



JLabMed

Journal Homepage: <http://jurnal.unimus.ac.id/index.php/JLabMed>

e-ISSN: 2549-9939

Optimasi *Annealing Temperature Primer* mRNA RECK dengan Metode *One Step qRT-PCR*

Aprilia Indra Kartika^{1*}

¹Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

Info Artikel

Diterima 29 Maret 2018
Direvisi 29 Maret 2018
Disetujui 30 Maret 2018
Tersedia 31 Maret 2018

Abstrak

Identifikasi mRNA untuk mengukur ekspresi suatu gen dapat dijadikan sebagai alat diagnostik suatu penyakit. mRNA RECK menghasilkan protein RECK yang terbenam dalam membran glikoprotein sel sehingga memperkuat integritas sel. Ekspresi mRNA RECK dikaitkan dengan proses fisiopatologis dalam kanker ovarium. Metode *one step qRT-PCR* sangat sensitif dan akurat, namun membutuhkan kompleksitas yang tinggi. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil kuantifikasi mRNA adalah suhu *annealing* primer mRNA RECK. Penelitian ini melakukan optimasi suhu *annealing* secara *in-silico* melalui <http://tmcalculator.neb.com/dan> http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature diperoleh suhu 49°C (57°C primer forward; 54°C primer reverse) dan 51,8°C primer forward; 51,1°C primer reverse. Proses selanjutnya yaitu melakukan *running qRT-PCR* menggunakan suhu bertingkat. Suhu 55,6°C pada awal optimasi menunjukkan hasil yang baik terlihat dari kurva *meltpeak* yang spesifik pada suhu 75°C. Namun setelah proses *running* menggunakan sampel yang berbeda, hasil *meltpeak* tidak spesifik. Proses optimasi kedua diperoleh suhu 52,5°C dengan *meltpeak* spesifik suhu 76,5°C. Optimasi *annealing* dilanjutkan dengan melakukan persamaan konsentrasi RNA *template* menggunakan pengenceran perbandingan 1:3 (RNA: *Nuclease Free Water* (NFW)). Kesimpulan dari penelitian ini diperoleh suhu *annealing* mRNA RECK sebesar 52,5°C dan pengenceran 1:3 RNA dengan NFW, serta penggunaan reagen KAPA *one step PCR* tanpa penambahan *dUTP* dan *ROX high* serta *ROX low*.

Keywords:

Annealing Temperature, mRNA RECK, One step qRT-PCR

*Corresponding Author:

Aprilia Indra Kartika

Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia 55281.

E-mail: apriiaindrak@gmail.com

Pendahuluan

mRNA merupakan produk hasil transkripsi DNA yang bisa dideteksi secara sederhana, sensitif, dan kuat untuk mengetahui tingkat ekspresi suatu gen. Identifikasi mRNA dapat digunakan untuk mengukur perbedaan ekspresi dari cDNA, contohnya gen yang mengekspresikan protein tertentu pada kasus kanker, penyakit jantung, diabetes, dan kondisi fisiopatologis lainnya (Malhotra *et al.*, 1998).

Salah satu mRNA yang terlibat dalam proses onkologi kanker ovarium yaitu mRNA RECK. RECK menahan glikoprotein pada membran, mengandung *multiple epidermal growth factorlike* yang berulang dan *serine protease inhibitor like domain*. RECK secara luas diekspresikan pada jaringan normal dan *non-neoplastic cell line*, dimana ekspresi menurun pada onkogen. RECK dapat menurunkan aktivitas proteolitik pada MMP9, MMP2, dan Mt1-MMP, peran RECK adalah untuk mengatur MMPs, *invasive* dari tumor, dan metastasis (Kang, *et al.*, 2007).

Deteksi ekspresi mRNA dapat menggunakan metode *one step quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR). Metode *one step* qRT-PCR merupakan metode menggunakan sampel RNA dengan sintesis cDNA langsung dalam mesin qRT-PCR. Metode qRT-PCR memiliki kelebihan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi *high dynamic range*, cocok untuk tindakan kuantifikasi dan *user and lab friendly* (Schwarzenbach *et al.*, 2014).

Metode *one step* qRT-PCR sangat sulit dilakukan karena sifat RNA yang sangat sensitif dan mudah rusak apabila suhu berubah drastis maupun terjadi kontaminasi yang mengandung enzim RNase. Pengukuran mRNA harus dilakukan dalam kondisi steril, dan membutuhkan suhu *annealing* yang tepat agar proses kuantifikasi dapat berjalan dengan baik tanpa bias hasil ekspresi maupun terjadi *double peak*. Suhu *annealing* yang tidak optimal menyebabkan ekspresi mRNA RECK tidak konsisten, terjadi *double target*, maupun tidak terjadi

penempelan primer pada mRNA target. Tahap optimasi suhu *annealing* merupakan tahap penentu keberhasilan pengukuran ekspresi mRNA (Korbie & Mattick, 2008). Penelitian Korbie & Mattick tahun 2008 menyebutkan bahwa suhu *annealing* dipengaruhi oleh adanya *GC-content* yang terdapat di dalam primer maupun sekuens DNA target, konsentrasi RNA, dan mix reagen PCR. Permasalahan yang terjadi yaitu belum diketahui secara pasti suhu *annealing* yang terdapat pada mRNA RECK dengan *primer forward* RECK dengan sekuens 5'-ACACTAATCCAGGTGCCATC-3' dan *primer reverse* RECK dengan sekuens 5'-TTTCTAAGAGTCCACTTTGTCC-3'.

