

**KLONING KANDIDAT APTAMER UNTUK DETEKSI
PROTEIN HBsAg (*HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN*) PADA
VIRUS HEPATITIS B**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains*



**OLEH:
SAUSAN HANIFA
NIM. 16032040/2016**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2020**

PERSETUJUAN SKRIPSI

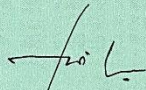
KLONING KANDIDAT APTAMER UNTUK DETEKSI PROTEIN HBsAg (HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN) PADA VIRUS HEPATITIS B

Nama : Sausan Hanifa
NIM/ TM : 16032040/ 2016
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 31 Januari 2020

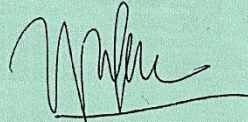
Disetujui Oleh:

Pembimbing I



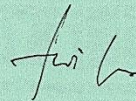
Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200604 2 001

Pembimbing II



Dwi Wulandari, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19810130 200502 2 003

Mengetahui:
Ketua Jurusan



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200604 2 001

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Sausan Hanifa
NIM/ TM : 16032040/ 2016
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

KLONING KANDIDAT APTAMER UNTUK DETEKSI PROTEIN HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) PADA VIRUS HEPATITIS B

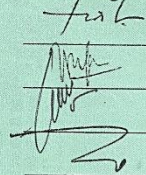
Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi Jurusan
Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, 31 Januari 2020

Tim Penguji:

	Nama
1. Ketua	: Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
2. Sekretaris	: Dwi Wulandari, S.Si., M.Biomed.
3. Anggota	: Siska Alicia Farma, M.Biomed.
4. Anggota	: Dezi Handayani, S.Si., M.Si.

Tanda tangan



SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sausan Hanifa

NIM/ TM : 16032040/ 2016

Program Studi : Biologi

Jurusan : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

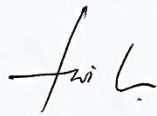
Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul "**Kloning Kandidat Aptamer untuk Deteksi Protein HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen) pada Virus Hepatitis B**" adalah benar hasil karya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya dan pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 04 Februari 2020

Diketahui oleh,

Ketua Jurusan Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed
NIP. 19750815 200604 2 001

Saya yang menyatakan,



Sausan Hanifa
NIM. 16032040

Kloning Kandidat Aptamer untuk Deteksi Protein HBsAg (*Hepatitis B Surface Antigen*) pada Virus Hepatitis B

Sausan Hanifa

ABSTRAK

Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) adalah protein permukaan virus Hepatitis B (VHB) yang merupakan penanda serologis pertama infeksi VHB. Teknologi deteksi HBsAg menggunakan antibodi dinilai kurang efektif, dikarenakan antibodi tidak stabil mendeteksi agen target, biaya produksi mahal dan dilakukan secara *in vivo* serta waktu produksi lama. Selain itu, metode ELISA untuk deteksi HBsAg hanya mampu mendeteksi virus 6-8 minggu setelah terinfeksi. Oleh karena itu, diperlukan upaya baru untuk mendapatkan metode deteksi yang lebih sensitif dan efisien untuk mendeteksi HBsAg. Aptamer adalah oligonukleotida untai tunggal DNA atau RNA yang dapat berikatan terhadap molekul target dengan afinitas, spesifitas, sensitifitas dan stabilitas yang tinggi. Puslit Bioteknologi LIPI sedang mengembangkan aptamer DNA untuk deteksi HBsAg. Untuk mendapatkan aptamer spesifik, kandidat aptamer yang berhasil diseleksi dengan metode SELEX selanjutnya diidentifikasi dengan kloning dan sekuensing. Penelitian ini bertujuan untuk mengkloning kandidat aptamer dan mendapatkan plasmid rekombinan yang membawa fragmen kandidat aptamer.

Tahapan kloning yang dilakukan diantaranya, persiapan fragmen *insert*, ligasi pada plasmid *pGEM-T easy vector*, transformasi ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α dan menumbuhkan bakteri pada medium selektif untuk mendapatkan koloni yang membawa plasmid rekombinan. Selanjutnya konfirmasi keberadaan *insert* dilakukan dengan teknik PCR-Koloni. Isolasi plasmid rekombinan pada koloni positif dan konfirmasi kembali keberadaan *insert* menggunakan hasil isolasi plasmid sebagai *template* PCR untuk memastikan plasmid rekombinan membawa fragmen *insert*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandidat aptamer hasil seleksi berhasil dikloning. Didapatkan 30 plasmid rekombinan pembawa fragmen *insert* (kandidat aptamer) yang akan dianalisis lebih lanjut untuk mendapatkan aptamer terbaik sebagai deteksi protein HBsAg.

Kata Kunci: VHB, HBsAg, DNA Aptamer, Kloning

Cloning of Aptamer Candidates for Detection of HBsAg Protein (*Hepatitis B Surface Antigen*) in Hepatitis B Virus

Sausan Hanifa

ABSTRACT

Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) is a surface protein for hepatitis B virus (HBV) and the first serological marker of HBV infection. Technology of HBsAg detection using antibody is considered less effective, because antibody is unstable to detect the target agent, high production costs, and production done with *in vivo* and time consuming. In addition, the ELISA method for detecting HBsAg is only able to detect the virus 6-8 weeks after infection. Therefore, new method are needed to get more sensitive and efficient detection for detecting HBsAg. Aptamer is a single-stranded DNA or RNA oligonucleotide that can bind to target molecules with high affinity, specificity, sensitivity and stability. LIPI Biotechnology Research Center is developing DNA aptamer for detecting HBsAg. To get specific aptamer, aptamer candidates who were successfully selected by the SELEX method were identified by cloning and sequencing. This study aims to clone aptamer candidates and get recombinant plasmids which carry fragments of aptamer candidates.

Steps of cloning method are preparation of insert fragments, ligation in *pGEM-T easy vector* plasmids, transformation into *Escherichia coli* DH5 α bacteria and growing bacteria on selective media to obtain colonies carrying recombinant plasmids. Furthermore, confirmation of the presence of the insert by PCR-Colony technique. Isolation of recombinant plasmid in positive colonies and reconfirmation of the presence of the insert used the results of plasmid isolation as a PCR template to ensure recombinant plasmid carrying inserts fragment.

The results of this research showed that the selected aptamer candidates were successfully cloned. There are 30 recombinant plasmid carrying insert fragments (aptamer candidates) that which will analysis to get the best aptamer to detecting HBsAg protein.

Key words: VHB, HBsAg, DNA Aptamer, Cloning

KATA PENGANTAR



Puji dan syukur kepada Allah Subhanawata'ala yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Kloning Kandidat Aptamer untuk Deteksi Protein HBsAg (*Hepatitis B Surface Antigen*) pada Virus Hepatitis B”**. Shalawat beriring salam untuk baginda rasul Nabi Muhammad Sallahualaihiwasalam sebagai junjungan umat seluruh alam.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Penyelesaian penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, baik secara moril maupun material. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed. sebagai ketua prodi Biologi dan Ibu Dr. Linda Advinda, M.Kes. sebagai dosen pembimbing akademik,
2. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed. dan Ibu Dwi Wulandari, S.Si., M.Biomed. sebagai pembimbing yang telah memberikan waktu, pikiran, dan tenaga untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam pelaksanaan dan penulisan skripsi,
3. Ibu Siska Alicia Farma, M.Biomed. dan Ibu Dezy Handayani, S.Si., M.Si. tim dosen penguji yang telah memberikan kritikan dan saran dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi,
4. Bapak/ Ibu dosen staf jurusan Biologi yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi,

5. Kedua orang tua tercinta, Ayahanda Ir. Afyendi dan Ibunda Ernita Idrus yang selalu membantu, mendukung dan mendoakan penulis dalam menjalani penelitian dan menyelesaikan skripsi,
6. Kedua saudari penulis Putri Nabila Ulfa dan Sarah Afifah yang selalu memberikan doa serta dukungan,
7. Keluarga besar yang turut mendoakan dan membantu penulis dalam menjalani penelitian dan menyelesaikan skripsi,
8. Ibu Ulfatulhusna, M.Biotech. sebagai teknisi laboratorium BMKD Puslit Bioteknologi LIPI yang telah membimbing dan memberikan arahan teknis dalam pelaksanaan penelitian,
9. Rekan-rekan yang berjuang bersama di laboratorium BMKD terutama Nadya Shifani, Alza Kirana, Mba Mita, Mba Ami, Mba Elsa, dan Mba Wulan
10. Dhea Ferda Pratiwi, Fori Fortuna, Halimah Tusa'diah, Husnul Khotimah, Intan Permata Aqilla, Fajar P. Leonan, Rahmat Wahyudi Putra, dan Wibi M. Syofian yang telah menjadi keluarga kedua selama menjalani perkuliahan serta penyemangat dalam menjalani penelitian dan menyelesaikan skripsi,
11. Rekan-rekan kelompok bimbingan Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed. yang telah memberikan bantuan dalam proses penulisan skripsi,
12. Keluarga besar Biologi Sains 2016 atas dukungan serta doanya.

