

Teknik *Long Polymerase Chain Reaction* (LPCR) untuk Perbanyakan Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Polimerase Virus Hepatitis B

Long Polymerase Chain Reaction Technique to Amplify Hepatitis B Virus Polymerase Open Reading Frame

Hotma Hutapea¹, Debbie Retnoningrum², E. Giri Rahman³, T. Rostinawati⁴

¹Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis papua

²Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung

³Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung

⁴Sekolah Farmasi, Universitas Padjajaran

E-mail : hotmahutapea@gmail.com

ABSTRAK ***ABSTRACT***

Teknik PCR dapat dikembangkan untuk mengamplifikasi potongan DNA dengan ukuran panjang. Salah satu teknik yang digunakan adalah *Long PCR* (LPCR). Teknik LPCR sering digunakan untuk mengamplifikasi gen atau potongan DNA yang berukuran lebih panjang ketika PCR standar tidak dapat diaplikasikan untuk amplifikasi tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh kerangka baca terbuka gen pengkode polimerase virus hepatitis B (PolHBV) menggunakan metode LPCR, dan menentukan urutan nukleotida potongan DNA tersebut. Amplifikasi dilakukan menggunakan *Taq polimerase*. Kerangka baca terbuka gen pengkode PolHBV telah berhasil diamplifikasi dengan LPCR yang telah dimodifikasi. Hal tersebut diindikasikan dengan keberadaan pita DNA berukuran pasangan basa (bp) pada elektroforesis gel agarosa yang mendekati ukuran teoritisnya yaitu 2532 bp. Hasil penentuan urutan nukleotida parsial menunjukkan bahwa potongan DNA yang diperoleh memiliki homologi 98% dengan gen PolHBV yang dideposit di GenBank.

Kata kunci : LPCR, Polimerase HBV, Taq Polimerase

Technique of PCR can be improved to permit the amplification of longer DNA fragment. One of this technique is Long PCR (LPCR). LPCR is often used to amplify larger genes or large segment of DNA which standard PCR is not applicable. The objective of this study is to obtain the open reading frame of gene encoding polymerase of HBV (polHBV) using LPCR method, and to determine the nucleotide sequence of DNA fragment encoding polHBV. The amplification was conducted using Taq polymerase. The open reading frame of gene encoding polHBV was successfully amplified using modified LPCR method. It was identified by a band between 2000 dan 3000 base pairs (bp) DNA marker. The determination of nucleotide sequence informed that DNA fragment obtained was 98% homologue to the gene encoding PolHBV deposited on GenBank. .

Keywords : LPCR, HBV Polymerase, Taq Polymerase

Naskah masuk : 15-04-2014

Review I : 16-09-2014; Review II : 04-11-2014

Layak terbit : 16-01-2015

PENDAHULUAN

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan cara efektif untuk memperoleh kuantitas urutan nukleotida untai DNA secara *in vitro*. Perbanyakannya dengan teknik ini dilakukan dalam siklus yang terdiri atas 3 tahap. Dalam menjalankan fungsinya, PCR membutuhkan sepasang oligonukleotida sintetis atau primer yang berpasangan dengan daerah sasaran pada untai DNA, tempat menempelnya primer, enzim *polymerase* DNA yang stabil pada suhu di atas 95°C, dan empat deoksiribonukleotida yang merupakan bahan baku reaksi polimerisasi.¹ Teknik PCR digunakan untuk berbagai tujuan seperti kloning gen, deteksi polimorfisme, mutagenesis, forensik dan deteksi alel spesifik. Namun, enzim *Taq Polymerase* yang umum digunakan mempunyai keterbatasan yaitu tidak mampu memperbanyak rantai potongan DNA yang berukuran di atas 3000 pasang basa (pb).^{2,3}

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa PCR dapat dikembangkan sehingga dapat menghasilkan produk PCR berukuran 3 kilo pasang basa (kpb) hingga 40 kpb.^{3,4} Penelitian yang dilakukan Tellier dkk. 1996 menunjukkan bahwa genom virus hepatitis C yang berukuran sekitar 9,3 kpb berhasil diperbanyak dengan menggunakan metode *Long PCR* (LPCR), menggunakan enzim

polimerase KlenTaq LA 16 (KLA16). Pada penelitian tersebut, berbagai kondisi LPCR digunakan sesuai dengan panjang potongan DNA yang dikehendaki.⁵ Metode serupa juga digunakan oleh Gunther dkk. 1997 untuk memperbanyak genom virus hepatitis B yang berukuran 3,2 kpb, menggunakan campuran *Taq Polymerase* dan *Pwo* untuk meningkatkan keakuratan proses polimerisasi.⁶