Penelitian terkait ekspresi mRNA RECK telah dilakukan oleh Kimura *et al.* (2010) yaitu kuantifikasi ekspresi RECK pada kloning kondriosit pada pasien *Osteoarthritic Cartilage*, Bullock *et al.* (2013) mengukur ekspresi mRNA RECK pada sel line kolorektal manusia, kanker prostat (Hirata *et al.*, 2013) dan metastasis kanker paru-paru (Yeh *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, tidak terdapat kesamaan suhu *annealing* mRNA RECK karena memiliki primer yang berbeda dalam menarget mRNA yang sama. Selain itu ekspresi RECK setiap individu berbeda, sehingga perlu dilakukan optimasi ulang suhu *annealing*.

Penelitian ini akan melakukan optimasi suhu *annealing* primer RECK pada pasien *suspect* kanker ovarium menggunakan sampel plasma darah sebelum operasi. Tujuan penelitian untuk memperoleh suhu *annealing* yang tepat berdasarkan optimasi suhu, konsentrasi, dan reagen yang digunakan sehingga menghasilkan kuantifikasi ekspresi mRNA RECK yang empiris tanpa dipengaruhi oleh proses laboratorium yang tidak tepat. Metode yang digunakan yaitu *in-silico*, optimasi menggunakan suhu bertingkat di mesin qRT-PCR dan optimasi konsentrasi *template* RNA dengan pengenceran, serta optimasi menggunakan reagen KAPA SYBR FAST Universal One-Step qRT-PCR kit.

Bahan dan Metode

Alat

Laminar Air Flow, *Conical* 15 ml (*Falcon®*, USA), *Pipette tip* 2 µl (*Pipetman® neo Gilson*, Germany), *Pipette tip* 20 µl (*Pipetman® neo Gilson*, Germany), *Pipette tip* 200 µl (*Pipetman® neo Gilson*, Germany), *Pipette tip* 1000 µl (*Pipetman® neo Gilson*, Germany), *PCR tube* (*Axygen*, USA), *DEPC-treated PCR tube*, *Biorad* 24 *CFX 96® Thermocycler*, *Swing bucket centrifuge* (*Sorvall® Primo Centrifuge*, USA). *Vacutainer EDTA 3 mL 100 pcs/pack*, *Cat.No. 02.05.01.04*, *Becton Dickinson*, *Sputit Terumo 3 cc*, 100 pcs, *tube strip-flat cap Biorad*.

Bahan

Plasma darah pasien suspect kanker ovarium, alkohol 70%, isopropanol, rDNase, *miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids (50)*, *Exiqon*, primer mRNA RECK, *KAPA SYBR FAST Universal One-Step qRT-PCR kit (Cat No KK4650, KAPA Biosystems)*.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental pra-analitik studi. Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*. Sampel darah diambil dari pasien *suspect* kanker ovarium. *Informed consent* pasien sebelum pengambilan darah dilakukan di Instalasi Rawat Inap 1, yaitu ruang Bougenville 1 dan 2. Pengambilan sampel darah dilaksanakan di RSUP. Dr. Sardjito Yogyakarta, gedung GBST (Gedung Bedah Sentral Terpadu). Pengambilan sampel darah dilakukan dari bulan September 2015 hingga Mei 2016. Isolasi RNA dan sintesis cDNA dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, dan qRT – PCR dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada .

Isolasi Plasma pada Sampel Darah

Sampel darah pada *vacutainer* EDTA disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan

dipindahkan ke tabung 1,5 ml, kemudian disimpan di -80°C.

Isolasi RNA

Isolasi RNA menggunakan *miRCURY RNA Isolation Kit-iofluid*. Sampel disentrugasi 3000 g, selama 5 menit. Sebanyak 200 µl supernatan di pindahkan dalam tabung baru, ditambahkan 60µl *Lysis Solution BF*, divortex selama 5 detik. Selanjutnya ditambahkan 20 µl *Protein Precipitation Solution BF*, divortex selama 5 detik dan diinkubasi suhu ruang selama 1 menit. Kemudian disentrifugasi 11.000g selama 3 menit. Kemudian supernatan ditambah dengan 270 µl isopropanol, divortex selama 5 detik. Selanjutnya *microRNA Mini Spin Column* dipasang dan sampel dimasukkan dalam kolom. Kemudian diinkubasi 2 menit dan disentrifugasi 11.000g selama 30 detik. Cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi dibuang dan dicuci sebanyak 3 kali menggunakan *Wash Solution* disentrifugasi 11.000 g selama 30 detik. Sebanyak 50 µl rDNase ditambahkan dalam kolom, dan diinkubasi 15 menit. Kemudian dicuci menggunakan *Wash Solution* 700 µl dan disentrifugasi 11.000g, 30 detik. Sebanyak 25 µl *RNAse free water* ditambahkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi 11.000g selama 1 menit. Kolom dibuang kemudian RNA disimoan dalam suhu -80°C.