Semoga bantuan yang Bapak/ Ibu serta rekan-rekan berikan bernilai ibadah dan mendapatkan pahala dari Allah Subhanawata'ala. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua orang yang membacanya.

Padang, Januari 2020

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Hepatitis B.....	6
B. Aptamer dan Metode SELEX	8
C. <i>pGEM-T Easy Vector</i>	12
D. <i>Escherichia coli</i> DH5 α	14
E. Kloning Gen	15
1. Amplifikasi Fragmen <i>Insert</i>	17
2. Ligasi Fragmen <i>Insert</i> dan Vektor.....	17
3. Transformasi DNA Rekombinan.....	18
4. Seleksi Antibiotik dan Seleksi Biru-Putih.....	19
F. Isolasi DNA Plasmid.....	20
BAB III METODE PENELITIAN	22
A. Jenis Penelitian.....	22
B. Waktu dan Tempat Penelitian	22

C. Alat dan Bahan	22
D. Prosedur Penelitian.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
A. Hasil	34
1. Amplifikasi Fragmen <i>Insert</i>	34
2. Visualisasi Purifikasi Hasil Amplifikasi Fragmen <i>Insert</i>	35
3. Ligasi dan Transformasi	35
4. Konfirmasi Keberadaan <i>Insert</i> dengan PCR-Koloni.....	37
5. Konfirmasi Keberadaan <i>Insert</i> dengan PCR Menggunakan Hasil Isolasi Plasmid sebagai <i>Template</i> PCR	38
B. Pembahasan	39
BAB V PENUTUP	53
A. Kesimpulan.....	53
B. Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Virus Hepatitis B.....	7
<u>2.</u> Diagram Sistematis Cara Aptamer Berikatan dengan Molekul Target	8
3. Seleksi Aptamer dengan metode SELEX.	10
4. Peta dan Referensi Sekuens <i>pGEM-T Easy Vector</i>	13
5. Visualisasi Hasil Amplifikasi Fragmen <i>Insert</i>	34
<u>6.</u> Visualisasi Purifikasi Hasil Amplifikasi Fragmen <i>Insert</i>	35
7. Hasil Transformasi	36
8. Visualisasi Konfirmasi Keberadaan <i>Insert</i> dengan PCR-Koloni	37
9. Visualisasi Konfirmasi Keberadaan <i>Insert</i> dengan PCR Menggunakan Hasil Isolasi Plasmid sebagai <i>Template PCR</i>	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Cara Pembuatan Sel Kompeten	59
2. Bagan Cara Kerja Kloning Kandidat Aptamer	60
3. Hasil Optimasi Terhadap Jumlah Siklus PCR Fragmen <i>Insert</i>	61
4. Hasil Replika Koloni Putih Hasil Transformasi.....	62

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Hepatitis adalah penyakit radang hati yang dapat menyebabkan kerusakan sel, jaringan, dan keseluruhan organ hati (Sari dkk., 2008). Berdasarkan virus penyebabnya, hepatitis terbagi menjadi 5 jenis, yaitu Hepatitis A, B, C, D dan E. Prevalensi pasien Hepatitis B memiliki angka yang paling tinggi, yaitu 1 dari 12 penduduk di dunia (WHO, 2017; Kemenkes, 2019). Indonesia merupakan salah satu negara dengan jumlah pasien Hepatitis B tertinggi dalam kelompok negara *South East Region* (SEAR) setelah Myanmar (Data Rikesdas, 2014). Oleh karena itu, kasus Hepatitis B merupakan masalah kesehatan masyarakat global yang harus diselesaikan.

Hepatitis B disebabkan oleh virus Hepatitis B (VHB) yang merupakan golongan virus DNA (Cahyono, 2010). Struktur tubuh VHB terdiri atas struktur *envelope*, *nucleocapsid*, dan materi genetik (terdiri atas DNA untai ganda) (Soemoharjo dan Gunawan, 2007). Infeksi VHB terjadi dalam waktu yang cepat dan ditularkan melalui kontak dengan cairan seperti darah, air liur, dan sperma. Gejala infeksi VHB umumnya tidak khas seperti, rasa lesu, demam ringan dan nafsu makan berkurang (Sari dkk., 2008; Kemenkes, 2014; Liang, 2009).

Hepatitis B terdiri atas dua jenis, yaitu Hepatitis B akut dan Hepatitis B kronik. Hepatitis B akut terjadi ketika pasien terinfeksi VHB kurang dari enam bulan, dimana jika tidak diketahui dan ditangani dengan cepat, dapat berkembang menjadi kronik (Kemenkes, 2014). Hepatitis B kronik tidak dapat disembuhkan

dan dapat menyebabkan kerusakan sel hati (sirosis hati) hingga kanker hati dan dapat menyebabkan kematian (Cahyono, 2010).

Pencegahan infeksi VHB dapat dilakukan melalui promosi kesehatan, melakukan imunisasi Hepatitis B, menjaga pola hidup sehat dan bersih, menghindari kontak langsung yang menimbulkan resiko terjadinya perpindahan virus, serta pemeriksaan atau diagnosis rutin kesehatan (Aini dan Susiloningsih, 2013; Wijayanti, 2016). Diagnosis Hepatitis B dapat dilakukan dengan dengan beberapa pendekatan salah satunya melalui deteksi *Hepatitis B Surface Antigen* (HBsAg). HBsAg adalah molekul protein permukaan virus yang merupakan penanda atau marker serologis pertama infeksi VHB (WHO, 2017).

Teknologi deteksi serologi molekuler berbasis protein dan sel seperti *Enzyme-Link Immuno Sorbent Assay* (ELISA), *Western Blotting*, *Imuno-chromatografi*, atau *Rapid Diagnosis Test* (RDT) telah dikembangkan untuk deteksi protein HBsAg. Tes diagnostik tersebut baik untuk tujuan riset maupun diagnostik komersial menggunakan antibodi sebagai agen biologi utamanya. Antibodi dikenal sebagai *bioagent detection* dikarenakan sifatnya yang dapat menempel spesifik terhadap antigen melalui ikatan antibodi-antigen. Penggunaan antibodi tersebut ternyata memiliki kelemahan sebagai *bioagent detection* suatu penyakit, diantaranya adalah tidak stabil dalam mendeteksi agen target, produksi dilakukan secara *in vivo*, biaya pembuatan mahal, dan waktu produksi yang lama (Zhuo *et al.*, 2017). Selain itu menurut Xi *et al.*, (2015), deteksi HBsAg dengan metode ELISA hanya mampu mendeteksi virus saat 6-8 minggu setelah terinfeksi VHB. Hal tersebut tidak efisien untuk dijadikan deteksi marker suatu penyakit infeksi. Oleh karena itu, diperlukan upaya lebih lanjut untuk menemukan metode deteksi

yang lebih sensitif untuk mempersingkat periode antara infeksi dan deteksi marker, serta untuk menghasilkan tes yang mudah dan dapat digunakan dalam skrining harian.

Belakangan ini sedang berkembang deteksi penyakit menggunakan aptamer. Aptamer adalah oligonukleotida untai tunggal DNA atau RNA yang memiliki tingkat afinitas yang tinggi terhadap molekul target (Sun and Zu, 2015). Aptamer pertama kali didapatkan oleh Turk and Gold (1990) berupa aptamer RNA yang dapat mengikat molekul T4 *bacteriophage polymerase*. Sejak saat itu pengembangan aptamer mulai dilakukan dalam berbagai tujuan deteksi secara molekuler (Budiarto, 2017).

Aptamer melalui struktur sekundernya dapat berikatan dengan berbagai bentuk molekul target seperti asam amino, protein, ion logam, bakteri, virus dan sel (Zhuo *et al.*, 2017). Pengaplikasian aptamer dalam bidang diagnostik kesehatan baru berkembang lima tahun belakangan ini dan telah banyak diciptakan aptamer spesifik dalam mendeteksi molekul penting penyebab penyakit (Budiarto, 2017). Aptamer memiliki kelebihan dalam mendeteksi marker penyebab penyakit diantaranya berupa asam nukleat yang mudah disintesis, memiliki spesifitas, afinitas, dan stabilitas yang tinggi terhadap molekul target, biaya produksi murah, dan dapat dilakukan secara *in vitro* serta waktu produksi cepat (Sun and Zu, 2015). Selain itu introduksi nanoteknologi dan teknologi *biochip* ke dalam riset aptamer telah meningkatkan akurasi deteksi sampai pikogram analit (Budiarto, 2017). Di Indonesia, belum ada penelitian terkait aptamer sebagai *bioagent detection* dalam diagnosis kesehatan.