Pada penelitian ini, metode LPCR dengan enzim *Taq Polymerase* digunakan untuk memperbanyak kerangka baca terbuka gen pengkode polimerase virus hepatitis B (*Hepatitis B Virus*, HBV) yang merupakan anggota dari hepadna virus. Metode LPCR dalam penelitian ini tidak melibatkan enzim *polymerase* lain selain *Taq Polymerase* standard. PolHBV mencakup sekitar 80% dari genom virus dan mengkode 842 - 845 asam amino tergantung pada genotipe HBV. Protein PolHBV berperan dalam proses replikasi genom virus. Protein PolHBV terdiri atas dua daerah terpelihara yaitu daerah yang bertanggung jawab untuk aktivitas *reverse transcriptase* (RT) dan *RNaseH* (RH) pada ujung C yang keduanya penting dalam pengkapsulan pregenomik RNA (pgRNA). Ciri khas hepadna virus adalah daerah protein terminal (PT) pada ujung amino (N) yang dipisahkan dari RT oleh daerah "Spacer" (Gambar 1).⁷



Gambar 1. Organisasi polimerase HBV. Protein polHBV terdiri atas 845 asam amino (aa) dan tersusun dari empat domain.

Domain RT memerlukan domain lain dalam replikasi HBV. PT berperan sebagai primer untuk memulai pembuatan untai positif DNA HBV dan pengemasan pgRNA.⁸ Spacer berperan dalam menjaga kestabilan protein *Polimerase* secara

keseluruhan. Penyisipan pada domain spacer di posisi asam amino ke 178 dan penghilangan asam amino ke 293 dan 335 menyebabkan kemampuan PT sebagai primer hilang. Domain RH berfungsi dalam menghancurkan pgRNA dalam partikel

virus setelah untai positif DNA HBV dihasilkan.^{9,10,11}

Pada penelitian ini, sebelumnya telah dilakukan beberapa metode PCR standar untuk memperbanyak kerangka baca terbuka gen pengkode polHBV yang berukuran 2,5 kpb; namun, metode tersebut tidak berhasil. Oleh karena itu, pada proses perbanyakannya, metode LPCR digunakan. Untuk memperoleh amplikon yang benar, maka kondisi LPCR perlu diperbagus sehingga diperoleh tingkat sensitivitas yang tinggi.

METODE PENELITIAN

Perancangan primer bertujuan agar primer dapat secara tepat mengenali sasaran DNA yang akan diperbanyak dan tidak mengenali daerah lain yang tidak diinginkan. Primer dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen pengkode polimerase yang terdapat pada bank data NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Perancangan primer dilakukan secara manual dan dikonfirmasi menggunakan program DNASTAR berdasarkan untaian DNA dengan kode akses DO_0331.1. Primer dirancang pada nukleotida 1-19, dan 2541-2529 pada gen *PolHBV*, atau pada nukleotida 2307 – 2325 dan 1603 – 1620 pada genom total. Primer selanjutnya diproduksi oleh perusahaan Prologo di Singapura.

Perbanyak potongan DNA pengkode protein PolHBV

Genom diperoleh dari laboratorium klinis Pramita Lab, cabang Matraman, Jakarta. Volume PCR sejumlah 25 µL dibuat dengan mencampurkan 0,5 µL *Taq Polymerase* 5 Unit (U), 2,5 µL larutan dapar *Taq* 10X, 0,5 µL dNTP 200 mM, 0,5 µL primer *forward* (P2529F) 30 µM, 0,5 µL primer *reverse* (P2529R) (Eurogentec AIT) 30 µM, 2 µL MgCl₂ 25 mM, dan gelatin 1% (b/v). Kemudian pada campuran tersebut ditambahkan 2 µL cetakan DNA dan digenapkan dengan air suling ganda steril

sampai 25 µL. Kondisi PCR yang digunakan berdasarkan metode LPCR.⁶ Reaksi PCR dilakukan sebanyak 40 siklus, setiap siklus terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 40 detik, penempelan pada 47°C selama 90 detik, dan pemanjangan serpihan potongan DNA pada 68°C selama 3 menit dengan penambahan waktu pemanjangan selama 2 menit pada setiap 10 siklus. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa 0,75% b/v menggunakan larutan dapar *Tris Acetat EDTA* (TAE), pada tegangan 80V, kekuatan arus 400 mA, selama 60 menit. Sebagai petanda DNA digunakan petanda DNA 1 kpb (MD. Bio).