Real Time qPCR mRNA RECK

Sebanyak 1 µL RNA dicairkan dalam 3 µL *Nuclease Free Water* dimasukkan dalam *tube* PCR 0,2 mL yang telah diberi label, kemudian *vortex* dan *spindown*. Bahan untuk *real time* qPCR mRNA adalah *KAPA SYBR FAST Universal One-Step qRT – PCR Kit*.

Proses persiapan qPCR harus dilakukan tanpa menggunakan pencahayaan yang berlebihan dan dalam suhu rendah dengan menggunakan *cool box*. *2X KAPA SYBR FAST q PCR Master Mix* diambil sebanyak 5 µL dalam *tube* PCR 0,2 mL, kemudian dicampur dengan *50X KAPA RT Mix* sebanyak 0,2 µL, *vortex* dan *spindown*. *Primer forward* RECK dengan sekuens 5'-

ACACTAATCCAGGTGCCATC-3' diambil sebanyak 0,2 µL dimasukkan dalam campuran 2X KAPA SYBR FAST q PCR Master Mix dengan 50X KAPA RT Mix, kemudian ditambah dengan Primer reverse RECK dengan sekuens 5'TTTCTAAGAGTCCACTTTGTCC -3' sebanyak 0,2 µL, vortex dan spindown.

Tube PCR strip dimasukkan dalam mesin Biorad CFX 96 dengan suhu awal 42 °C selama 5 menit untuk proses pengubahan RNA ke cDNA, kemudian suhu 95°C selama 3 menit, step ketiga menggunakan suhu 90 °C sebanyak 10 detik, dan step keempat suhu 52,6 °C selama 30 detik sebagai suhu annealing dengan scan mode, step ketiga dengan step keempat diulangi sebanyak 44 siklus, step kelima yaitu melting curve dari suhu 60 °C selama 0,5 detik menuju ke suhu 95 °C selama 5 detik.

Optimasi suhu annealing

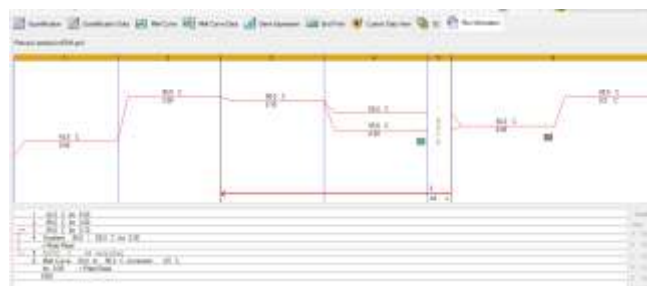
Optimasi suhu anealing menggunakan program *in-silico* <http://tmcalculator.neb.com/> dan http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature. Proses selanjutnya yaitu optimasi suhu yang diperoleh dari *in-silico* kemudian di *running* menggunakan qRT-PCR suhu bertingkat 59 °C; 61,4°C; 63,3°C; 64,5°C. Optimasi kedua menggunakan suhu bertingkat 52,8 °C; 54,5 °C; 56,7 °C; 58,5 °C. Optimasi ketiga menggunakan suhu 52 °C dan 52,7 °C. Optimasi konsentrasi dengan pengenceran menggunakan Nuclease Free Water 1:3 ; 1:10; 1:20; 1:30 . Optimasi reagen KAPA menggunakan keseluruhan reagen yang tersedia dan menghilangkan pemakaian dUTP serta ROX low maupun High.

Hasil

Proses *in-silico* untuk menentukan nilai *melting temperature* dengan mengakses web <http://tmcalculator.neb.com/> , primer forward dan reverse mRNA RECK dimasukkan ke kotak primer kemudian dianalisis. Hasil analisis menggunakan *in-silico* www.neb.com menunjukkan hasil *annealing temperature* kedua primer di suhu 49 °C. Kandungan GC pada primer RECK forward lebih tinggi yaitu 50% sedangkan primer RECK reverse sebesar 41%. Berdasarkan perhitungan

manual menggunakan formula *melting temperature* $4(G+C) + 2(A+T)$ diperoleh nilai 60 °C untuk primer forward dan 52 °C untuk primer reverse. Perhitungan dari studi *in-silico* berbeda jika dibandingkan dengan perhitungan manual.