Dengan tingginya prevalensi masyarakat Indonesia yang terinfeksi Hepatitis B serta kebutuhan akan metode deteksi yang lebih sensitif maka pengaplikasian aptamer untuk deteksi protein HBsAg perlu dilakukan. Aptamer yang spesifik berikatan dengan molekul target didapatkan melalui serangkaian proses seleksi dengan metode *Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment* (SELEX) (Sun and Zu, 2009; Zhuo *et al.*, 2017). Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) sedang mengembangkan DNA aptamer untuk deteksi Hepatitis B melalui beberapa marker salah satunya protein HBsAg pada Virus Hepatitis B. Kandidat aptamer telah didapatkan melalui proses seleksi dengan metode SELEX sebanyak 10 siklus seleksi.

Kandidat aptamer yang dihasilkan oleh LIPI perlu untuk diidentifikasi dan diperbanyak. Tahapan yang perlu dilakukan selanjutnya adalah proses amplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplikon yang dihasilkan akan digunakan lalu diidentifikasi dengan metode kloning dan sekuensing untuk mendapatkan sekuen aptamer spesifik (Sun and Zu, 2009; Zhuo *et al.*, 2017). Kloning adalah salah satu teknik dasar dalam pengembangan deteksi penyakit secara molekuler dengan cara menggandakan fragmen DNA target melalui proses perkembangbiakan sel bakteri (umumnya bakteri *Escherichia coli*) (Muladno, 2010). Selain itu, kloning juga digunakan untuk tujuan sekuensing dalam mengidentifikasi fragmen DNA produk PCR (Brown, 2010; Broker, 2012). Metode kloning dalam pengembangan aptamer sebagai *bioagent detection* digunakan untuk mendapatkan plasmid rekombinan yang membawa fragmen kandidat aptamer dengan tujuan untuk identifikasi sekuen aptamer yang dapat berikatan dengan molekul target (Sun and Zu, 2015).

Berdasarkan uraian yang sudah disampaikan, maka sudah dilakukan penelitian tentang “Kloning Kandidat Aptamer untuk Deteksi Protein HBsAg (*Hepatitis B Surface Antigen*) pada Virus Hepatitis B”.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana proses kloning untuk mendapatkan plasmid rekombinan pembawa fragmen kandidat aptamer untuk deteksi protein HBsAg pada VHB?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah melakukan kloning untuk mendapatkan plasmid rekombinan pembawa fragmen kandidat aptamer untuk deteksi protein HBsAg pada VHB.

D. Manfaat Penelitian

1. Sumbangan bagi ilmu pengetahuan terutama dibidang diagnostik kesehatan, molekuler dan bioteknologi.
2. Sebagai informasi dan data awal dari serangkaian tahapan penelitian guna mendapatkan kandidat aptamer untuk deteksi HBV.

BAB II

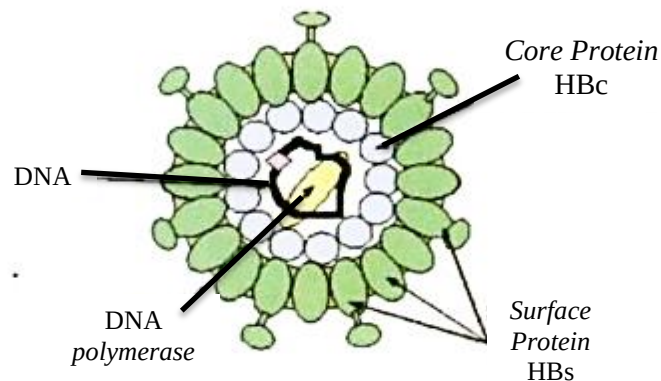
TINJAUAN PUSTAKA

A. Hepatitis B

Hepatitis B adalah penyakit radang hati yang disebabkan oleh VHB (Cahyono, 2010). Ada 2 jenis Hepatitis B yaitu, Hepatitis B akut dan Hepatitis B kronik. Hepatitis B akut terjadi pada pasien yang terinfeksi VHB selama kurang dari enam bulan dan dapat sembuh sejalan dengan pengobatan. Sedangkan Hepatitis B kronik terjadi apabila infeksi virus terus terjadi dalam kurun waktu yang lama dan tidak dapat disembuhkan (Sari dkk., 2008). Gejala hepatitis tidak selalu dapat dirasakan secara signifikan, karena gejala yang ditimbulkan tidak khas, seperti rasa lesu, nafsu makan berkurang, demam ringan, nyeri abdomen sebelah kanan, air kencing berwarna teh dan beberapa pasien memiliki gejala mata berwarna kuning (Sari dkk., 2008; Kemenkes, 2014; Liang, 2009).

Virus Hepatitis B adalah virus DNA berlapis ganda (*double shelled*) dengan diameter 42 nm dan berbentuk bulat (Cahyono, 2010). Virus Hepatitis B pertama kali ditemukan oleh Blumberg (1965) dan untuk pertama kali dapat diamati strukturnya dibawah mikroskop elektron pada tahun 1970 oleh Dane *et al.*, (Soemoharjo dan Gunawan, 2007). Struktur tubuh VHB terdiri atas *envelope* yang tersusun dari protein permukaan atau disebut juga dengan *Hepatitis B Surface Antigen* (HBsAg), *nucleocapsid* yang tersusun dari protein HBcAg (*Hepatitis B Core Antigen*), dan materi genetik berupa DNA untai ganda dengan panjang 3200 bp (Gambar 1). Protein-protein tersebut merupakan marker penting dalam

mendeteksi keberadaan VHB. Jika ditemukan dalam pemeriksaan, berarti seseorang tersebut positif terinfeksi VHB (Cahyono, 2010). Virus Hepatitis B termasuk virus Hepadna yaitu virus DNA yang spesifik menyerang hati (Soemoharjo dan Gunawan, 2007).



Gambar 1. Struktur Virus Hepatitis B (Cahyono, 2010).

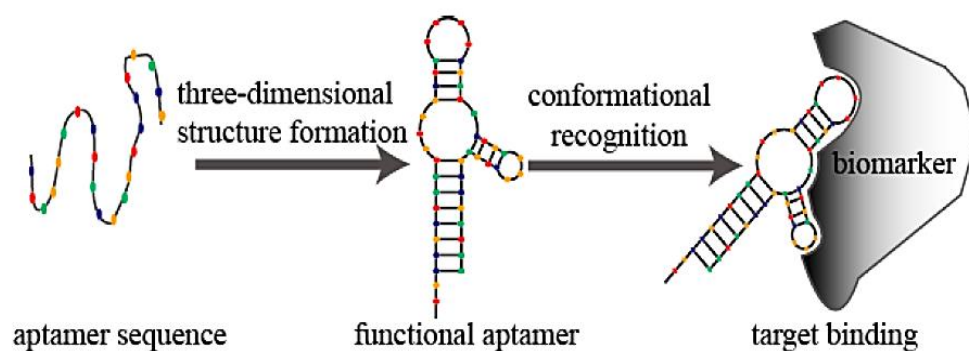
Masa inkubasi VHB terjadi dalam waktu yang pendek, yaitu 60-90 hari. Oleh karena itu, VHB 100 kali lebih infeksius dibandingkan virus HIV (Sari dkk., 2008). Virus Hepatitis B ditemukan di dalam darah, air ludah, air susu ibu (ASI), cairan sperma, dan vagina penderita. Penularan dapat terjadi melalui kontak dengan cairan yang mengandung virus, hubungan seksual, dan pada saat proses persalinan (Kemenkes, 2014).

Pemeriksaan laboratorium adalah upaya diagnosis yang terdiri atas tes serologi, tes biokimia, dan tes berbasis asam nukleat. Tes serologi dalam diagnosis Hepatitis B merupakan pemeriksaan kadar antigen maupun antibodi terhadap virus yang menyebabkan Hepatitis B, seperti pemeriksaan HBsAg, Anti-Hbs, HbcAg, dan Anti-HBc yang bertujuan sebagai diagnosis awal infeksi HBV. Tes biokimia merupakan pemeriksaan terhadap sejumlah parameter kimia, seperti

kadar IgM, IgG, dan lain sebagainya. Sedangkan tes berbasis asam nukleat merupakan pemeriksaan secara molekuler terhadap materi genetik VHB. Teknik molekuler yang umum digunakan untuk deteksi VHB adalah *polymerase chain reaction* (PCR) atau *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA). Teknik tersebut dapat mendeteksi asam nukleat virus seperti RNA atau DNA (Sari dkk., 2008; Wijayanti, 2016; WHO, 2017).

B. Aptamer dan Metode SELEX

Aptamer adalah oligonukleotida untai tunggal DNA atau RNA dari kumpulan pustaka acak yang dapat berikatan terhadap molekul target dengan afinitas yang tinggi. Aptamer tersusun atas 20-100 nukleotida yang dapat melipat membentuk struktur unik 3 dimensi dan membentuk struktur *stems* dan *loop* (Sun and Zu, 2015; Budiarto, 2017). Struktur unik tersebut terjadi akibat kemampuan untuk melakukan ikatan hidrogen antar masing-masing pasangan basa dan didukung oleh posisi acak dari basa, serta fleksibilitas ikatan *phosphodiester* (Gelinas *et al.*, 2016). Dalam bentuk unik tersebut aptamer mampu berikatan dengan molekul target secara spesifik seperti pada Gambar 2.

