

**Nama Rumpun Ilmu: Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal**

**LAPORAN KEMAJUAN  
PENELITIAN DOSEN MUDA**



**OPTIMASI METODE GO-SELEX (*Graphene Oxide-Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) PADA SELEKSI APTAMER DENGAN TARGET GELATIN BABI (*Sus scrofa domestica*)**

**PENGUSUL**

**HARI WIDADA, M.Sc., Apt. NIDN: 0521077701**

**ARKO JATMIKO WICAKSONO, M.Sc., Apt. NIDN: 0520098701**

**PRODI FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA  
AGUSTUS 2017**

**HALAMAN PENGESAHAN  
LAPORAN KEMAJUAN  
PENELITIAN DOSEN MUDA**

---

Judul Penelitian : Optimasi Metode GO-SELEX (*Graphene Oxide-Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) pada Seleksi Aptamer dengan Target Gelatin Babi (*Sus scrofa domestica*)

Kode/ Nama Rumpun Ilmu : 404/ Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal

Topik Unggulan : Penelitian Analisis Kehalalan Produk

Ketua Peneliti:

a. Nama Lengkap : Hari Widada, M.Sc., Apt

b. NIDN : 0521077701

c. Jabatan Fungsional : -

d. Program Studi : Farmasi

e. Nomor HP : 085229595005

f. Alamat surel (email) : hr.widada@gmail.com

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Arko Jatmiko Wicaksono, M.Sc., Apt

b. NIDN : 0520098701

c. Jabatan Fungsional : -

d. Program Studi : Farmasi

Lama Penelitian Keseluruhan: 1 tahun.

Penelitian Tahun ke- : 1

Biaya Penelitian Keseluruhan: Rp.

Biaya Tahun Berjalan : - diusulkan ke DRPM Rp. 10.000.000,-  
- Dana internal PT Rp. -  
- Dana institusi lain Rp. -

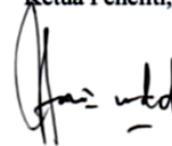
Yogyakarta, 30 Agustus 2017

Mengetahui,  
Dekan



(Sabtanti Harimurti, Ph.D., Apt)  
NIK.19730223201310173127

Ketua Peneliti,



(Hari Widada, M.Sc., Apt.)  
NIK. 19770721201004173120

## IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

---

1. Judul Penelitian : Optimasi Metode GO-SELEX (*Graphene Oxide-Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) pada Seleksi Aptamer dengan Target Gelatin Babi (*Sus scrofa domestica*)

2. Tim Peneliti :

No	Nama	Jabatan Fungsional	Bidang Keahlian	Institusi Asal	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1	Hari Widada, M.Sc.,Apt	-	Biologi Molekuler	UMY	20
2	Arko Jatmiko Wicaksono, M.Sc.,Apt	-	Kimia Analisis	UMY	20

3. Objek Penelitian : DNA dan protein (antigen-abtibodi), dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*

4. Masa Pelaksanaan :

Mulai : bulan : Januari, tahun: 2017

Berakhir : bulan : Agustus, tahun: 2017

5. Usulan Biaya DRPN Ditjen Penguatan Risbang:

- Tahun ke-1 : Rp. 10,000,000,00

6. Lokasi Penelitian : Laboratorium Farmasi UMY dan LPPT UGM

7. Institusi Lain yang Terlibat: -

8. Temuan yang ditargetkan: dari penelitian ini akan dihasilkan alat deteksi berbasis DNA dan protein yakni suatu aptamer dan antibody yang dihasilkan dari antigen protein troponin I. Aptamer merupakan suatu ssDNA yang dapat berikatan secara spesifik dengan molekul target dalam hal ini adalah gelatin babi. Aptamer ini diseleksi dari pustaka ssDNA sengan metode SELEX yang dimodifikasi dengan penggunaan grafen oksida. Antibodi diproduksi dengan protocol untuk menghasilkan antibody monoklonal. DNA aptamer merupakan terobosan baru dalam pengembangan deteksi kontanan babi dalam autentikasi halal.

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang Ilmu: penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan pengembangan yang fondamental dalam metode deteksi untuk autentikasi halal produk farmasi. Sejauh ini di Indonesia tidak banyak yang melakukan penelitian yang bertujuan mengembangkan alat deteksi cepat berbasis Biologi Molekuler untuk autentikasi halal produk pangan dan farmasi. Aplikasi DNA aptamer dalam pengembangan deteksi halal adalah terobosan baru yang ditawarkan sebagai alternatif yang mempunyai prospek yang baik. Pemanfaatan aptamer sejauh ini sudah sangat luas dalam deteksi penyakit dan terapi, akantetapi untuk aplikasi deteksi di bidang pangan masih terbatas pada deteksi kontaminan bahan berbahaya maupun cemaran mikroorganisme. Demikian juga dengan produksi antibody monoklonal sebagai alat deteksi, diharapkan dapat menjadi alternatif bagi pengembangan alat deteksi sebagai kompetitor terhadap produk alat deteksi impor

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
RINGKASAN .....	v
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
C. Temuan yang ditargetkan serta kontribusinya terhadap Ilmu Pengetahuan.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>3</b>
A. Aptamer dan Metode SELEX.....	3
B. Grafen Oksida.....	5
C. Gelatin .....	5
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>7</b>
A. Bahan Penelitian.....	7
B. Alat Penelitian .....	8
C. Jalannya Penelitian .....	8
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>9</b>
A. Hasil.....	9
B. Pembahasan .....	9
<b>REFERENSI.....</b>	<b>9</b>

## RINGKASAN

Temuan kasus pencampuran bahan nonhalal dengan bahan halal menjadi masalah yang harus selalu diwaspadai, demi memberikan jaminan kenyamanan bagi umat muslim dalam beribadah. Pengembangan teknologi deteksi komponen non-halal menjadi penting untuk dilakukan. Metode atau alat deteksi yang memiliki akurasi dan sensitifitas tinggi, murah, dan mudah dijangkau akan sangat membantu proses pengawasan.

