikan dengan alur kerja standar, sementara ImageJ memerlukan analisis dan keahlian manual, sehingga lebih sulit untuk menginterpretasikan hasil secara akurat.

**Kata kunci :** *Optimasi Primer, Primer BCRP (Protein Resistensi Kanker Payudara, Real Time PCR*  
**PENDAHULUAN**

Primer BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) adalah sepasang oligonukleotida pendek (untaian DNA atau RNA) yang dirancang secara spesifik untuk mengamplifikasi (menduplikasi) segmen DNA tertentu dari gen BCRP melalui proses yang disebut Polymerase Chain Reaction (PCR). Gen BCRP mengkodekan protein transpor membran yang berperan penting dalam resistensi berbagai jenis obat, termasuk obat kemoterapi, pada sel kanker (Ifergan *et al.*, 2004).

Peningkatan BCRP akan meningkatkan perlindungan otak janin terhadap masuknya obat-obatan dan racun lingkungan. Namun, seperti P-gp, BCRP mengangkut sejumlah molekul endogen termasuk asam folat. Folat sangat penting selama pertumbuhan dan perkembangan jaringan yang cepat, dan karenanya sangat penting selama morfogenesis dan organogenesis (Mughis *et al.*, 2024). Hal ini penting untuk mengatasi peningkatan ekspresi transporter efluks dan meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara terhadap antikanker dalam kemoterapi ((Anuchapreeda *et al.*, 2002).

Kurkumin merupakan salah satu penghambat P-gp dan BCRP yang poten. Kurkumin bekerja dengan menurunkan ekspresi P-gp dan menurunkan efluks yang dimediasi oleh P-gp pada sel kanker yang resisten terhadap suatu obat. Kurkumin juga secara langsung berinteraksi dengan P-gp (Shukla *et al.*, 2009).

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Sebelum dilakukan PCR dengan sampel penelitian, perlu dilakukan optimasi agar didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga mendapatkan hasil PCR yang optimal (Setyawati & Zubaidah, 2021). PCR dan Real Time PCR sendiri mempunyai prinsip yang sama dalam mengamplifikasi DNA. Perbedaan antara keduanya terletak jumlah salinan teramplifikasi. Jumlah yang teramplifikasi pada PCR konvensional baru dapat diketahui pada fase akhir (fase plateau) proses amplifikasi dan diinterpretasikan dalam bentuk visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis, sedangkan pada Real time PCR, jumlah salinan teramplifikasi didapat selama siklus amplifikasi berlangsung (Farma *et al.*, 2020).

PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi template (94 – 95oC), annealing (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target (50 – 60o ) dan pemanjangan (72oC). Faktorfaktor yang menentukan keberhasilan PCR diantaranya adalah 1). konsentrasi dan kualitas DNA, 2). temperatur annealing dari kedua primer, 3). konsentrasi MgCl<sub>2</sub>, 4). enzim polimerase, 5). konsentrasi dan kualitas primer, 6). jumlah siklus PCR, 7). deoksinukleotida triphosphate (dNTP), dan faktor lain seperti larutan buffer (Langga *et al.*, 2012).

Analisis genetik dengan menggunakan metode PCR yang memanfaatkan cara replikasi DNA dengan bantuan primer yang mengapit daerah tertentu dan optimasi suhu

dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal, sehingga dihasilkan produk PCR spesifik yaitu terbentuk pita DNA tebal (Aulia *et al.*, 2021).

Untuk mendapatkan pita PCR yang tebal maka perlu dilakukan optimasi suhu annealing pada primer yang akan digunakan  $T_m$  akan menjadi dasar dalam menentukan suhu annealing ( $T_a$ ).  $T_a$  yang terlalu tinggi akan menyebabkan terlepasnya primer yang sudah menempel pada DNA cetakan sehingga produk PCR tidak akan terbentuk, sebaliknya  $T_a$  yang terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer yang tidak spesifik pada DNA cetakan (Suwignyo, 2016).

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari di Laboratorium Biomedik (Riset Terpadu) Pusat Diagnostik dan Riset Penyakit Non-Infeksi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif kuantitatif.

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan adalah mikropipet, gelas ukur, sentrifuse, vorteks, alat elektroforesis, cetakan gel agarose, sisir gel agarose, Transluminator UV, RT-PCR mechine. Bahan yang digunakan adalah tips, gel agarose, PCR tube, microtube, Primer BCRP, TBE, Loading dye.