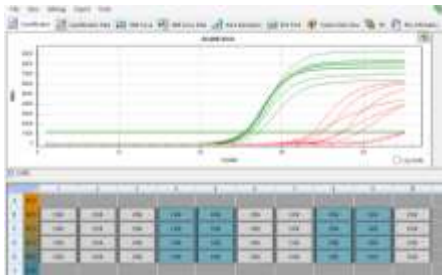
Uji *in-silico* kedua menggunakan web <http://www.biophp.org>. Studi *in-silico* kedua ini menunjukkan perbedaan suhu *annealing* bila dibandingkan dengan uji pertama (www.neb.com). Suhu *annealing primer forward* menggunakan uji *in-silico* www.biophp.org yaitu 51, 8 °C dan 51,1 °C. Proses analisis suhu *annealing* dilanjutkan dengan optimasi suhu dalam mesin qRT-PCR. Optimasi suhu dalam mesin qRT-PCR dapat dibuat bertingkat dalam satu proses.



Gambar 1. Langkah *running* qRT-PCR menggunakan suhu bertingkat

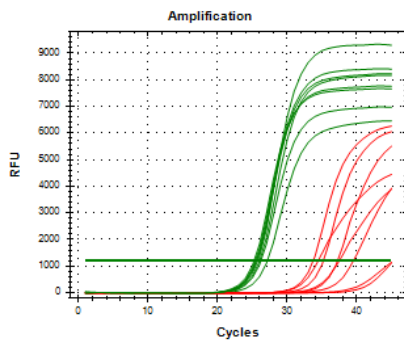
Gambar 1 menunjukkan tahapan proses *running* qRT-PCR. Langkah pertama suhu 42 °C selama 5 menit menunjukkan proses pengubahan RNA menjadi cDNA menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Proses *one step* qRT-PCR menggunakan sampel RNA sehingga pengubahan ke cDNA dilakukan dalam satu proses kuantifikasi ekspresi. Proses kuantifikasi *one step* qRT-PCR lebih sulit jika dibandingkan dengan *two step* qRT-PCR yang menggunakan sampel DNA.

Langkah kedua yaitu tahap *hot start* pengaktifan enzim polymerase suhu 95 °C dan ketiga merupakan proses denaturasi pada suhu 90 °C. Tahap keempat adalah proses *annealing* menggunakan suhu bertingkat. Pada proses keempat diaktifkan *optical read* untuk merekam proses penempelan primer sehingga akan terbentuk *double strand* DNA yang akan dideteksi oleh KAPA SYBR sehingga menghasilkan *amplification curve*.



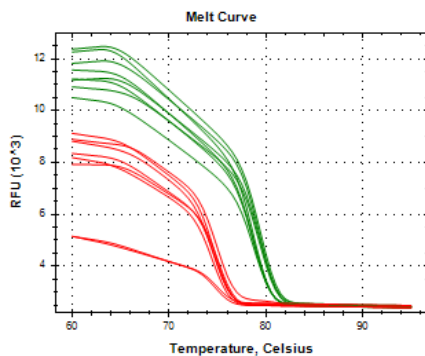
Gambar 2. *Amplification curve* optimasi suhu menggunakan suhu *annealing* bertingkat

Pada Gambar 2, proses optimasi suhu menggunakan suhu 64,5 °C ; 63,6 °C ; 61,4 °C ; 59,0 °C. Suhu tersebut disesuaikan dengan hasil perhitungan manual, dimana *primer forward* memiliki suhu *annealing* sebesar 60 °C.



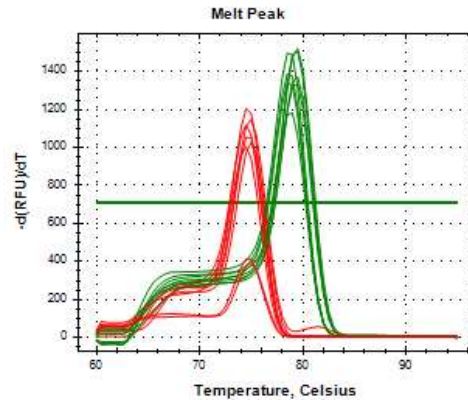
Gambar 3. *Amplification curve* optimasi suhu bertingkat (kurva hijau : β -actin ; kurva merah: mRNA RECK)

Gambar 3 menunjukkan kurva amplifikasi mRNA RECK dan β -Actin. Optimal tidaknya suhu *annealing* dapat dilihat dari grafik amplifikasi dengan membandingkan perlakuan triplo dari satu sampel yang sama. Jika jarak Cq dari triplo sampel yang sama menunjukkan Cq yang sangat berbeda, maka harus dioptimasi ulang.