Alat deteksi kontaminan halal yang dapat diaplikasi di lapangan dengan cepat, efisien, *portable* dan dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah banyak seperti *strip test* saat ini masih terbatas serta harus diimpor dari luar negeri. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan alat deteksi cepat terhadap kontaminan halal dalam produk makanan maupun farmasi yang berbasis DNA aptamer. DNA aptamer suatu molekul yang memiliki karakter yang analog dengan antibodi, dapat diseleksi dari suatu pustaka oligonukleotida dengan metode SELEX. Metode SELEX yang dimodifikasi dengan aplikasi grafen oksida (GO-SELEX) dilakukan untuk meningkatkan efisiensi proses seleksi. Seleksi 10 siklus dengan masing-masing diikuti dengan pemurnian menggunakan teknik PCR asimetris. Sequencing dilakukan terhadap 25 aptamer yang terseleksi, selanjutnya dilakukan uji pengikatan, uji selektivitas dan *bioassay* dengan aptamer.

Hasil penelitian ini mempunyai novelitas yang tinggi dan berpotensi untuk dipublikasikan di jurnal-jurnal yang ber-*impact factor* dan terindeks Scopus. Pengembangan lebih lanjut dari sistem deteksi cepat khususnya yang berbasis aptamer berpotensi untuk didaftarkan hak paten karena sejauh penelusuran yang dilakukan belum ada yang mengembangkan alat deteksi untuk autentikasi halal berbasis DNA aptamer. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat mendorong inovasi dan daya saing bangsa Indonesia di sektor industri halal serta selaras dengan diterapkannya UU Jaminan Produk Halal.

## BAB 1. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Metode berbasis biologi molekuler, seperti reaksi berantai polimerase (PCR), *Real-Time PCR* (Rodriguez *et al.*, 2005), analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Chen *et al.*, 2010), PCR multiplex (Ghovvati *et al.*, 2009), dan spesies-spesifik PCR (Man *et al.*, 2007) serta *Electronic Nose* (E-nose) (Tian, *et al.*, 2013) telah digunakan dalam identifikasi spesies dan pemalsuan daging. Keterbatasan teknik pemeriksaan rutin telah mendorong penerapan teknik molekuler berbasis DNA untuk tujuan peningkatan kepekaan, dan spesifisitas dibandingkan dengan metode berbasis protein lainnya.

Aptamer adalah oligonukleotida untai pendek yang berupa RNA atau *single stranded DNA* (ssDNA) yang dapat berikatan secara selektif dengan ligan atau protein target dengan afinitas dan spesifisitas yang tinggi (Tuerk & Gold, 2000). Aptamer dapat berikatan dengan berbagai molekul target seperti; protein, peptida, nukleotida, asam amino, antibiotik, senyawa organik dan anorganik berberat molekul rendah, dan bahkan sel utuh dengan spesifisitas dan selektivitas tinggi (Kim & Gu, 2014). Aptamer dihasilkan dari proses seleksi *in vitro* secara berulang dengan suatu metode yang disebut SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Metode SELEX terdiri dari 4 (empat) proses yaitu, pengikatan, elusi, amplifikasi dan pemisahan. SELEX telah menjadi metode yang *powerful* dan umum dalam mengisolasi aptamer asam nukleat (Kim & Gu, 2014).

Pengujian berbasis aptamer, yang kemudian disebut aptasensor, merupakan biosensor yang terdiri dari reseptor dan alat transduksi yang dapat menghasilkan informasi analitik, baik analisis semi kuantitatif maupun kuantitatif. Biosensor terdiri dari elemen yang mengenali senyawa biologis melalui mekanisme biokimia dan transduser yang bertumpu pada prinsip elektrokimia, massa, optik dan termal. Bioreseptor berbasis aptamer menjanjikan karena memiliki selektifitas, sensitifitas dan stabilitas yang sangat baik, reproduisibilitas pada reaksi pengikatan dengan target serta kemudahan dalam produksinya (Nikolaus & Stoltenburg, 2008).

Grafen dan grafen oksida (GO) merupakan nanopartikel dua dimensi yang sudah cukup luas digunakan sebagai *platform* dalam biosensor. Grafen oksida mempunyai struktur planar yang unik, sifat elektronik yang menarik dan memungkinkan untuk digunakan dalam aplikasi biologis (Wang, *et al.*, 2011). Karakternya yang larut air memungkinkan untuk aplikasi dalam sistem deteksi. Grafen oksida dapat berinteraksi dengan asam nukleat, yang mana ssDNA dapat diadsorpsi kuat oleh GO, sedangkan DNA dalam bentuk dupleks tidak dapat diikat

secara stabil (Liu, *et al.*, 2012). Perbedaan afinitas grafen oksida terhadap ssDNA dan dsDNA ini yang kemudian diadopsi dalam pengujian untuk mengamati DNA. Metode fluoresen, elektrokimia, optik dan SERS telah digunakan untuk menghasilkan sensitivitas, selektivitas dan akurasi yang baik dalam pengenalan DNA (Hu, *et al.*, 2015).