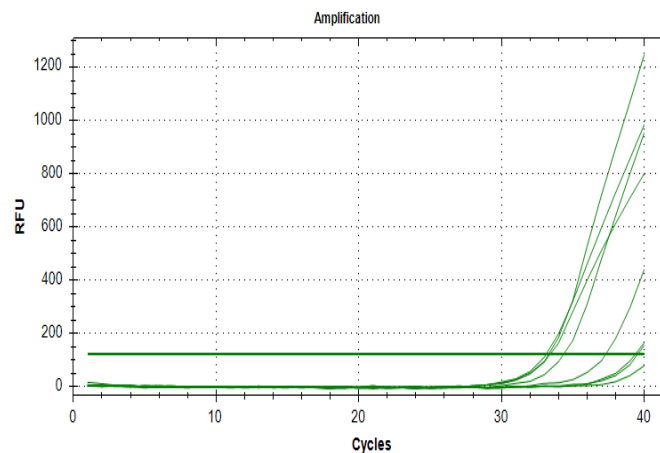
### **Prosedur Kerja**

1. Menyiapkan Sampel 747D hasil RT-PCR dengan primer BCRP
2. Melarutkan 3 tablet agarosa ke dalam erlenmeyer dengan 100 ml TBE. Larutan dipanaskan dalam microwave selama 1-2 menit hingga agarosa benar-benar larut. Larutan didinginkan dan dituang ke dalam wadah dengan sisir yang telah ditentukan,

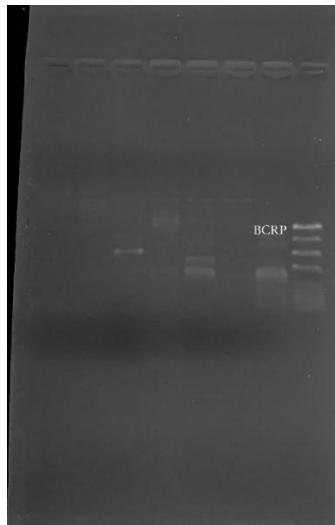
memastikan wadah tidak miring. Selanjutnya, larutan agarosa dibiarkan dingin dan gel nya memadat.

3. Mencampurkan loading dye dengan sampel yang akan di elektroforesis dengan wadah lain menggunakan mikropipet, lalu up and down secara berulang dengan mikropipet.
4. Loading dye yang sudah tercampur dengan sampel, dipipet kan kedalam sumur gel agarose. Pastikan sumur gel agarose tidak tertusuk dengan mikropipet agar hasil elektroforesis tidak terganggu.
5. Menghidupkan alat elektroforesis dan dibiarkan selama 1 jam hingga prosesnya selesai. Selanjutnya, hasil elektroforesis dapat dilihat di Transiluminator foto.

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN



**grafik kuantitatif**



**Gambar hasil pita DNA Elektroforesis agarose**

Elektroforesis DNA gel merupakan sebuah metode untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan ukurannya. Proses interpretasi gambar DNA sendiri secara manual untuk mendapatkan hasil yang akurat sangat susah, membutuhkan waktu, dan kemungkinan error cukup besar.



Detailed primer reports						
Download primer pairs						
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAAGGCA TAGATCCT AAAGA TTGTC3	25	57.61	26.00	0.00	0.00
Reverse primer	TCTTTTC TCAGCTG TTTTCC GGA3	22	59.90	45.45	0.00	0.00

**Hasil BLAST Primer**

BLAST Primer (*Basic Local Alignment Search Tool Primer*) adalah metode atau perangkat lunak yang digunakan untuk memeriksa atau menemukan pasangan primer yang sesuai untuk penguatan (amplifikasi) sekuens DNA tertentu dalam eksperimen PCR (*Polymerase Chain Reaction*). hasil penelitian ini menggunakan BLAST primer *BCRP* pada sekuens *forward* 5'AAAGGCA TAGATCCT AAAGA TTGTC3' dan sekuens *reverse* 5'TCTTTTC TCAGCTG TTTTCC GGA3' produk Panjang 225 bp. Penyejajaran sekuens produk adalah 25, TM 57.61. Hasil dari gradient Real Time PCR *BCRP* dengan suhu annraling 51°C- 60°C didapatkan suhu optimum yaitu 54,5°C.