Penentuan Urutan Nukleotida potongan DNA pengkode protein PolHBV

Produk PCR selanjutnya dianalisa urutan nukleotidanya menggunakan metode sekuensing dengan alat sekuenser otomatis melalui jasa pengerjaan sekuensing Macrogen, Korea. Sekuensing dilakukan menggunakan satu untai primer internal PHBVFwd2 dengan urutan 5' – ACTCCTgCTCAAggAACCTC – 3'. Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisa dan keberadaan mutasi diperiksa. Pemeriksaan dilakukan dengan membandingkan urutan nukleotida produk PCR dengan urutan nukleotida HBV galur alami sensitif antivirus yang terdapat di GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kerangka baca terbuka gen pengkode PolHBV memiliki keragaman nukleotida pada posisi tertentu meskipun pada genotype yang sama. Urutan nukleotida sampel genom HBV yang diperoleh belum diketahui urutan nukleotida yang pasti. Keragaman nukleotida yang terdapat pada daerah yang hendak diperbanyak menyebabkan primer harus degeneratif. Primer degeneratif adalah campuran primer serupa yang mengandung basa nukleotida berbeda di beberapa

posisi.¹² Hal ini bertujuan agar primer yang telah dirancang dapat mengenali beberapa genom yang beragam urutan nukleotida pada posisi tertentu.

Hasil analisis menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) menunjukkan bahwa sepasang primer yang dirancang benar mengenali kerangka baca terbuka gen pengkode PolHBV dengan tingkat homologi yang tinggi yaitu 89% (Gambar 2 dan 3). Hal ini

memastikan primer yang telah dirancang mengenali genom pada posisi yang diinginkan, yaitu pada posisi 2307 – 2325 (P2529F) dan pada posisi 1603 – 1620 (P2529R). Urutan primer yang diperoleh adalah P2529F (5' – ATgCCCCTATCYTATCMAC – 3') dan P2529R (5' – CggTggTYTCCATgCAAC – 3') dimana Y adalah C atau T, M adalah A atau C.

Download ▾ GenBank Graphics

Hepatitis B virus DNA, complete genome, isolate: 11B18
Sequence ID: [dbj|AB674504.1](#) Length: 3215 Number of Matches: 1

Range 1: 2307 to 2325 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
32.4 bits(15)	30	17/19(89%)	0/19(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   ATGCCCTATCYTATCMAC 19
          |||
Sbjct 2307 ATGCCCTATCTTATCAAC 2325
    
```

Gambar 2. Hasil penentuan tingkat homologi P2529F terhadap genom virus Hepatitis B.

Download ▾ GenBank Graphics

Hepatitis B virus DNA, complete genome, isolate: KWgib7
Sequence ID: [dbj|AB823659.1](#) Length: 3191 Number of Matches: 1

Range 1: 1603 to 1620 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
33.4 bits(16)	15	17/18(94%)	0/18(0%)	Plus/Minus