Penelitian ini akan melakukan optimasi seleksi aptamer menggunakan metode SELEX yang dibantu grafen oksida (GO-SELEX) terhadap target gelatin babi. Aptamer yang dihasilkan berpotensi digunakan sebagai biosensor dengan menggunakan *platform* nanopartikel (grafen oksida) untuk mendeteksi kontaminasi gelatin babi (*Sus scrofa domestica*) dalam berbagai jenis produk makanan yang beredar di pasaran.

## **B. Tujuan Penelitian**

Secara umum, tujuan dari penelitian ini adalah melakukan optimasi seleksi DNA aptamer menggunakan metode SELEX berbasis grafen oksida (GO-SELEX). Secara khusus penelitian ini mempunyai beberapa tujuan sebagai berikut:

1. Mengetahui apakah aptamer dapat diseleksi dengan metode GO-SELEX dari target gelatin babi.
2. Menentukan kondisi optimum proses seleksi aptamer dengan metode GO-SELEX dengan target gelatin babi (*Sus scrofa domestica*).

## **C. Temuan yang ditargetkan serta kontribusinya terhadap ilmu pengetahuan**

Penelitian ini diharapkan dapat mendukung salah satu unggulan penelitian UMY yaitu di bidang ketahanan dan keamanan pangan. Usaha pendahuluan bagi penelitian halal-thoyyib di UMY yang bertujuan untuk memberikan jaminan kehalalan suatu produk berdasarkan amanat Undang-undang (UU JPH Nomer 33 tahun 2014). Autentikasi halal merupakan salah satu bagian dari matarantai sistem jaminan halal yang harus didukung oleh metode analisis dan sisten deteksi yang dapat menyesuaikan dengan perkembangan produk-produk yang beredar di pasaran.

Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan acuan bagi proses produksi aptamer dengan metode GO-SELEX. Selanjutnya, hasil-hasil penelitian ini dapat dipublikasikan di jurnal-jurnal Internasional yang bereputasi, sehingga mendukung UMY sebagai sumber rujukan di bidang penelitian halal. Lebih lanjut ditargetkan luaran penelitian yang dihasilkan dapat didaftarkan untuk memperoleh hak paten.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Aptamer dan Metode SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*)

Kata Aptamer berasal dari bahasa Latin yaitu “*aptus*” yang berarti sesuai, dan bahasa Yunani *meros* yang berarti area (Ellington & Szostak, 1990). Aptamer asam nukleat adalah untai tunggal DNA atau RNA (yang termodifikasi secara kimia) dengan rentang panjang sekitar 10-100 nukleotida, yang dihasilkan dari proses seleksi secara *in vitro* menggunakan metode *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) (Tuerk & Gold, 1990). Melalui siklus berulang, proses SELEX selanjutnya diikuti dengan isolasi nukleotida fungsional yang dapat berikatan secara spesifik dengan target yang diinginkan dari *library* ssDNA atau RNA (Gambar 1.). Dalam *library* asam nukleat, beberapa sekuen membentuk untai ganda dengan konformasi yang unik menghasilkan *loop*, *stem*, *hairpin*, *pseudoknot*, *bulge* dan G-quadrupleks (Feigon, *et al.*, 1996). Pengenalan antara aptamer dengan target dapat terjadi melalui interaksi intermolekuler seperti cincin aromatis,  $\pi$ - $\pi$  *system stacking*, interaksi van der Waals dan elektrostatik antar gugus bermuatan dan ikatan hidrogen (Patel, *et al.*, 1997).

Prosedur SELEX mencakup beberapa proses yaitu, pengikatan, partisi, elusi dan amplifikasi. Tahap awal berupa sekuen oligonukleotida, yang mana masing-masing sekuen *library* mempunyai sekuen acak dibagian tengah (20-80 nukleotida) yang diapit oleh sepasang primer (18-21 nukleotida) untuk amplifikasi dengan *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Sekuen *library* selanjutnya diinkubasi dengan molekul target. Beberapa bagian nukleotida dalam *library* akan berikatan dengan target yang kemudian disebut sebagai Aptamer.

Bagian dari nukleotida *library* yang tidak berikatan dengan target dipisahkan dari bagian yang berikatan. Proses pemisahan ini kemudian disebut sebagai elusi. Bagian dari nukleotida yang berikatan kemudian diamplifikasi menggunakan PCR untuk menghasilkan *library* baru. Amplifikasi dilakukan dengan metode PCR jika targetnya berupa DNA dan menggunakan RT-PCR dan diikuti dengan transkripsi secara *in vitro* apabila targetnya berupa RNA (Djordjevic, 2007). Langkah selanjutnya dapat diikuti dengan proses modifikasi untuk meningkatkan kompleksitas dari *library*, dengan tujuan untuk meningkatkan stabilitas dengan cara meningkatkan resistensi terhadap *nuclease* (Li, *et al.*, 2008).