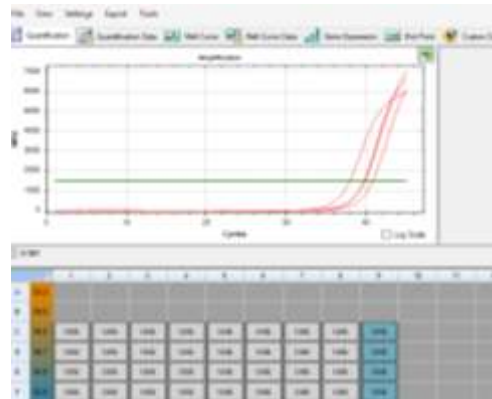
Gambar 4. *Melt curve* optimasi suhu bertingkat (kurva hijau : β -actin ; kurva merah: mRNA RECK).

Melt curve pada Gambar 4 menunjukkan kurva yang stabil.



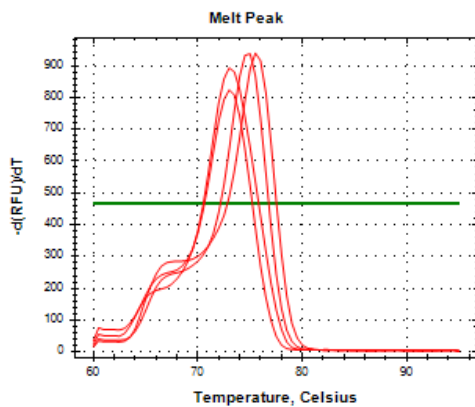
Gambar 5. Kurva *melt peak* optimasi suhu bertingkat (kurva hijau : β -actin (kontrol internal); kurva merah: mRNA RECK)

Melt peak pada Gambar 5 menunjukkan hasil yang spesifik karena hasil kurva RECK menunjukkan satu peak dan terdapat beberapa kurva yang melebihi nilai *threshold*.



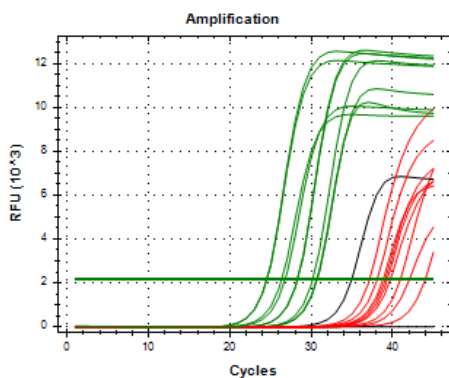
Gambar 6. Optimasi kedua menggunakan suhu 58,5 ; 56,7 ; 54,4 ; 52,8 .

Gambar 6 menunjukkan hasil optimasi terbaik pada suhu 55,6°C.



Gambar 7. Kurva *meltpeak* optimasi suhu 58,5 ; 56,7 ; 54,4 ; 52,8 (warna merah : kurva RECK).

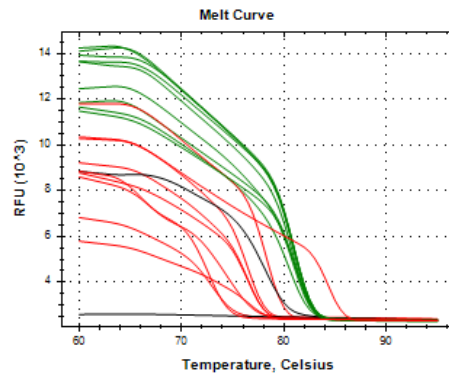
Gambar 7 kurva *meltpeak* menunjukkan 2 suhu yang berbeda dengan menggunakan 1 sampel yaitu sampel OVP 12 , suhu *meltpeak* berkisar 75°C dan 73°C. Suhu *annealing* terbaik pda suhu 55,6°C. Setelah mendapatkan suhu *annealing* terbaik, langkah selanjutnya yaitu melakukan *running* qRT-PCR menggunakan beberapa sampel dengan suhu 55,6 °C.



Gambar 8. Kurva amplifikasi *running* dengan suhu *annealing* 55,6 °C (hijau : β -Actin, merah : RECK, hitam: Nuclease Free Water)

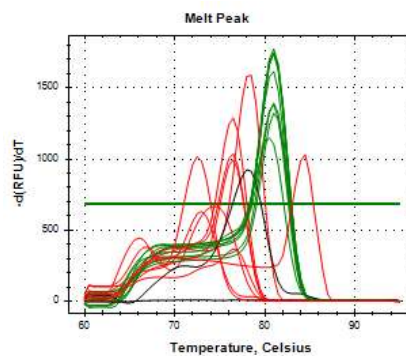
Gambar 8 menunjukkan kurva amplifikasi *running* qRT-PCR menggunakan suhu 55,6 °C. Berdasarkan gambar tersebut terlihat bahwa kurva NFW yang seharusnya tidak teramplifikasi, terlihat terdeteksi. Padahal kurva NFW tanpa menggunakan *template* RNA. Terjadi kesalahan dalam *running* qRT-PCR, NFW yang seharusnya menjadi kontrol negatif justru terdeteksi

positif, hal ini dapat terjadi karena faktor *handling* reagen yang kurang tepat, kontaminasi, maupun suhu *annealing* yang kurang tepat.