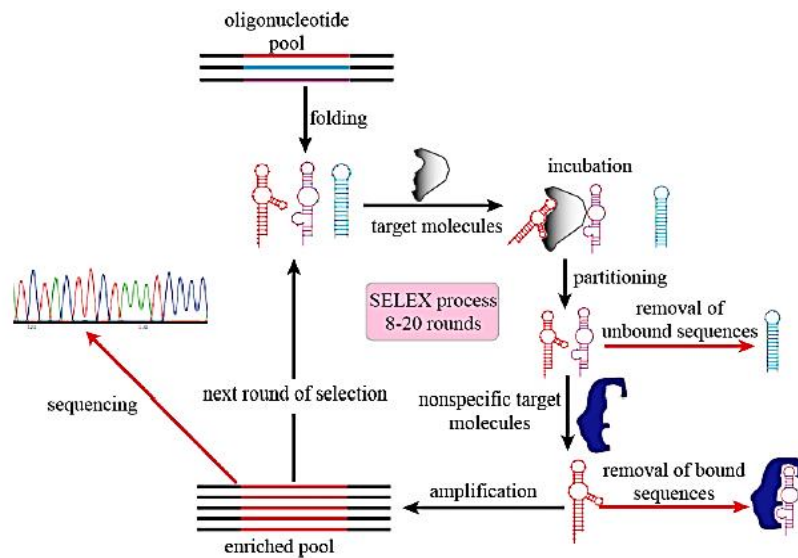


Gambar 2. Diagram Sistematis Cara Aptamer Berikatan dengan Molekul Target (Sun and Zu, 2015).

Aptamer ditemukan pertama kali oleh Tuerk and Gold (1990) melalui proses seleksi yang disebut *Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment* (SELEX), dimana dari hasil penelitiannya didapatkan aptamer dalam bentuk RNA yang berikatan dengan molekul T4 *bacteriophage polymerase*. Penemuan selanjutnya dilakukan oleh Ellington and Szostak (1992), yang mendapatkan aptamer dalam bentuk DNA yang berikatan dengan molekul target. Penemuan besar ini menjadi landasan utama perkembangan aplikasi aptamer dalam bidang biologi molekuler dan penelitian dibidang kesehatan.

Aptamer DNA dan aptamer RNA dibedakan berdasarkan penyusun nukleotidanya. Aptamer RNA memiliki komponen basa nitrogen yaitu *Adenine* (A), *Guanine* (G), *Cytosine* (C), dan *Uracil* (U) dengan gugus gulanya adalah gula ribosa. Sedangkan Aptamer DNA basa U digantikan dengan basa *Thymine* (T) dengan gugus gulanya adalah gula *dioxyribosa*. Keberadaan atom hidrogen bebas pada ujung gula *dioxyribosa* membuat aptamer DNA lebih stabil bahkan terhadap paparan enzim seperti enzim nuklease (Jolly and Ladomery, 2016). Oleh karena itu, dalam dunia diagnostik kesehatan aptamer yang banyak dikembangkan adalah aptamer DNA.

Aptamer didapatkan dari proses seleksi dengan metode SELEX, yaitu proses yang melibatkan pemurnian secara perlahan dari kumpulan basa yang memiliki afinitas tinggi untuk berikatan dengan molekul target (Tuerk and Gold, 1990). Proses SELEX dilakukan secara *in vitro* dan dilakukan berulang dimana setiap pengulangan terdapat beberapa tahapan perlakuan. Proses seleksi aptamer dengan metode SELEX dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Seleksi Aptamer dengan Metode SELEX (Sun and Zu, 2015).

Berdasarkan Gambar 3, diketahui tahapan umum dalam proses seleksi dengan metode SELEX diantaranya, 1) Preparasi kumpulan oligonukleotida awal: kumpulan oligonukleotida terdiri atas 10^{14} - 10^{15} urutan acak basa yang disintesis secara kimiawi terdiri atas 20-100 basa. Setiap utas oligonukleotida diapit oleh urutan basa yang dikenali oleh primer, 2) Inkubasi: sekuen oligonukleotida yang sudah membentuk struktur sekunder, diinkubasi bersamaan dengan molekul bebas (*non-target*) dan molekul target dalam larutan penyangga (pH 7 dan suhu tertentu). Dalam tahap ini, telah terjadi kompleks ikatan antara aptamer- molekul target, 3) Pemisahan: sekuen yang tidak berikatan dengan molekul target akan terpisah dengan sekuen yang terikat dengan molekul target, melalui beberapa cara seperti pencucian, filtrasi membran, *magnetic separation*, atau dengan elektroforesis kapiler, 4) Amplifikasi: sekuen yang mengikat molekul target dielusi lalu diamplifikasi dengan teknik PCR asimetri. Hasil amplifikasi dilanjutkan sebagai kumpulan aptamer awal untuk memulai siklus seleksi berikutnya, dan 5) Sekuensing: koleksi sekuen aptamer diidentifikasi

menggunakan metode kloning dan sekuensing (Sun and Zu, 2015; Budiarto, 2017; Zhuo *et al.*, 2017).

Pengulangan siklus SELEX bertujuan untuk menurunkan tingkat diversitas dari kumpulan oligonukleotida awal. Semakin banyak siklus SELEX, peluang mendapatkan kandidat aptamer yang memiliki tingkat afinitas tinggi terhadap molekul target semakin besar. Aptamer spesifik akan didapatkan setelah 8-20 siklus seleksi (Sun and Zu, 2015; Budiarto, 2017; Zhuo *et al.*, 2017).

Untuk meningkatkan efektifitas aptamer dan strategi seleksi dengan teknologi SELEX, dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu memodifikasi aptamer dengan mengoptimasi kandidat sekuen, memanipulasi struktur, dan menambahkan struktur tertentu pada oligonukleotida awal untuk meningkatkan pengikatan dengan molekul target (Hasegawa *et al.*, 2016); mengefisiensikan proses pemisahan antara *unbound-aptamer* dengan *target-aptamer*; dan memodifikasi proses amplifikasi dengan teknik PCR (Sun and Zu, 2015).

Aplikasi aptamer dalam bidang diagnostik molekuler saat ini berkembang pesat untuk mendapatkan aptamer yang dapat mendeteksi penyebab penyakit secara molekuler. Beberapa penelitian telah berhasil mendapatkan aptamer sebagai agen deteksi penyakit diantaranya, *Activable aptamer* yang dapat mendeteksi kanker hati melalui membran protein TLS11 sebagai molekul targetnya (Lai *et al.*, 2017), Aptamer RSV yang dapat mendeteksi *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) penyebab penyakit pada sistem pernapasan (Percze *et al.*, 2017), Aptamer Sgc8 yang dapat mendeteksi sel CCRF-CEM pada kasus kanker darah (Tan *et al.*, 2016), dan Aptamer XL-33 yang dapat mendeteksi sel metastasi pada kanker usus (X *et al.*, 2015).

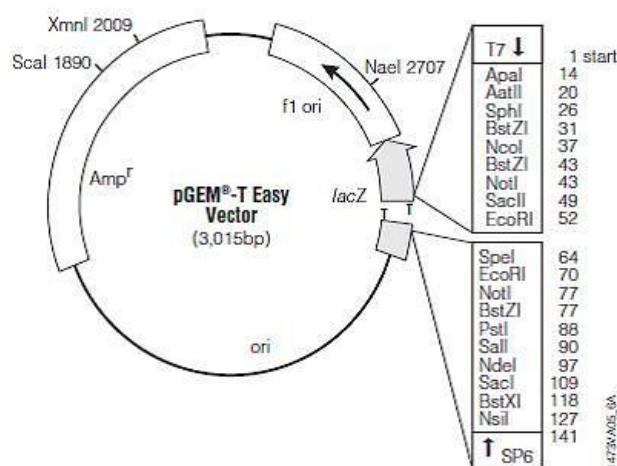
Proses mendapatkan aptamer bergantung kepada molekul target dan kandidat aptamernya. Dari penelitian Xi *et al.*, (2015) dilakukan seleksi aptamer terhadap protein permukaan virus dengan menyisipkan *magnetic nano particles* (MNPs) pada molekul target untuk mempermudah proses separasi *unbound-aptamer*. Dari 13 siklus SELEX yang dilakukan, didapatkan 3 kandidat aptamer yang selanjutnya di uji lagi hingga didapatkan 1 aptamer spesifik yang dapat mendeteksi HBsAg pada serum. Umumnya, aptamer spesifik akan didapatkan pada siklus akhir proses SELEX (Sun and Zu, 2019).