SELEX sudah mulai diaplikasikan sejak 20 tahun yang lalu, dan sampai dengan saat ini telah mengalami banyak sekali perubahan dan pengembangan. Proses SELEX dapat juga diaplikasikan terhadap campuran atau struktur target yang kompleks meskipun tidak

diketahui komposisinya. Disamping itu aptamer dapat diseleksi dengan afinitas dan spesifisitas yang tinggi terhadap targetnya, sehingga sering dibandingkan dengan antibodi, dengan nilai  $K_d$  (konstanta disosiasi) pada interval nM ke pM tergantung pada metode pengukurannya (Stoltenburg, *et al.*, 2007). Beberapa metode SELEX yang dikembangkan hingga saat ini diantaranya adalah *Conventional-SELEX*, *Capillary Electrophoresis (CE)-SELEX*, *Cell-SELEX*, *In vivo-SELEX*, *One round-SELEX*, *In silico-SELEX* dan masih banyak lagi (Darmostuk, *et al.*, 2015).

Metode SELEX konvensional bisa memakan waktu dalam skala minggu untuk menghasilkan aptamer dengan kondisi sumber daya yang memadai. CE-SELEX menggunakan instrumen *capillary electrophoresis* yang mahal sebagai *platform instrument* dalam menghasilkan aptamer. Park, *et al.* (2012) memperkenalkan metode SELEX tanpa proses immobilisasi target untuk menyeleksi aptamer pengikat insulin dengan menaplikasi Grafen Oksida (GO) yang kemudian dikenal dengan GO-SELEX. GO adalah senyawa turunan grafen yang diketahui dapat mengadsorpsi ssDNA pada permukaannya dengan kuat melalui interaksi hidrofobik dan  $\pi$ - $\pi$  *stacking* antara basa nukleotida dengan GO. Sedangkan dsDNA diadsorpsi dengan lemak karena perlindungan basa nukleotida oleh kerangka fosfat (Chen, *et al.*, 2014).

Aplikasi aptamer untuk kepentingan analisis sejauh ini masih terpusat pada alat diagnostik medis dan klinis, akan tetapi belakangan sudah mulai muncul publikasi terkait aplikasi aptamer dalam bidang penjaminan keamanan pangan. Pemanfaatan aptamer dalam berbagai uji berbasis aptamer telah menjadi bagian penting dalam penelitian-penelitian yang memanfaatkan aptamer sebagai piranti sensor (Citartan,*et al.*, 2012).

## **B. Grafen Oksida (GO)**

Grafen adalah blok bangun dasar 0D dari fulleren, 1D dari tabung nano karbon dan 3D dari grafit. Grafen mempunyai struktur planar yang unik, dengan sifat elektronik yang baik, dan telah dieksplorasi dalam aplikasi biofungsional untuk berbagai tujuan dan manfaat (Wang, 2011). Area permukaan yang besar ( $> 2630 \text{ m}^2 / \text{g}$ ) dan jejaring ikatan  $sp^2$  ( $sp^2/sp^3$ ) yang unik membuat grafen (GO) menjadi kandidat yang menarik untuk menambatkan biomolekul bagi kepentingan deteksi (He, *et al.*, 2010).

Grafen oksida dapat dihasilkan dari serbuk grafit yang dioksidasi untuk menghasilkan Grafen oksida sehingga dapat didispersikan dalam air atau pelarut polar lainnya dikarenakan adanya gugus hidroksil dan epoksida pada bagian tengah struktur serta gugus karbonil dan karboksilat pada bagian tepi struktur (He, *et al.*, 1998; Szabo', *et al.*, 2005). Titik kritis dalam

penyiapan GO adalah pemilihan agen pengoksidasi yang tepat untuk mengoksidasi grafit menjadi GO (Park & Ruoff, 2009). Metode yang paling umum saat ini adalah menurut apa yang dilaporkan oleh Hummers (1958), yang mana oksidasi grafit menjadi grafit oksid dilakukan dengan bantuan campuran bebas air dari  $H_2SO_4$ ,  $NaNO_3$  dan  $KMnO_4$  pekat (Hummers & Offeman, 1958).

Nanomaterial berbasis grafen oksida telah banyak digunakan untuk membuat biosistem fungsional yang terintegrasi dengan asam nukleat, peptida, protein dan bahkan sel. Penemuan tentang absorpsi DNA untai tunggal (ssDNA) pada lembaran grafen oksida, kemampuan untuk memadamkan donor elektron, kemampuan grafen untuk melindungi biomolekul dari reaksi enzimatik yang sama baiknya dengan kemampuan transportasi dalam sel hidup dan sistem *in vivo*, menjadikan GO potensial diaplikasikan dalam studi biologi dan bioteknologi (Wang, *et al.*, 2010).

Para peneliti telah menggunakan beberapa strategi dan teknik untuk mengilustrasikan interaksi antara DNA dan grafen. Simulasi *Molecular Dynamic* (MD) dari ssDNA dan dsDNA yang ditambatkan melalui pengikat alifatik pada permukaan grafen dilakukan untuk menginvestigasi peranan kerapatan muatan permukaan dalam struktur dan orientasi penempelan DNA (Kabelac, 2012). Peneliti berhasil mengobservasi perbedaan perilaku yang nyata antara ssDNA dan dsDNA dalam penambatannya pada lapisan grafen. dsDNA rigid menjaga geometrinya mendekati bentuk *canonical* B-DNA dan berinteraksi dengan permukaan grafen melalui pasangan basa terdekat (Varghese, 2009).