Gambar 9. Kurva *melt curve* suhu *running* 55,6 °C.

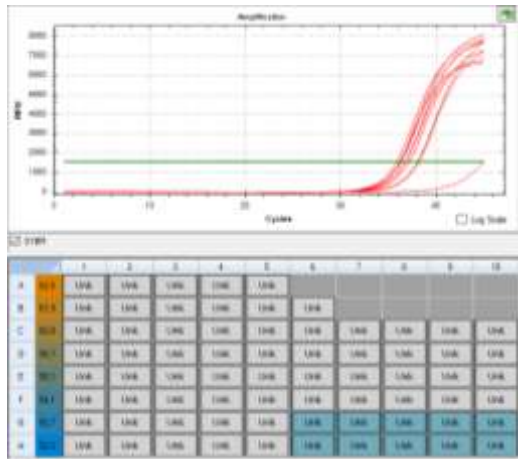
Gambar 9 menunjukkan kurva *meltpeak* yang tidak stabil, sehingga suhu 55,6 °C bukan suhu *annealing* optimal. Kurva *meltpeak* terbentuk akibat terpisahnya *double strand* yang terjadi ketika primer menempel, sehingga dari *double strand* diubah kembali menjadi *single strand* agar tidak terdeteksi berkali kali, karena proses deteksi amplifikasi terjadi akibat *double strand* yang terbentuk, kemudian KAPA SYBR menempel dan akan berpendar sehingga fluoresensinya dapat ditangkap oleh *optical read* dalam bentuk *Relative Fluorescence Unit* (RFU).



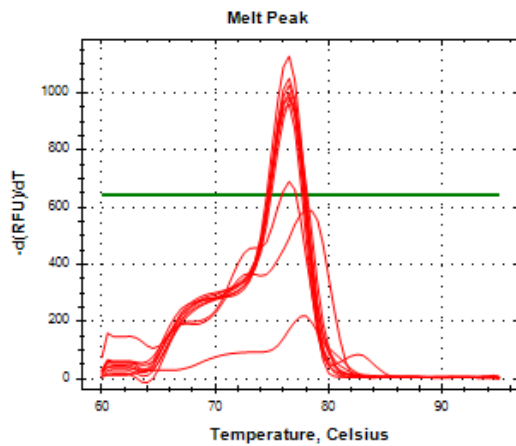
Gambar 10. Kurva *meltpeak running* qRT-PCR suhu *annealing* 55,6 °C.

Gambar 10 menunjukkan bahwa hasil qPCR tidak menarget RECK secara spesifik karena memiliki *meltpeak* yang bervariasi, berbeda dengan kurva *meltpeak* yang

dibentuk oleh β -Actin yang hanya memiliki satu *peak*, sehingga dapat disimpulkan suhu 55,6 °C bukan suhu optimal *annealing* mRNA RECK.



Gambar 11. Optimasi suhu *annealing* 52,7 °C dan 52 °C.



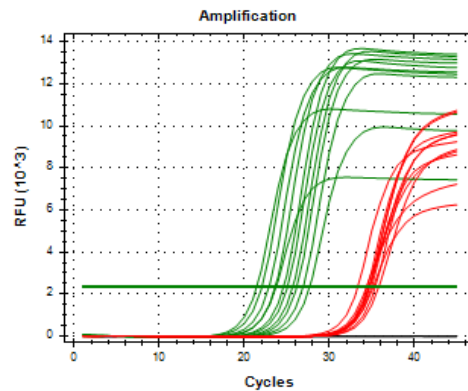
Gambar 12. Kurva *meltpeak* optimasi suhu *annealing* (merah : RECK)

Kurva *meltpeak* pada Gambar 12 menunjukkan hasil yang spesifik karena memiliki satu *peak* walaupun terdapat beberapa sampel yang tidak melewati nilai *threshold*. Tahap optimasi ke tiga menunjukkan suhu *annealing* optimal pada suhu 52,5 °C dengan suhu *meltpeak* yang seragam yaitu 76,5 °C.



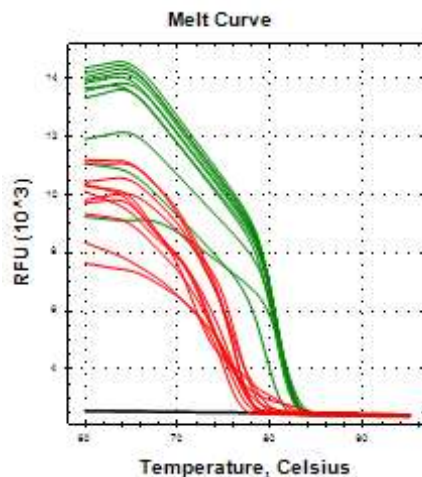
Gambar 13. *Running* qRT-PCR dengan suhu *annealing* 52,5 °C.

Tahap optimasi ke tiga menghasilkan suhu 52,5 °C menunjukkan suhu terbaik untuk *annealing*, kemudian suhu tersebut digunakan sebagai suhu *running* beberapa sampel.