C. *pGEM-T Easy Vector*

Vektor adalah komponen penting dalam kloning gen yang merupakan molekul DNA yang dapat ditempatkan dalam suatu sel dan digunakan sebagai pembawa (*carrier*) DNA asing masuk ke dalam sel inang. Terdapat 3 jenis vektor yang digunakan dalam kloning gen, yaitu plasmid, bakteriofag dan kosmid. Syarat sebuah vektor agar dapat digunakan dalam kloning gen adalah 1) Memiliki titik *Origin of Replication* (ORI), sehingga mampu mengadakan replikasi di dalam sel inang. 2) Memiliki gen penanda atau *selectable marker*, yang paling umum adalah gen resisten antibiotik. 3) Memiliki situs untuk enzim *endonuclease* yang memudahkan manipulasi DNA (Brown, 2010).

Vektor yang paling umum digunakan dalam kloning gen adalah plasmid. Plasmid adalah DNA sirkular yang ditemukan pada bakteri dan organisme lain yang bisa bereplikasi sendiri di dalam suatu sel (Brown, 2010). Kebutuhan terhadap suatu vektor dalam proses kloning mendorong terciptanya vektor yang dapat mempermudah proses kloning gen, salah satunya adalah *pGEM-T easy vector* yang merupakan vektor-T (sebutan vektor pada TA kloning) dari perusahaan molekuler Promega yang sering digunakan dalam proses kloning.

pGEM-T easy vector didesain sedemikian mungkin untuk memudahkan proses kloning, diantaranya 1) Memiliki T-Overhang atau basa T tunggal pada kedua ujung 3' (3'-T) yang akan mempermudah proses ligasi dengan fragmen DNA *insert* hasil amplifikasi dengan teknik PCR. 2) Memiliki promotor T7 dan promotor SP6 RNA *polymerase* yang mengapit wilayah pengkode α -peptida dari enzim β -galaktosidase sehingga memungkinkan dilakukannya seleksi biru-putih plasmid rekombinan hasil kloning. 3) Memiliki banyak situs kloning (*multiple cloning site*) yang diapit oleh situs restriksi enzim *EcoRI*, *BstZI* dan *NotI*. 4) Memiliki gen penanda selektif (*selectable marker*) yaitu gen resisten antibiotik (Gambar. 4) (Promega, 2018).



Gambar 4. Peta dan Referensi Sekuens *pGEM-T Easy Vector* (Promega, 2018).

Protokol Vektor *pGEM-T easy vector* disertai dengan *2x Rapid Ligation Buffer*. Reaksi ligasi dengan menggunakan *buffer* ini dapat diinkubasi selama 1 jam dalam temperatur ruang. Untuk mendapatkan jumlah maksimum saat transformasi, dapat dilakukan dengan meningkatkan waktu inkubasi menjadi semalaman pada suhu 4°C (Promega, 2018).

D. *Escherichia coli* DH5 α

Escherichia coli (*E.coli*) merupakan salah satu jenis bakteri yang paling umum digunakan sebagai sel inang karena memiliki kemampuan replikasi yang tinggi, yaitu setiap 20-30 menit sekali. Selain itu bakteri ini juga dapat tumbuh pada medium sederhana maupun medium khusus, sehingga mudah untuk dikultur (Casali and Preston, 2003; Brown, 2010; Broker, 2012).

E. coli merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang pendek. Bakteri ini dapat hidup pada suhu 4-55°C dengan suhu optimum adalah 37°C. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar berbentuk bulat, berwarna putih keabu-abuan dengan permukaan yang rata (Tang *et al.*, 2015). *E. coli* dapat memfermentasikan laktosa karena memiliki enzim β -galaktosidase yang diinduksi oleh adanya laktosa. Laktosa di dalam medium dapat merangsang aktifnya *operon lac* untuk mengekspresikan enzim tersebut (Seager and Slabaugh, 2010). Enzim β -galaktosidase dapat memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa yang digunakan sebagai sumber energi (Ahern and Rajagopal, 2019).

E. coli DH5 α adalah jenis *E. coli* yang paling umum digunakan dalam kegiatan kloning. Bakteri *E. coli* DH5 α merupakan bakteri bersifat tidak patogen yang dikembangkan oleh D. Hanahan *et al.*, (1991) untuk tujuan kloning dalam pengerjaan laboratorium. Bakteri ini mampu mempertahankan dan memperkuat jumlah plasmid bahkan yang berukuran kecil dan kombinasi fragmen yang banyak (Kostylev *et al.*, 2015).

Bakteri ini memiliki banyak daerah mutasi yang berfungsi dalam meningkatkan efisiensi transformasi, meningkatkan stabilitas genetik dan mengurangi aktivitas enzim endonuklease. Beberapa jenis mutasi yang dirancang

pada *E.coli* DH5 α antara lain, mutasi *dlacZ* Delta M15 Delta (*lacZYA-argF*), U169 *recA1*, dan *endA1 hsdR17(rK-mK+)* *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*. Mutasi *recA1* berperan untuk mengurangi rekombinasi homolog untuk stabilitas DNA sisipan yang lebih baik, mutasi *endA1* berperan untuk menekan degradasi endonuklease sehingga tingkat transfer plasmid menjadi lebih tinggi, sedangkan mutasi *lacZM15* memungkinkan seleksi biru putih pada vektor rekombinan (Monk *et al.*, 2016). Karakter diatas merupakan karakter pembeda antara strain DH5 α dengan strain *E.coli* lainnya dalam prosedur kloning.

E. Kloning Gen

Kloning gen merupakan salah satu penerapan ilmu rekaya genetika yang dapat digunakan sebagai dasar diagnostik molekuler, yaitu berupa serangkaian proses perbanyakan fragmen gen target dengan menyisipkan DNA rekombinan ke dalam sel inang, seperti sel bakteri, sel ragi, dan sel mamalia (Brooker, 2012; Muladno, 2010).

Kloning gen melibatkan lima komponen utama, yaitu fragmen DNA atau gen yang akan dikloning (*insert*); DNA vektor berupa plasmid, bakteriofag atau cosmid; enzim restriksi, enzim ligase, dan sel inang (Campbell *et al.*, 1999). Langkah-langkah dasar dalam kloning gen menurut Brown (2010) adalah sebagai berikut, fragmen DNA yang mengandung gen target (*insert*) diinsersikan pada vektor kloning sehingga akan menghasilkan suatu molekul DNA rekombinan. Selanjutnya DNA rekombinan tersebut ditransformasikan ke dalam sel inang. Vektor akan mengadakan replikasi di dalam sel inang, sehingga menghasilkan banyak kopi atau turunan identik dari vektor dan fragmen *insert*. Ketika sel inang membelah, perbanyakan molekul DNA rekombinan tersebut diwariskan pada sel

anakan dan diikuti dengan replikasi vektor selanjutnya hingga didapatkan perbanyak sel inang yang membawa DNA rekombinan. Pada medium pertumbuhan akan terbentuk koloni sel inang, dimana koloni tersebut merupakan koloni sel inang yang identik.

Kloning produk PCR merupakan tahap yang sangat fundamental dalam bidang ilmu genetika dan bioteknologi. Kloning bertujuan untuk menganalisis dan mendapatkan informasi genomik (Celie *et al.*, 2016). Produk PCR umumnya diamplifikasi menggunakan enzim *Taq DNA polymerase*. Enzim ini memiliki preferensi untuk menambahkan basa *Adenine* tunggal pada ujung 5' (5'-A) pada DNA hasil PCR. Dengan begitu, fragmen DNA yang diamplifikasi dengan enzim tersebut memiliki fragmen *overhang* tunggal *Adenine* (A-overhang). Produk PCR tersebut dapat disisipkan ke dalam vektor-vektor yang telah dimodifikasi dan memiliki *overhang Thymine* (T-overhang) pada kedua ujungnya atau disebut dengan vektor-T. Penggabungan kedua ujung fragmen T-overhang dan A-overhang antara vektor dan fragmen DNA hasil PCR ini disebut dengan metode TA kloning (Brown, 2010).

TA kloning adalah metode subkloning yang bergantung kepada kemampuan basa A dan T pada fragmen yang berbeda untuk hibridisasi. Tahapan TA kloning tidak memerlukan restriksi dalam rekonstruksi *insert* dan vektor. Selain itu TA kloning ini juga dapat digunakan untuk mengkloning fragmen DNA yang belum diketahui sekuensnya (Sleight and Sauro, 2013). Oleh karena itu, metode TA kloning adalah metode yang paling umum digunakan untuk kloning produk PCR karena sederhana dan efektif dalam pelaksanaannya.