### **C. Gelatin**

Menurut GMIA (*Gelatin Manufacture Institute of America*), gelatin dapat dibuat dengan menggunakan tulang yang diperoleh dari hewan yang disembelih dibersihkan, dihilangkan lemaknya, dikeringkan, disortasi kemudian dihancurkan sampai dengan ukuran 1-2 cm. Potongan tulang kemudian diberi larutan HCl untuk menghilangkan garam mineral hingga dihasilkan material menyerupai spons yang disebut ossein. Gelatin yang dihasilkan dari proses dengan perlakuan asam disebut gelatin tipe A, sedangkan gelatin yang dihasilkan dari proses dengan perlakuan basa disebut sebagai gelatin tipe B (GMIA, 2012).

Gelatin mengandung 8-13% lembab dan mempunyai densitas relatif 1,3-1,4. Perilaku fisika-kimia gelatin dipengaruhi oleh suhu, pH, kadar abu, proses pembuatan, sejarah pemanasan dan konsentrasinya. Gelatin dapat larut dalam larutan berair alkohol polihidroksi seperti gliserol dan polietilen glikol. Gelatin tidak larut dalam pelarut organik yang kurang polar benzena, aseton, alkohol primer dan dimetilformamid (Finch & Jobling, 1977).

Gelatin kulit babi dan gelatin kulit sapi sangat luas digunakan dalam produk pangan, karena melimpahnya ketersediaan sumber bahan baku. Gelatin kulit sapi diolah melalui perlakuan basa yang kemudian disebut sebagai gelatin tipe B, sedangkan gelatin kulit babi diolah melalui perlakuan asam sehingga termasuk gelatin tipe A. Kedua jenis dan sumber gelatin mempunyai karakteristik yang spesifik, sesuai dengan yang diinginkan oleh produsen produk pangan (Raja Mohd Hafidz, *et al.*, 2011). Sifat kimia gelatin dipengaruhi oleh komposisi asam aminonya, yang sesuai dengan kolagen asalnya dan dipengaruhi oleh jenis spesies binatang serta jenis jaringan (Zhou & Regenstein, 2006). Analisis asam amino gelatin menunjukkan bahwa komposisi asam amino dapat mempengaruhi struktur kimianya. Komposisi asam amino BSG (*Bovine Skin Gelatin*) dan PSG (*Porcine Skin Gelatin*) berbeda pada asam amino glisin, prolin dan arginin (Gambar 5.). BSG dan PSG mempunyai glisin dalam jumlah besar, dan diikuti dengan prolin dan arginin. PSC mempunyai jumlah glisin, prolin dan arginin yang lebih besar dibandingkan dengan BSG. Keduanya mempunyai tirosin dalam jumlah kecil, dan tidak terdeteksi adanya asam amino histidin (Raja Mohd Hafidz, *et al.*, 2011).

### **BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Bahan**

##### **1. Seleksi Aptamer dengan GO-SELEX**

*Library* ssDNA awal berupa untai tunggal 80 nukleotida (yang terdiri dari 20 nukleotida pengikat ujung primer depan, 40 nukleotida acak pada bagian tengah dan 20 nukleotida pengikat primer belakang), primer didesain dari gen Cyt-b (*Accession number*: AF039170) disintesis oleh Sangon Biotech (Shanghai) Co. Ltd., gelatin babi (Sigma Aldrich), gelatin sapi (Sigma Aldrich), gelatin ikan (Sigma Aldrich) dan gelatin nabati/ rumput laut (Sigma Aldrich), acrylamide/bis-acrylamide (larutan 30%) (Sigma-Aldrich), Grafen Oksida (Sigma Aldrich), metanol pro kromatografi dan reagen maupun senyawa kimia lain berderajat pro analitik (Sigma Aldrich). Larutan disiapkan dengan air *ultrapure* yang diproses dengan Millipore Direct-Q3 *ultrapure water sistem*.

##### **2. Pemurnian ssDNA dengan PCR Asimetris**

Templat yang digunakan dalam eksperimen ini adalah dari hasil langkah elusi dalam metode SELEX, Primer adalah: primer spesifik gelatin babi gen Cyt-b (*accession number*: AF039170) disintesis oleh PT. Genetika Co.Ltd., masing-masing 60 pmol dalam 1x buffer PCR (10 nM Tris-HCl (pH 8,3), PCR Master Mix KAPA Taq Ready

Mix dan MyTaq<sup>TM</sup> HS Red Mix (Bioline), GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit kit GenElute<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit, agarose 3% dalam buffer TAE (40 mM Tris Asetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) mengandung 0,5 µg/mL ethidium bromid, 10% *native* PAGE, dijalankan dengan buffer TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA, pH 8.3)

## **B. Alat**

Alat penelitian tahapan ini antara lain *glass ware*, jarum ose, dissecting set, autoclave, milipore filter, laminar air flow, pipet elektrik (mikro pipet), inkubator -80°C, tabung konikel tabung ependorf, botol flask, sentrifuse, stirer, shaker, inkubator -20°C, inkubator -37°C, washer, membran dialisis (seam less cellulose tubing), syringe, vortex, tabung rx plastik, inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C, alat suntik (injektor), homositometer, freezer, pH meter, mikroskop inverted. Peralatan gelas (Pyrex), Timbangan analitik (Metler Toledo), Mikropipet (Accumax PRO), PCR (Ricoch MP 2500), PAGE, UV transilluminator.