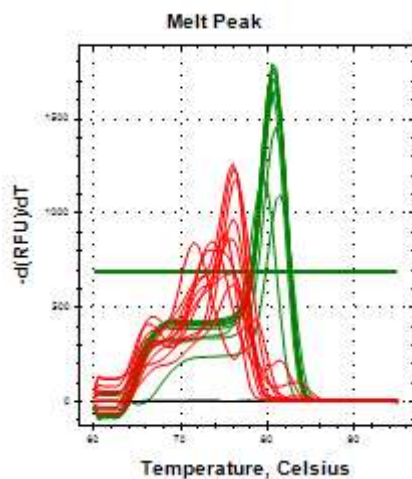
Gambar 14. Kurva amplifikasi *running* qRT-PCR menggunakan suhu 52,5 °C (kurva hijau : β -actin (kontrol internal); kurva merah: mRNA RECK)

Gambar 14 menunjukkan hasil kurva amplifikasi pada beberapa sampel dengan Cq yang hampir sama. Proses *running* menggunakan pengenceran RNA dan NFW dengan perbandingan 1:3 dan kit KAPA yang tidak digunakan adalah dUTP , *ROX low* dan *ROX high*.



Gambar 15. Kurva *melt curve* suhu *annealing* 52,5 °C

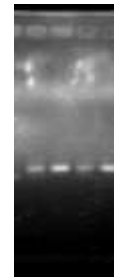
Kurva *meltpeak* dengan menggunakan suhu *annealing* 52,5 °C menunjukkan asli yang stabil, sehingga suhu 52,5 °C merupakan suhu terbaik untuk proses *annealing* primer RECK.



Gambar 16. Kurva *meltpeak* running qRT-PCR suhu *annealing* 52,5 °C

Gambar 16 menunjukkan *meltpeak* dari mRNA RECK yang bervariasi, namun masih dalam kisaran yang sama yaitu 76 °C, 79 °C, dan 80 °C. Penentuan suhu *annealing* menggunakan metode *one step* qRT-PCR membutuhkan ketelitian yang tinggi dan proses laboratorium yang steril. Konfirmasi terhadap hasil qRT-PCR RECK dilakukan dengan uji gel elektroforesis untuk melihat produk yang terbentuk memiliki panjang

produk yang sama atau tidak. Target mRNA RECK sebesar 82 bp (Gambar 17).



Gambar 17. Elektroforesis hasil qRT-PCR suhu *annealing* 52,5 °C dengan target mRNA RECK

Diskusi

Kuantifikasi ekspresi mRNA berfungsi untuk melihat proses patofisiologis dalam tubuh karena mRNA merupakan hasil transkripsi dari DNA. Perubahan ekspresi mRNA merupakan penanda terjadinya perubahan aktivitas sel. Ekspresi mRNA dapat diukur menggunakan metode *one step* qRT-PCR. *One step* qRT-PCR merupakan proses kuantifikasi mRNA menggunakan *template* RNA hasil isolasi dari plasma darah. mRNA yang diukur dari plasma darah merupakan mRNA yang disekresikan keluar sel melalui eksosom. mRNA *Protein Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motif* (RECK) yang mengkode perlekatan glikoprotein yang menghambat aktivitas inhibitor kuat melawan berbagai *matrix metalloproteinase* dan disintegrin. Protein ini memiliki fungsi utama dalam remodeling jaringan dan mengontrol aktivitas pada enzim remodeling seperti MMP khususnya MMP9. RECK berfungsi sebagai *tumor suppressor* yang menghambat migrasi, invasi, dan angiogenesis (Hong, *et al.*, 2013; Siddesha *et al.*, 2014).

Proses kuantifikasi menggunakan *template* RNA sangat sulit, membutuhkan ketelitian lab dan skill lab yang tinggi, namun hasilnya sangat sensitif dan spesifik serta langsung dapat terukur ekspresinya. Jika dilakukan proses kuantifikasi menggunakan cDNA dari kit cDNA Synthesis Exiqon, mRNA RECK tidak dapat teramplifikasi dengan baik karena adanya

kandungan *spike in* yang digunakan dalam tahapan sintesis cDNA. Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses kuantifikasi mRNA adalah suhu *annealing*. Suhu *annealing* diperoleh dengan beberapa faktor yaitu studi *in-silico* dan optimasi suhu gradien melalui qRT-PCR. Studi *in-silico* sangat membantu dalam melakukan analisis *melting temperature* primer maupun RNA dan DNA target. *Melting temperature* juga dapat dicari menggunakan rumus manual.