1. Amplifikasi Fragmen *Insert*

Amplifikasi atau perbanyak fragmen *insert* dilakukan dengan teknik PCR. PCR adalah teknik perbanyak enzimatis yang dilakukan secara *in vitro* dan menghasilkan fragmen DNA yang spesifik dalam jumlah banyak (Fatchiyah dkk., 2012). Komponen yang dibutuhkan dalam campuran PCR diantaranya, sample DNA sebagai DNA cetakan (*template*), enzim polimerase (umumnya *Taq DNA polymerase*), *buffer* PCR, dNTPs sebagai sumber basa nukleotida, $MgCl_2$, ddH_2O , dan sepasang primer sebagai penanda DNA *insert* (Huang *et al.*, 2006; Nurhayati dan Sri, 2017).

Langkah-langkah dasar dalam proses PCR menurut Brown (2010) adalah sebagai berikut, 1) Denaturasi DNA, yang berfungsi untuk memutuskan ikatan hidrogen pada struktur DNA yang semula untai ganda menjadi DNA untai tunggal, 2) *Annealing* (penempelan), dimana pada tahapan ini primer yang digunakan akan menempel pada untai tunggal DNA pada posisi yang spesifik, 3) Elongasi (sintesis), yaitu tahapan mensintesis basa-basa nukleotida hingga terbentuk untai DNA yang baru. Tahapan PCR tersebut diulang dalam beberapa siklus, dimana produk dari satu siklus menjadi DNA cetakan pada siklus berikutnya, hingga didapatkan kopi DNA dalam jumlah banyak.

2. Ligasi Fragmen *Insert* dan Vektor

Ligasi adalah proses penggabungan antara fragmen *insert* dengan vektor untuk membentuk vektor rekombinan. Proses ligasi dilakukan dengan menggunakan enzim *DNA ligase*. Enzim *DNA ligase* dapat mengkatalisis ikatan *phosphodiester* antara 5' *fosfat* dan 3'-*hidroksil* (Brown, 2010; Broker, 2012). Enzim yang biasanya digunakan adalah *T4 DNA ligase*. Ligasi antara fragmen

DNA dengan tipe *sticky end* umumnya dilakukan pada suhu 12-15°C sedangkan ligasi terhadap fragmen DNA dengan tipe *blunt end* umumnya dilakukan pada suhu ruang (>30°C) dengan 10-100 kali lipat jumlah enzim yang digunakan daripada ligasi fragmen DNA dengan tipe *sticky end* (Broker, 2012). Hasil dari ligasi antara fragmen dengan ujung *sticky end* lebih kuat karena membentuk pasangan yang komplement (Brown, 2010).

3. Transformasi DNA Rekombinan

Transformasi adalah salah satu cara perpindahan materi genetik pada sel bakteri yang mana dapat merubah materi genetik pada sel bakteri tersebut (Panja *et al.*, 2008). Prinsip ini diterapkan dalam salah satu tahapan kloning, yaitu menyisipkan plasmid rekombinan ke dalam sel hidup untuk dapat diperbanyak melalui pertumbuhan sel tersebut. Sel hidup disini disebut dengan sel inang (Brooker, 2012; Muladno, 2010).

Proses transformasi dapat terjadi secara alami, tetapi untuk meningkatkan efisiensi transformasi dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya, menjadikan sel inang menjadi kompeten dan memberikan perlakuan khusus pada tahapan transformasi yang menyebabkan DNA plasmid dapat masuk dengan mudah ke dalam sel inang. Umumnya tahapan transformasi dilakukan dengan metode kejutan panas (*heat shock*). Metode *heat shock* merupakan metode yang paling sederhana yang dapat menyebabkan pori-pori pada membran sel terbuka dalam waktu singkat dan siap menerima DNA plasmid yang akan masuk. Menurut Brown (2010), pemanasan menimbulkan gradien panas yang menyebabkan masuknya komponen diluar sel (DNA plasmid).

Selain itu untuk meningkatkan efisiensi transformasi, dapat dilakukan dengan memberikan perlakuan khusus terhadap sel inang agar menjadi kompeten, sehingga dapat menerima atau mentransformasikan DNA ekstrakromosomal dari lingkungan. Pembuatan sel menjadi kompeten dapat dilakukan dengan perlakuan fisik dan dengan menggunakan larutan kimia.

Pembuatan sel *E.coli* menjadi kompeten harus dilakukan saat pertumbuhan sel bakteri pada fase log atau eksponensial dan fase lag (Ryu and Hartin, 1990). Pada fase log atau lag disebut *steady state* dimana sel dalam keadaan mendapatkan sumber nutrisi paling baik, sehingga dapat tumbuh dengan optimal. Fase tersebut dapat diketahui dengan mengukur nilai *Optical Density* (OD) dari medium kultur yang digunakan. Tsen *et al.* (2002) mengemukakan bahwa nilai OD600 nm, 0,35 hingga 0,45 termasuk terbaik untuk menginduksi *E.coli* DH5 α menjadi sel kompeten. Nilai OD600nm, 0,4 dapat dicapai dalam waktu inkubasi 3 jam (Sekse *et al.*, 2012) hingga 4 jam (Casali and Preston, 2003).

4. Seleksi Antibiotik dan Seleksi Biru-Putih

Penapisan atau skrining merupakan tahapan menyeleksi plasmid rekombinan hasil kloning. Skrining dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan menguji sensitifitas dan resistensi terhadap antibiotik dan menumbuhkan sel transforman pada medium selektif nutrien seperti selektif biru putih. Medium selektif dengan penambahan antibiotik merupakan salah satu metode seleksi hasil transformasi, dimana akan menyeleksi koloni yang tidak memiliki gen resisten antibiotik. Gen resisten antibiotik terdapat pada vektor plasmid yang digunakan (*pGEM-T easy vector*), sehingga koloni yang tumbuh diharapkan adalah koloni yang membawa plasmid vektor (Rahmawati, 2012).

Selain itu seleksi biru-putih dilakukan dengan penambahan larutan X-Gal (5-bromo kloro-indolil- β -D-galaktosa) dan IPTG (*Isopropyl- Thiogalactoside*) pada medium pertumbuhan. Seleksi biru-putih digunakan untuk menyeleksi koloni yang memiliki plasmid rekombinan pembawa fragmen *insert*. Fragmen *insert* bergabung dengan *pGEM-T easy vector* dalam ORF *LacZ* yang menyandikan enzim β -galaktosidase. Enzim β -galaktosidase akan memecah X-Gal (substrat laktosa) dan dibantu oleh IPTG sebagai penginduksi sehingga menghasilkan senyawa glukosa dan galaktosa. Selanjutnya, senyawa kedua akan dioksidasi menjadi senyawa 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo, senyawa berwarna biru yang tidak larut. Ketika fragmen *insert* terligasi dengan plasmid vektor pada ORF *LacZ* maka enzim β -galaktosidase tidak dapat tersandikan dan tidak akan terbentuk senyawa biru tersebut (Aprigiyonies, 2011; Ahern and Rajagopal, 2019).

F. Isolasi DNA Plasmid

Isolasi DNA adalah teknik yang dilakukan untuk memisahkan DNA dari zat yang lain di dalam sel. Fungsi dari pengisolasian DNA adalah mendapatkan DNA murni dari dalam sel yang akan digunakan untuk penganalisisan genotip suatu organisme (Yuwono, 2005).

Isolasi Plasmid terdiri atas tiga tahapan utama, yaitu tahapan kultivasi dan pemanenan atau *harvesting* untuk mendapatkan plasmid dalam jumlah banyak dengan melakukan kultur bakteri semalaman di dalam medium spesifiknya, selanjutnya tahapan lisis, untuk merusak dinding sel bakteri dengan cara mekanis dan penambahan larutan lisis seperti *RNAse*, *DNAse*, dan lain sebagainya.

Terakhir, tahapan pemurnian DNA plasmid, untuk membebaskan DNA plasmid dari berbagai kontaminan dengan penambahan fenol, lalu hasil isolasi plasmid dapat disimpan (Brown, 2010). Penambahan alkohol 70% selama tahapan pemurnian dapat menghilangkan pelarut sehingga yang diharapkan tersisa hanya DNA plasmid (Broker, 2012; Nurhayari dan Sari, 2017).

and Guthri (2013) menjelaskan bahwa, untuk menjadikan koloni bakteri sebagai *template* PCR perlu dilakukan pengenceran koloni bakteri dengan *buffer* spesifik terlebih dahulu atau DNA perlu diekstraksi dari bakteri melalui teknik setrifugasi.

PCR-Koloni yang dilakukan tidak bisa digunakan untuk memastikan keberadaan fragmen *insert*. Oleh karena itu, dilakukan konfirmasi *insert* kembali menggunakan hasil isolasi plasmid dari koloni positif. Isolasi plasmid dilakukan dengan menggunakan kit dari GeneAid yaitu *PrestoTM Mini Plasmid Kit* yang menggunakan prinsip sentrifugasi dan presipitasi serta penambahan larutan untuk mengisolasi DNA plasmid.