```

Query 1   CGGTGGTYTCCATGCAAC 18
          |||
Sbjct 1620 CGGTGGTCTCCATGCAAC 1603
    
```

Gambar 3. Hasil penentuan tingkat homologi P2529R terhadap genom virus Hepatitis B.

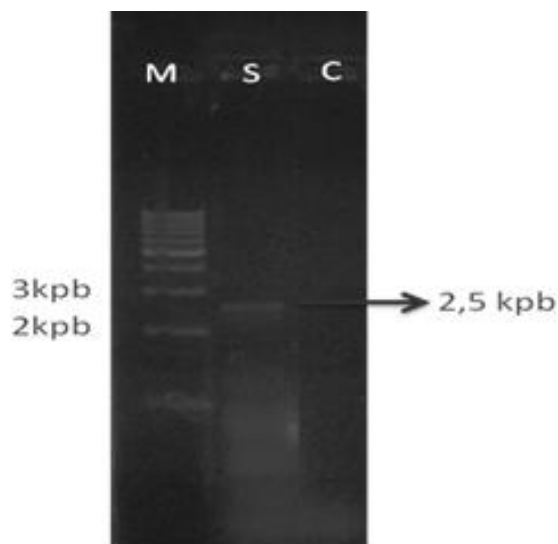
Kerangka baca terbuka pengkode polHBV berhasil diamplifikasi menggunakan primer P2529F dan P2529R dengan metode LPCR yang dimodifikasi. Analisis menggunakan elektroforesis gel agarose 0,75% menunjukkan keberadaan potongan DNA yang berukuran di antara 2000 pb dan 3000 pb (Gambar 4). Analisis untuk menentukan ukuran potongan DNA lebih lanjut dilakukan menggunakan kurva migrasi. Analisis ini dilakukan dengan cara mengukur jarak migrasi potongan DNA dan membandingkannya dengan jarak migrasi petanda DNA yang digunakan. Data yang

diperoleh digunakan untuk menghasilkan kurva linear dengan persamaan kurva tersebut. Persamaan yang diperoleh adalah $y = -0,4093x + 4,4634$ dengan x = jarak migrasi potongan DNA yang diperoleh, yaitu 2,59 cm. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa potongan DNA yang diperoleh sesuai dengan ukuran teoritis yaitu 2529 pb (Tabel 1 dan Gambar 5).

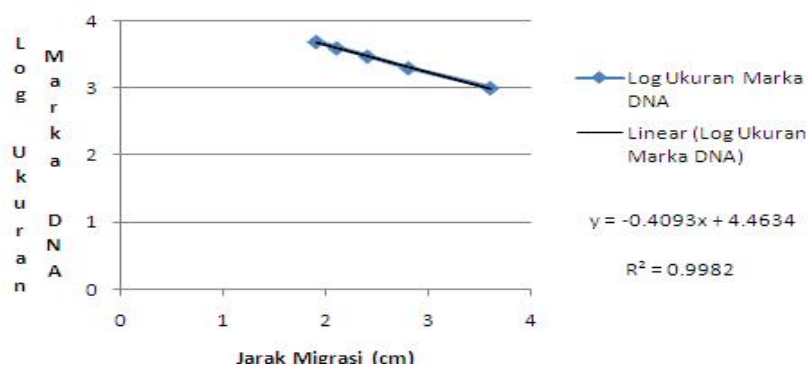
Urutan potongan DNA pengkode PolHBV diperiksa lebih lanjut menggunakan analisis penentuan urutan nukleotida. Hasil penentuan urutan

nukleotida dianalisis dengan membandingkan urutan nukleotida gen pengkode polimerase HBV yang disimpan di GenBank menggunakan program BLAST di alamat www.ncbi.nlm.nih.gov. Analisis penentuan urutan nukleotida dilakukan

menggunakan alat sekuenser otomatis. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa DNA sisipan memiliki homologi 98% dengan urutan nukleotida gen PolHBV yang memiliki kode akses DO_0331.1 karena keberadaan nukleotida yang berbeda.



Gambar 4. Amplifikasi dengan metode LPCR. Lajur pertama (M) adalah petanda DNA 1 kpb. Lajur kedua (S) adalah sampel yang mengandung genom HBV yang diperbanyak. Lajur ketiga adalah control negatif.



Gambar 5. Kurva migrasi potongan DNA pengkode Polimerase Virus Hepatitis B

Namun demikian hasil penentuan urutan nukleotida potongan DNA pengkode PolHBV menggunakan PHBVfwd2 yang merupakan primer internal (berkomplemen dengan domain RT pada potongan DNA pengkode PolHBV) juga menunjukkan bahwa motif YMDD tetap terpelihara (Gambar 5). Motif YMDD merupakan domain yang paling terpelihara dan terlibat dalam pengikatan nukleotida pada situs

katalitik daerah polHBV. Mutasi pada daerah YMDD ini menyebabkan kekebalan terhadap anti virus.

Pada penelitian ini, kerangka baca terbuka gen pengkode polHBV telah berhasil diperbanyak menggunakan metode LPCR. Sebelumnya PCR baku telah diterapkan dengan berbagai kondisi, namun tidak memberikan amplikon yang