Setelah mendapatkan perkiraan suhu *annealing* melalui analisis studi *in-silico*, langkah selanjutnya yaitu melakukan optimasi suhu bertingkat menggunakan metode *one step q RT PCR*. Kesulitan yang diperoleh yaitu terbentuk suhu *melting peak* yang berbeda beda. Suhu *melting peak* yang dimiliki oleh satu target mRNA harus sama karena menandakan spesifisitas target, jika terjadi *double peak*, maka terdapat 2 target dalam satu cDNA yang ditempel oleh primer. Jika suhu yang diperoleh telah tepat berdasarkan analisis kurva amplifikasi, kurva *melting*, maupun *melting peak*, langkah selanjutnya yaitu melakukan kuantifikasi keseluruhan sampel yang akan diukur ekspresinya menggunakan qRT PCR.

Uji konfirmasi dibutuhkan untuk mengetahui target spesifik atau tidak. Uji konfirmasi menggunakan gel elektroforesis mRNA RECK dengan panjang 82 bp. Berdasarkan hasil uji elektroforesis mRNA RECK hasil qRT PCR disimpulkan bahwa target telah spesifik, terlihat dari bend DNA yang terbentuk sejajar.

Optimasi selanjutnya dengan menyamakan konsentrasi RNA. Template RNA diencerkan dengan NFW perbandingan 1:3, kemudian optimasi reagen. *50X ROX High* tidak digunakan karena tidak ada pengaturan dalam mesin *Biorad CFX 96*. 10 mM dUTP tidak digunakan karena menggunakan *one step qRT-PCR*, sehingga ketika menggunakan dUTP akan mendegradasi cDNA selama sintesis. Setelah menetapkan formula KAPA yang sesuai, selanjutnya yaitu melakukan optimasi ulang suhu *annealing* secara bertingkat, sehingga suhu yang berhasil optimal untuk *annealing*

RECK sebesar 52,6 °C. Suhu 52,6 °C optimal, karena hasil kurva yang dibentuk pada *melt peak* sebanyak 1 peak sehingga menunjukkan spesifikasi produk yang diukur. Kesimpulan dari penelitian ini diperoleh suhu *annealing* mRNA RECK sebesar 52,5°C dan pengenceran 1:3 RNA dengan NFW, serta penggunaan reagen KAPA *one step PCR* tanpa penambahan dUTP dan *ROX high* serta *ROX low*

Referensi

- Bullock, M. D., Pickard, K. M., Nielsen, B. S., Sayan, A. E., Jenei, V., Mellone, M., Mitter, R., Primrose, J. N., Thomas, G. J., Packham, G. K., Mirenzami, A. H. 2013. Pleiotropic Actions of miR-21 Highlight the Critical Role of Deregulated Stromal microRNAs During Colorectal Cancer Progression. *Cell Death and Disease*. 4: 684
- Malhotra, K., Foltz, L., Mahoney, W.C., Schueler, P. A. 1998. *Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR*. *Nucleic Acids Research*. 26 (3): 854-856
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Review. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25 : 169-193
- Hirata, H., Ueno, K., Shahryari, V., Deng, G., Tanaka, Y., Tabatabai, Z.L., Hinoda, Y., Dahiya, R. 2013. MicroRNA-182-5p Promotes Cell Invasion and Proliferation by Down Regulating FOXF2, RECK and MTSS1 Genes in Human Prostate Cancer. *Plos One*. 8(1): 1-12.
- Hong, F., Li, Y., Xu, Y., Zhu, L. 2013. Prognostic Significance of Serum microRNA-221 Expression in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of International Medical Research*. 41(1): 64-71.
- Kang, H. G., Kim, H. S., Kim, K. J., Oh, J. H., Lee, M. R., Seol, S. M., Han, I. 2007. RECK Expression in Osteocarcinoma: Correlation with Matrix

- Metalloproteinases Activaton and Tumor Invasiveness. *Journal of Orthopaedic Research*. 83
- Kimura, T., Okada, A., Yatabe, T., Masashi, O., Toyama, Y., Noda, M., Okada, Y. 2010. RECK Is Up-Regulated and Involved in Chondrocyte Cloning in Human Osteoarthritic Cartilage. *The American Journal of Pathology*. 176 (6): 2858-2866.
- Korbie, D.J., & Mattick, J.S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocol*. 3 (9): 1452-1456
- Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. A., & Pantel, K., 2014. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 11(3):145-56.
- Siddesha, J. M., Valente, A. J., Yoshida, T., Sakamuri, S. S. V. P., Delafontaine, P., Iba, H., Noda, M., Chandrasekar, B. 2014. Docosahexaenoic Acid Reverses Angiotensin II-Induced RECK Suppression and Cardiac Fibroblast Migration. *Cell Signal*. 26 (5): 933-941.
- Yeh, H. H., Tseng, Y. F., Hsu, Y. C., Lan, S. H., Wu, S. Y., Raghavaraju, G., Cheng, D. E., Lee, Y. R., Chang, T. Y., Chow, N. H., Hung, W. C., Liu, H. S. 2015. Ras Induces Experimental Lung Metastasis Through Up-Regulation of RbAp46 to Suppress RECK Promoter Activity. *BMC Cancer*. 15: 172-186.