Isolasi DNA pada bakteri melibatkan tiga tahapan, yaitu 1) kultivasi, 2) perusakan sel dan ekstraksi DNA, dan 3) pemurnian DNA (Brown, 2010; Nurhayati dan Sri, 2017). Setelah mendapatkan kultur sel bakteri, selanjutnya ditambahkan beberapa larutan lisis yang berfungsi melisiskan dinding sel, membran sel dan beberapa makromolekul seperti protein, karbohidrat dan lemak (Brown, 2010). Larutan *buffer* PD1 mengandung *RNAse* yang dapat merusak molekul RNA. Selain itu PD1 mengandung *buffer* Tris yang berfungsi sebagai larutan penyangga dan EDTA yang berfungsi mengikat kofaktor agar DNA tidak terdegradasi. PD2 berfungsi melepaskan plasmid dari sel bakteri, berisi larutan SDS yang berfungsi untuk merusak membran sel bakteri dengan cara menghancurkan lemak yang terdapat dalam membran sel bakteri dan larutan NaOH yang berfungsi sebagai pemberi suasana basa (pH menjadi 12,0-1,5) yang dapat memutuskan ikatan hidreogen DNA *non-supercoloid* atau DNA kromosom tetapi tidak dengan DNA plasmid (Brown, 2010).

PD3 atau larutan garam tinggi menyebabkan penurunan pH dari basa ke asam sehingga DNA yang telah terdenaturasi akan mengelompok dan beragregasi membentuk suatu emulsi dan dapat diendapkan dengan sentrifugasi bersamaan dengan membran dan dinding sel serta RNA yang mengendap sebagai pelet. DNA plasmid berada pada supernatan atau tidak ikut mengendap dengan komponen lainnya. Supernatan dipindahkan ke dalam *column* untuk proses pemurnian. Pemisahan molekul dengan membran filter pada *column* akan memisahkan antara DNA plasmid dengan larutan lisis, dimana DNA plasmid akan berada pada membran filter *column*. Pemberian larutan *washing* yang mengandung etanol berfungsi mengendapkan DNA plasmid pada membran filter dan melarutkan garam-garam dan pengotor lainnya yang akan tersaring dan berada pada tabung penampung (Mawardi dan Ramandey, 2017). Selanjutnya koleksi DNA plasmid dengan pemberian *ellution buffer* untuk melarutkan DNA plasmid pada membran filter *column*. Pada tahap ini telah didapatkan plasmid rekombinan dari koloni positif.

Dikarenakan PCR-Koloni tidak dapat memastikan bahwa koloni positif membawa fragmen *insert* maka dilakukan konfirmasi kembali keberadaan *insert* menggunakan hasil isolasi plasmid sebagai *template* PCR. Visualisasi PCR hasil isolasi plasmid dapat diamati pada Gambar 9. Dari hasil visualisasi tersebut didapatkan gambaran bahwa plasmid rekombinan dari koloni positif benar membawa fragmen *insert*.

Pita DNA yang berada sejajar dengan kontrol adalah DNA yang berukuran <100 bp yang merupakan ukuran dari fragmen *insert*. DNA yang berada dekat dengan marker 3000 bp merupakan sisa *template* PCR atau sisa plasmid

rekombinan yang tidak ikut teramplifikasi. Ukuran plasmid rekombinan yaitu kisaran 3035-3115 bp, yang merupakan gabungan dari ukuran plasmid vektor (3015 bp) dan fragmen *insert* (20-100 bp). Sedangkan pita DNA yang berada diatas atau dibawah marker 3000 bp diindikasikan merupakan bentuk lain dari plasmid. Diketahui bahwa plasmid memiliki 3 jenis konformasi yaitu, sirkuler, linear dan superkoil. Perbedaan konformasi tersebut mempengaruhi pergerakan fragmen DNA pada gel agarose. Plasmid yang memiliki putaran (koil) lebih banyak memiliki bentuk yang lebih kompak sehingga lebih mudah melalui pori-pori dalam gel agarose daripada plasmid yang putarannya lebih sedikit (Novianthy, 2009).

Dengan begitu masing-masing plasmid rekombinan tersebut dikonfirmasi membawa fragmen DNA *insert*. Dari keseluruhan konfirmasi dengan plasmid hasil isolasi yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 9, didapatkan 30 plasmid rekombinan pembawa fragmen *insert*. Hasil isolasi plasmid yang mempresentasikan ukuran yang sesuai sebaiknya disekuensing untuk memastikan bahwa fragmen *insert* tersebut adalah kandidat aptamer dari hasil seleksi yang dilakukan atau dengan kata lain adalah untuk mendapatkan aptamer yang dapat berikatan dengan protein HBsAg.

Keberhasilan konfirmasi plasmid rekombinan pembawa fragmen *insert* didapatkan dari beberapa kali pengulangan percobaan. Jika dilihat dari warna koloni bakteri yang tumbuh, ternyata tidak menutup kemungkinan terjadi hasil negatif-palsu. Dimana pada penelitian yang dilakukan, koloni biru pada medium selektif setelah diisolasi dan di amplifikasi dengan teknik PCR ternyata memvisualisasikan pita DNA sesuai dengan ukuran target. Hal ini dapat terjadi

dikarenakan fragmen *insert* tidak tersisipi pada daerah *lacZ* sehingga gen tersebut tetap mensintesis β -galaktosidase untuk mencerna X-gal dan menghasilkan produk berwarna biru.

Setelah didapatkan plasmid rekombinan pembawa fragmen *insert*, dilakukan penyimpanan kultur sel bakteri positif pembawa fragmen *insert* dalam larutan preservasi yang berfungsi untuk menyimpan kultur sel dalam waktu yang lama. Penyimpanan kultur sel bakteri positif dilakukan dengan menambahkan larutan gliserol 40% sebanyak 1:1 dengan kultur sel bakteri. Penambahan larutan preservasi berfungsi untuk menjaga viabilitas sel agar tidak rusak atau lisis sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama (Machmud, 2001).

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Pada Penelitian ini didapatkan kesimpulan bahwa kandidat aptamer hasil seleksi dengan metode SELEX berhasil diamplifikasi, kemudian diligasi dengan vektor *pGEM-T easy vector* dan ditransformasikan ke dalam bakteri *E.coli* DH5 α . Didapatkan 30 plasmid rekombinan pembawa fragmen *insert* (kandidat aptamer) yang akan digunakan dalam analisis berikutnya untuk mendapatkan aptamer terbaik sebagai deteksi protien HBsAg.

B. Saran

Pada tahapan PCR-Koloni untuk konfirmasi keberadaan *insert*, sebaiknya dilakukan sesuai dengan protokol PCR-koloni. Hal ini dilakukan untuk meminimalisir penggunaan koloni bakteri, waktu, dan reagen PCR. Selain itu perlu dilakukan sekuensing terhadap hasil isolasi plasmid rekombinan. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa fragmen *insert* yang didapatkan adalah kandidat aptamer dari hasil seleksi yang dilakukan atau dengan kata lain adalah untuk mendapatkan aptamer yang dapat berikatan dengan protein HBsAg.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, K. dan Rajagopal, I. 2019. Biochemistry Free and Easy: A Lac Z Blue White Screening, Oregon Satet University. Bio.Libretexs. [https://bio.libretexs.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistr y_Free_and_Easy_\(Ahern_and_Rajagopal\)/09%3A_Techniques/9.14%3A_ Lac_Z_Blue-White_Screening](https://bio.libretexs.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistr y_Free_and_Easy_(Ahern_and_Rajagopal)/09%3A_Techniques/9.14%3A_ Lac_Z_Blue-White_Screening). (di akses pada tanggal 20 Desember 2019).
- Aini, R. dan Susiloningsih, J. 2013. Faktor Resiko yang Berhubungan dengan Kejadian Hepatitis B pada Pondok Pesantren Putri Ibnul Qoyyim Yogyakarta. *Jurnal Sains Medika*, 5(1), 30-33.
- Aprigiyonies, Fika Enri. 2011. Kloning dan Sekuensing Gen *L-Asparaginase* yang Berasal dari Bakteri *Erwinia Raphonticida* dan *Bacillus Circulans* di *E. Coli*. *Skripsi*. FMIPA Universitas Indonesia.
- Artati, Diah. 2013. Sensitivitas Gel Red sebagai Pewarna DNA pada Gel Elektroforesis. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 11(1): 11-14.
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., and Reham, Yasir. 2017. Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Bergkessel, M., and Guthri, C. 2013. Colony PCR. *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, 529:299–309.
- Brooker, Robert J. 2012. *Genetics Analysis and Principles, Fourth Edition*. New York: McGraw-Hill.
- Brown, T. A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 6th Ed.*, United Kingdom: Weley-Blackwell Publishing,
- Budiarto, Bugi Ratno. 2017. Mengenal Aptamer si Oligonukleotida Pintar dalam Diagnostik Molekuler. *Jurnal BioTrends*, 8(2).
- Cahyono, Suharjo B. 2010. *Hepatitis B, Cegah Kanker Hati*. Yogyakarta: Kanisius.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., and Mitchell, L. G. 1999. *DNA Technology. In; Biology 5th Edition*. California: Addison Wesley Longman Inc.
- Casali, N. and Preston, A. 2003. *E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*. New Jersey: Humana Press.
- Celie, P.H., Parret, A.H., and Perrakis, A. 2016. Recombinant Cloning Strategies for Protein Expression. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 38: 145–154.