## **C. Jalannya Penelitian**

### **1. Merancang Primer dan ssDNA *library pool***

Primer gen *Cyt-b* mtDNA gelatin babi (*accession number*: AF039170) yang akan digunakan, dirancang dengan menggunakan *software* NCBI-Primer BLAST sesuai dengan kriteria yang diinginkan.

### **2. Seleksi Aptamer *in-vitro* dengan Metode GO-SELEX**

Proses GO-SELEX dilakukan berdasarkan menurut prosedur SELEX dalam penelitian Chen, *et al.* (2014) yang dimodifikasi. ssDNA *pool* didesain dengan primer spesifik terhadap gen *Cyt-b* mtDNA babi dengan *accession number*: AF039170 (Lahiff *et al.*, 2001). Sebelum dicampur dengan target gelatin babi, *library* ssDNA dilarutkan dalam bufer pengikat (BB; 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, and 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> pada pH 7.4) dipanaskan pada suhu 94°C selama 5 min, didinginkan secara langsung diatas es selama 15 menit, dan ditempatkan pada suhu 25°C selama 10 min. Pada putaran pertama, ssDNA terlipat (1 nmol) diinkubasi dengan gelatin babi (100 nmol) dalam 400 µL pada buffer pengikat khusus, yang mengandung 1.0% methanol, selama 2 jam pada suhu 25 °C dengan memiringkan dan diputar. Selanjutnya, 10,0 mg GO (rasio massa GO/ssDNA = 400:1) ditambahkan ke dalam campuran aptamer potensial dan ssDNA yang tidak terikat, dan larutan diinkubasi pada 25°C selama 40 min. Campuran ini mengandung GO, disentrifugasi pada 13 000 rpm/min selama 10 min, dan supernatan yang mengandung ssDNA yang berikatan

dengan gelatin babi dikumpulkan, sedangkan deposit yang mengandung ssDNA yang tidak terikat dan teradsorpsi GO dibuang. Tampungan aptamer potensial yang dikumpulkan diamplifikasi dengan PCR, dan produk ssDNA diolah dengan pemurnian menggunakan teknik PCR asimetris. GO-SELEX putaran berikutnya dilakukan dengan menggunakan *library* ssDNA yang sudah dimurnikan. *Counter* GO-SELEX dilakukan mulai dari putaran ke-6 untuk meningkatkan spesifisitas aptamer melawan gelatin babi. *Library* ssDNA (200 pmol) pertama-tama diinkubasi dengan campuran gelatin sapi, gelatin ikan, atau gelatin nabati lainnya (masing-masing 5 nmol) dalam 400  $\mu$ L pada buffer inkubasi selama 60 min, dan kemudian GO (2,0 mg) ditambahkan dan diinkubasi selama 40 min. Selama proses ini, oligonukleotida yang tidak terikat pada *counter-targets* diadsorpsi pada permukaan GO dengan mekanisme interaksi  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, sedangkan yang terikat pada *counter-targets* tersuspensi dalam buffer. Setelah pemisahan secara sentrifugasi, GO yang mengikat oligonukleotida diresuspensi dan dicuci dengan BB 5 kal. Selanjutnya, target gelatin babi (20 nmol) dicampur dengan GO-ssDNAs dan diinkubasi selama 2 jam dalam 400  $\mu$ L bufer, untuk memperoleh kembali aptamer dari permukaan GO. Larutan campuran disentrifugasi, dan supernatan yang mengandung aptamer potensial dikumpulkan. Tampungan *library* yang diperoleh diamplifikasi dengan PCR, dan ssDNA yang dihasilkan sekali lagi dimurnikan dengan PCR asimetris.

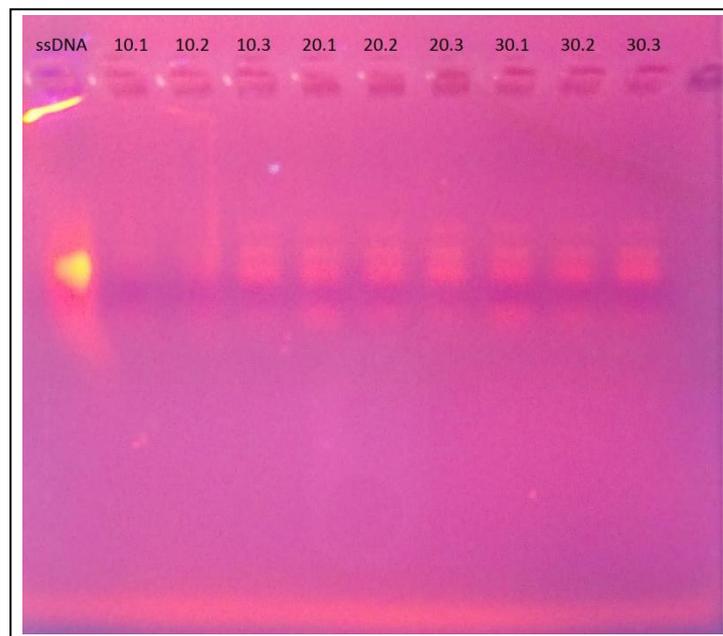
## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