B02	SYBR BCRP Unkn	N/A
C02	SYBR BCRP Unkn	37,30
D02	SYBR BCRP Unkn	39,55
E02	SYBR BCRP Unkn	34,35
F02	SYBR BCRP Unkn	33,30
G02	SYBR BCRP Unkn	33,41
H02	SYBR BCRP Unkn	33,13

Berdasarkan pada tabel yang diatas A02 *BCRP* Unkn terdapat 39,38 dan B02 N/A, C02 37,30, D02 39,55, E02 34,35, F02 33,30, G02 33,41, dan H02 33,13. *BCRP* (*Breast Cancer Resistance Protein*) adalah protein transporter ABC (ATP-binding cassette) yang memainkan peran penting dalam resistensi multidrug pada berbagai jenis kanker.

*BCRP*, juga dikenal sebagai ABCG2, berfungsi untuk memompa keluar berbagai obat antikanker dari sel, mirip dengan *P-glycoprotein*, sehingga menurunkan konsentrasi obat di dalam sel dan mengurangi efektivitas terapi. Penggunaan real-time PCR untuk mengukur ekspresi gen ABCG2 bertujuan untuk:

1. Menilai tingkat ekspresi *BCRP* pada sampel tertentu (misalnya, sampel jaringan kanker atau sel yang terisolasi).
2. Mengevaluasi potensi resistensi terhadap obat-obatan kemoterapi yang dikenal dipompa oleh *BCRP*.

Ekspresi *BCRP* yang tinggi dalam sampel kanker dapat menunjukkan kemungkinan resistensi terhadap terapi yang digunakan, seperti mitoxantrone, topotecan, dan beberapa inhibitor tirosin kinase. Penilaian ekspresi *BCRP* dapat membantu memandu pilihan pengobatan dengan mempertimbangkan resistensi yang mungkin terjadi.

#### **KESIMPULAN**

1. Real-time PCR, juga dikenal sebagai quantitative PCR adalah teknik laboratorium yang digunakan untuk mengamplifikasi dan secara simultan mengukur jumlah DNA target dalam sampel.
2. Analisis penyejajaran sekuens produk menunjukkan tingkat kesamaan sebesar 25% dengan nilai TM 57.61. Meskipun tingkat kesamaan ini tergolong rendah, primer ini tetap dapat digunakan untuk amplifikasi. Hasil optimasi suhu annealing pada Real-Time PCR menunjukkan bahwa suhu 54,5°C merupakan suhu optimal untuk reaksi PCR.
3. Hasil ini mengindikasikan bahwa peningkatan ekspresi *BCRP* dapat berkontribusi pada resistensi terhadap kemoterapi pada pasien kanker. Oleh karena itu, pengembangan inhibitor *BCRP* dapat menjadi strategi yang menjanjikan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan kanker."

**DAFTAR PUSTAKA**

- Anuchapreeda, S., Leechanachai, P., Smith, MM., Ambudkar, SV., Limtrakul, P, 2002, 'Modulation of P-glycoprotein Expression and Function by Curcumin in Multidrug-Resistant Human KB Cells', *Biochemical Pharmacology*, 64, 573-582.
- Aulia, S. L., Suwignyo, R. A., & Hasmeda, M, 2021, 'Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Dna Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction', *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 18(1), 44-54.
- 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.
- Ifergan, I., Shafran, A., Jansen, G., Hooijberg, J. H., Scheffer G.L., & Assaraf, Y. G, 2004, 'Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein resistance protein (BCRP/ABCG2) expression: a role for BCRP in cellular folate homeostasis', *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25527-25534.
- Mughis, H., Lye, P., Imperio, G. E., Bloise, E., & Matthews, S. G, 2024, 'Hypoxia modulates P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP) drug transporters in brain endothelial cells of the developing human blood-brain barrier. *Heliyon*, 10 (9).
- Shukla, S., Zaher, H., Hartz A, Bauer, B., Ware, JA., Ambudkar, SV, 2009, 'Curcumin Inhibits the Activity of ABCG2/BCRP1, A Multidrug Resistance-Linked ABC Drug Transporter in Mice', *Pharmaceutical Research*, 26 (2), 480-486.
- Setyawati, R., & Zubaidah, S, 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*, 4(1), 36-40.
- Suwignyo, R.A, 2016, 'Efforts and strategy to improve productivity of suboptimal land in Indonesia. ICCAE 5th Open Seminar in AY2016, December 13 2016. International Center for Research and Education in Agriculture (ICREA)', *Nagoya University, Nagoya Japan*.



Langga, I. F., Restu, M., & Kuswinanti, T, 2012, 'Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi DNA tanaman bitti (*Vitex cofassus* Reinw) serta analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD-PCR, *J Sains & Teknologi*, 12(3), 265-276.