- Ellington, A. D., and Szostak, J. W. 1992. Selection *In vitro* of Singel-stranded DNA Molecules that Fold into Spesific Ligand-binding Structures. *Nature*, 355.
- Fatchiyah, Widyarti, S., Arumningtyas, Estri L, dan Permana, S. 2012. Buku Praktikum Teknik Analisa Biologi Molekuler. Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.
- Gelinas, A. D., Davies, D. R., and Janjic, N. 2016. Embracing Proteins: Structural Themes in Aptamer–protein Complexes. *Current Opinion in Structural Biology*. 36: 122-132.
- Hanahan, D., Joel, J., and Bloom, F.R. 1991. Plasmid Transformation of *E.coli* and other Bacteria. *Methods in Enzymology*, 204: 63–113.
- Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K., and Ikebukuro, K. 2016. Methods for Improving Aptamer Binding Affinity, Review. *Molecules*, 21(421).
- Huang, J., Wang, G., and Xiao, L. 2006. Cloning, Sequencing and Expression of the Xylanase Gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*, *Journal Bioresource Technology*, 97:802–808.
- Jolly, P., Estrela, P., and Lodomery, M. 2016. Oligonucleotide-based Systems: DNA, microRNAs, DNA/RNA Aptamers. *Essays in Biochemistry*, 60(1): 27-35.
- Kementrian Kesehatan RI. 2014. *Pusat Data dan Informasi, Situasi dan Analisis Hepatitis*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Kementrian Kesehatan RI. 2019. *Hari Kanker Sedunia 2019*, <https://www.depkes.go.id/article/view/19020100003hari-kanke-sedunia-2019.html>. (di akses pada tanggal 13 Juli 2019).
- Koontz, Laura. 2013. Agarose Gel Electrophoresis. *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*, 529:35–45.
- Kostylev, M., Otwell, Anne E., Richardson, Ruth E., and Suzuki, Y. 2015. Cloning Should be Simple: *Escherichia coli* DH5 α -Mediated Assembly of Multiple Fragment with Short End Homologies. *PLoS ONE*, 10(9).
- Lai, Z., Tan, J., Wan, R., Tan, J., Zhang, Z., Hu, Z., and He, J. 2017. An ‘Activatable’ Aptamer Based Fluorescence Probe for the Detection of HepG2 Cells. *Oncology Reports*, 37(5): 2688-2694.
- Liang, T. J. 2009. Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology*, 49(S5): S13–S21.
- Machmud, Muhammad. 2001. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio*. 4(1), 24-32.

- Mawardi, A., dan Ramandey, Euniche R.P.F. 2017. Ligasi dan Transformasi Gen MSP1 *Plasmodium falciparum* Penyebab Malaria di Kota Jayapura. *MKB*, 49(4): 213-223.
- Melcrová, A., Pokorna, S., Pullanchery, S., Kohagen, M., Jurkiewicz, P., Hof, M.,..... 2016. The Complex Nature of Calcium Cation Interactions with Phospholipid Bilayers. *Sci. Rep*, 6:38035.
- Monk, Jonathan. M., Koza, A., Campodonico, Migual. A., Machado, D., Seoane, Jose. M., Palsson, Bernhard. O.,..... 2016. Multi-omics Quantification of Species Variation of *Escherichia coli* Links Molecular Features with Strain Phenotypes. *Cell Systems*, 3(3): 238–251.
- Muladno. 2010. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirra Usaha Muda.
- Novianthy, Dwi. 2009. Konstruksi Gen *Kitinase* untuk Ketahanan terhadap *Ganoderma* pada Vektor Ekspresi pCambia 1303, *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Nurhayari, Betty, dan Darmawati, S. 2017. *Biologi Sel dan Molekuler. Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medis (TLM)*. Kemenkes RI: Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Panja, S., Aich, P., Jana, B., and Basu, T. 2008. Plasmid DNA Binds to the Core Oligosaccharide Domain of LPS Molecules of *E. Coli* Cell Surface in The CaCl₂- Mediated Transformation Process. *Biomacromolecule*, 9: 2501–2509.
- Percze, K., Szakács, Z., Scholz, É., András, J., Szeitner, Z., Van Den Kieboom, C. H., and Mészáros, T. 2017. Aptamers for Respiratory Syncytial Virus Detection. *Scientific Reports*, 7.
- Promega. 2018. *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual Handbook*, <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol>. (di akses pada tanggal 12 Agustus 2019).
- Radji, M. 2011. *Rekayasa Genetika Pengantar untuk Profesi Kesehatan*. Jakarta: Penerbit Sagung Seto.
- Rahmawati, Previta Zeizar. 2012. Kloning Gen Penyandi Endo-1,4-B-Xilanase Asal Isolat A Bakteri Xilanolitik Sistem Abdominal Rayap Tanah pada *E.coli* Top10 (pET-30a(+)), *Skripsi*. Universitas Airlangga.
- Ryu, J., and Hartin, RJ. (1990). Quick Transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *Biotechniques*, 8(1):43-45.
- Sambrook, J., and Russel, I. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Volume 2*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.

- Sari, W., Indrawati, L., dan Djing, Oei G. 2008. *Care Yourself, Hepatitis*. Jakarta: Penerbit Penebar Plus+.
- Seager, S. L. and Slabaugh, M. R. 2010. *Organic and Biochemistry for Today, Seventh Edition*. California: Cengage Learning.
- Sekse, C., Bohlin, J., Skjerve, E., and Vegarud, G. E. 2012. Growth Comparison of Several *Escherichia coli* Exposed to Various Concentration of Lactoferrin Using Linear Spline Regression. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(5): 1-12.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23): 8746-8749.
- Sleight, S.C. and Sauro, H.M. 2013. BioBrick™ Assembly Usin The In-Fusion PCR Kloning Kit. In; Polizzi, K., Kontoravdi, C.,..... *Synthetic Biology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Vol. 1073. Totowa: Humana Press.
- Soemoharjo, S., dan Gunawan, S. 2007. *Hepatitis Virus B, Edisi 2*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sun, H., and Zu, Y. 2015. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application, Review. *Jurnal Molecules*, 20: 11959-11980.
- Tan, J., Yang, N., Hu, Z., Su, J., Zhong, J., Yang, Y., and Lai, Z. 2016. Aptamerfunctionalized Fluorescent Silica Nanoparticles for Highly Sensitive Detection of Leukemia Cells. *Nanoscale research letters*, 11(1):298.
- Tang, Y., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., and Schwartzman, J. 2015. *Molecular Medical Microbiology, Volume 1, Second Edition*. London Academic Press.
- Tsen, S. D., Fang, S. S., Chen, M. J., Chien, J. Y., Lee, C. C., and Tsen, D. H. 2002. Natural Plasmid Transformation in *Escherichia coli*. *J. Biomed. Sci.* 9:246–252.
- Tuerk C., and Gold L. 1990. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Jurnal Science*. 249: 505–510.
- Wijayanti, Ika Budi. 2016. Efektifitas HBsAg- *Rapid Screening Test* untuk Deteksi Dini Hepatitis B. *Jurnal KesMaDaSka* :29-34.
- World Health Organization (WHO). 2017. *Guidlines On Hepatitis B and C Testing*, <https://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>. (di akses pada tanggal 11 Desember 2019).
- X, Li., Y, An., J, Jin., Z, Zhu., L, Liu., Y, Shi.,..... 2015. Evolution of DNA Aptamers Through In Vitro Metastatic-cell-based Systematic Evolution of

Ligand by Exponential Enrichment for Metastatic Cancer Recognition and Imaging. *Analytical Chemistry*, 87(9): 4941-4948.

Xi, Z., Huang, R., Li, Z., He, N., Wang, T., Su, E., and Deng, Y. 2015. Selection of HBsAg-Specific DNA Aptamers Based on Carboxylated Magnetic Nanoparticles and Their Application in The Rapid and Simple Detection of Hepatitis B Virus Infection. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7: 11215-11223.

Yuwono, Triwibowo. 2005. *Biologi Molekular*. Jakarta: Erlangga.

Yuwono, Triwibowo. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Penerbit Andi.

Zhang, H., Zhang, Z., Li, J., and Cai, S. 2007. Effects of Mg^{2+} on Supported Bilayer Membrane on a Glassy Carbon Electrode During Membrane Formation. *International Journal of Electrochemical Science*, 2:788-796.

Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li Jie, Z., Zongkang, L., Jin, W., Xiaohao, L.,..... 2017. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(10): 2142.