Optimasi seleksi aptamer dengan metode GO-SELEX dilakukan pada tahapan seleksi, amplifikasi produk hasil seleksi dan pemurnian DNA. Proses seleksi diawali dengan proses rekonstitusi pustaka ssDNA. Pustaka ssDNA direkonstitusi dengan bufer pengikat pH 7.4 dengan terlebih dahulu dipanaskan pada suhu 94°C selama 5 menit selanjutnya didinginkan secara langsung diatas es selama 15 menit dan ditempatkan pada suhu 25°C selama 10 menit. Putaran seleksi dilakukan menggunakan konsentrasi ssDNA 1, 2, 3 nmol (10, 20, 30  $\mu$ L, 100  $\mu$ M) ssDNA diinkubasi dengan 5, 10, 15 mg gelatin babi dalam 400, 300, 200  $\mu$ L binding buffer + etanol p.a 1% (5  $\mu$ L), selama 2 jam pada suhu 25°C. Grafen oksida ditambahkan 100, 200, 300  $\mu$ L (2 mg/mL) ke dalam campuran, campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 40 menit (rasio massa GO/ssDNA = 40 : 1).

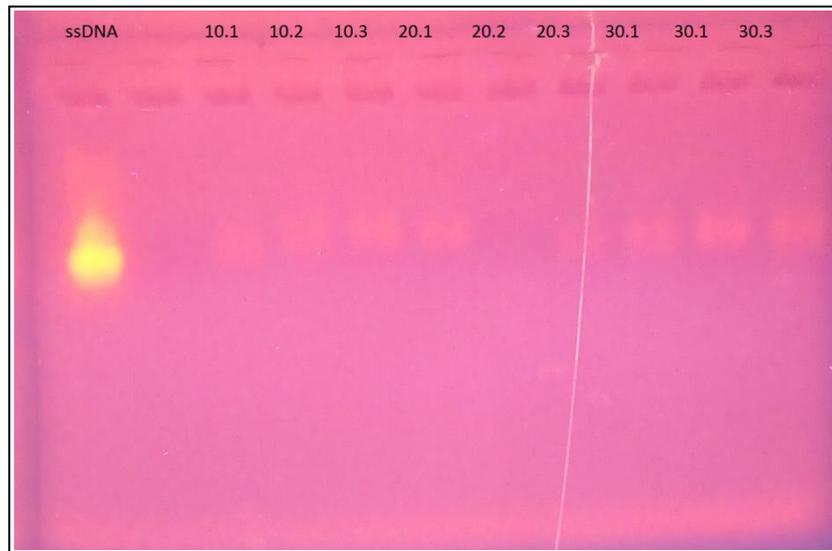
Pada tahap amplifikasi yakni dengan PCR, baik simetris maupun asimetris dilakukan dengan menggunakan PCR Mix yang berbeda. PCR Mix yang digunakan adalah KAPA Taq Ready Mix dan MyTaq<sup>TM</sup> HS Red Mix (Bioline). Sedangkan pemurnian produk PCR simetris dilakukan dengan kit pemurnian yang berbeda yakni, Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit dan DNA Clean and Concentrator<sup>TM</sup> 5 (Zymo Research). Efektifitas penggunaan PCR Mix dan kit pemurnian dilihat dengan analisis menggunakan gel agarose 3%, menggunakan pustaka ssDNA sebagai pembanding.

Hasil analisis elektroforesis gel agarose 3% untuk hasil PCR simetris menggunakan master mix KAPA Taq Ready Mix adalah seperti terlihat pada gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil elektroferesis gel agarose 3% PCR asimetris rasio primer x/1. ssDNA sebagai marker, dan hasil seleksi pada konsentrasi 1,2,3 nmol dengan rasio primer: 5/1, 10/1, 20/1

Hasil elektroforesis gel agarose 3% terhadap produk PCR asimetris dengan menggunakan rasio primer; 5/1, 10/1 an 20/1 menunjukkan bahwa telah dihasilkan produk amplifikasi terhadap target. Hal ini ditunjukkan dengan munculnya pita pemisahan yang sejajar dengan pita dari marker yakni, pustaka ssDNA. Hasil analisis selanjutnya dilakukan terhadap produk PCR asimetris dengan rasio primer x/0, yang artinya dalam proses PCR tidak menggunakan primer reverse, sehingga diharapkan amplifikasi hanya terjadi pada satu cetakan DNA saja. Hasil seperti terlihat pada gambar 2.



**Gambar 2.** Hasil elektroforesis gel agarose 3% produk PCR asimetris dengan rasio primer x/0; 5/0, 10/0, 20/0.

## REFERENSI

- Chen, S.-Y., Liu, Y.-P., Yao, Y.-G., 2010, Species authentication of commercial beef jerky based on PCR–RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. *Journal of Genetics and Genomics* 37 (11), 763–769.
- Chen X., Huang Y., Duan N., Wu S., Xia Y., Ma X., Zhu C., Jiang Y., and Wang Z., 2014, Screening and Identification of DNA Aptamers against T-2 Toxin Assisted by Graphene Oxide, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 10368–10374
- Citartan, M.; Gopinath, S.C.B.; Tominaga, J.; Tan, S.C.; Tang, T.H., 2012, Assays for aptamer-based platforms. *Biosens. Bioelectron.*, 34, 1–11.
- Citartan, M., Tang, T.H., Tan, S.C., Hoe, C.H., Saini, R., Tomibaga, J., Gopinath, S.C.B., 2012, Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production, *Songklanakarinn J Sci. Technol.*, 34(2), 125-131.
- Djordjevic, M. 2007, SELEX experiments: new prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways. *Biomol. Eng.*, 24, 179-189.
- Ellington, A.D.; Szostak, J.W. 1990, *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818–822.
- Finch, C.A. and Jobling, A. 1977. in *The Science and Technology of Gelatin*, A.G. Ward and A. Courts, eds., pp. 258-260, Academic Press, London.
- Gelatin Manufacturers Institute of America, 2012, Gelatin Handbook, [http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA\\_Gelatin\\_Manual\\_2012.pdf](http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Gelatin_Manual_2012.pdf), diakses pada 9 Januari 2016

- Ghovvati, S., Nassiri, M.R., Mirhoseini, S., Moussavi, A.H., Javadmanesh, A., 2009, Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 20 (8), 696–699.
- He, H., Klinowski, J., Forster, M., Lerf, A. 1998, A new structure model for graphite oxide. *Chem. Phys. Lett.* 287, 53-56.
- He, S., Song, B., Li, D., Zhu, C., Qi, W., Wen, Y., Wang, L., Song, S., Fang, H., Fan, C.: 2010, A graphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent DNA analysis. *Adv. Funct. Mater.* 20, 453-459
- Hermann, T.; Patel, D.J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 2000, 287, 820-825.
- Hu, Y., et al, 2015. Graphene for DNA Biosensing; Biocompatible Graphene for Bioanalytical Application, *SpringerBriefs in Molecular Science*, DOI 10.1007/978-3-662-45695-8\_2
- Huang, Y., Chen, X., Duan, N., Wua, S., Wang, Z., Wei, X., Wang, Y., 2015, Selection and characterization of DNA aptamers against *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1, *Food Chemistry* 166. 623-629.
- Hummers, W.S.; Offeman, R.E. 1958, Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1339.
- Kabelac, M., Kroutil, O., Predota, M., Lankas, F., Sip, M., 2012, Influence of a charged grapheme surface on the orientation and conformation of covalently attached oligonucleotides: a molecular dynamics study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 4217-4229
- Kim, Y.S., dan Gu, M.B., 2014, Advances in Aptamer Screening and Small Molecule Aptasensors, *Adv Biochem Eng Biotechnol* ( ) 140: 29-67.
- Li, M.; Lin, N.; Huang, Z.; Du, L.; Altier, C.; Fang, H.; Wang, B. 2008, Selecting aptamers for a glycoprotein through the incorporation of the boronic acid moiety. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 12636-12638.
- Liu, Y.; Dong, X.; Chen, P., 2012, Biological and Chemical Sensors Based on Graphene Materials. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2283-2307
- Man, Y.B.C., Aida, A.A., Raha, A.R., Son, R., 2007. Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal. *Food Control* 18 (7), 885-889.
- Patel, D.J.; Suri, A.K.; Jiang, F.; Jiang, L.; Fan, P.; Kumar, R.A.; Nonin, S. 1997, Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes1. *J. Mol. Biol.*, 272, 645-664.
- Park, S.J., Ruoff, R.S. 2009, Chemical methods for the production of graphene. *Nat. Nanotechnol.*, 4, 217-224.

- Raja Mohd Hafidz, R. N., Yaakob, C. M., Amin, I. and Noorfaizan, A., 2011, Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin, *International Food Research Journal* 18: 813-817.
- Rodriguez, M.A., Garcia, T., Gonzalez, I., Hernandez, P.E., Martin, R., 2005. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science* 70 (1), 113–120.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., 2007, (SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomolecular Engineering* 24. 381–403.
- Szabo, T. Szeri, A. De'ka'ny, I. 2005, Composite graphitic nanolayers prepared by self-assembly between finely dispersed graphite oxide and a cationic polymer. *Carbon* 43, 87–94.
- U.S. Pharmacopoeia 34/National Formulary 29. 2011 and Food Chemicals Codex 7. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD
- Tuerk, C.; Gold, L. 1990, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage t4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505–510.
- Varghese, N., Mogera, U., Govindaraj, A., Das, A., Maiti, P.K., Sood, A.K., Rao, C.N., 2009, Binding of DNA nucleobases and nucleosides with graphene. *ChemPhys*, 10, 206–210.
- Wang, Y., 2010, Nitrogen-doped graphene and its application in electrochemical biosensing. *ACS Nano* 4, 1790–1798
- Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J. and Lin, Y., 2011, Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology, Department of Chemistry, Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology *Trends in Biotechnology*, Vol. 29, No. 5 205-212.
- Zhou, P. and Regenstein, J. M. 2006. Determination of total protein content in gelatin solutions with the Lowry or Biuret Assay. *Journal of Food Science* 71 (8), 474-479.