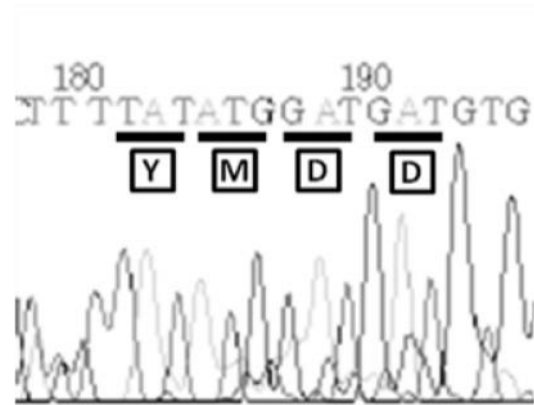
diharapkan. Ini terlihat dari diperolehnya pita DNA dengan ukuran yang tidak sesuai. Hal ini mungkin disebabkan oleh proses penempelan yang tidak spesifik sehingga menghasilkan amplicon yang tidak spesifik pula. Selain itu, mungkin juga karena disebabkan oleh terbentuknya struktur sekunder yang menyebabkan penghentian dini dimana proses polimerisasi berhenti lebih cepat dari pada yang diharapkan. Kemungkinan penjelasannya adalah karena potongan DNA yang diamplifikasi berukuran besar dan memiliki persentase G-C tinggi menyebabkan pembentukan struktur sekunder yang stabil seperti pembentukan *hairpin* yang menghambat proses perpanjangan.

Tabel 1. Penentuan Ukuran Produk PCR Potongan Kerangka Baca Terbuka Gen Pengkode Polimerase Virus Hepatitis B

Ukuran Marka DNA (pb)	Log Ukuran Marka DNA	Jarak Migrasi (cm)
5000	3.698	1.9
4000	3.602	2.1
3000	3.477	2.4
2000	3.301	2.8
1000	3	3.6

Perbanyakkan dengan metode LPCR menggunakan waktu denaturasi yang singkat, hal ini bertujuan untuk menghindari proses depurinasi. Proses depurinasi biasanya tidak menjadi masalah pada PCR baku, tetapi jika diterapkan pada LPCR, depurinasi bisa secara bermakna mempengaruhi keberhasilan proses amplifikasi. Hal ini terjadi karena pada potongan DNA yang berukuran lebih panjang mengalami kemungkinan depurinasi yang proporsional lebih tinggi dibandingkan potongan DNA yang lebih pendek.¹³ Depurinasi yang ekstensif juga terjadi pada tahap elongasi akhir. Untuk itu, pada penelitian ini, tahap denaturasi awal dan

pemanjangan akhir tidak digunakan. Gunther dkk. menyatakan bahwa penggunaan suhu pemanjangan 68°C daripada 72°C juga meningkatkan keberhasilan proses perbanyakkan amplifikasi secara bermakna.



Gambar 6. Hasil penentuan urutan nukleotida potongan DNA pengkode PolHBV dengan PHBVfwd2, (TAT = Tirosin (Y), ATG = Metionin (M), GAT = Aspartat (D))

Pada penelitian ini, hasil penentuan urutan nukleotida menunjukkan tingkat homologi 98% terhadap gen polimerase yang disimpandi GenBank. Ketidakcocokan yang ada mungkin disebabkan oleh penggunaan enzim *Taq Polymerase* yang tidak memiliki aktifitas eksonuklease 3'-5' (*proof reading*), sehingga kesalahan dalam proses polimerisasi tidak diperbaiki. Kelemahan enzim *Taq Polymerase* ini menyebabkan perbedaan nukleotida di beberapa tempat. Hal ini bisa dihindari dengan memanfaatkan aktifitas *proof reading* dari enzim polimerase lain seperti polimerase *Pfu*.¹⁴ Penggunaan polimerase *Pfu* atau enzim polimerase dengan aktifitas *proof reading* yang lain tidak dapat dilakukan pada penelitian ini karena primer yang digunakan untuk perbanyakkan kerangka baca terbuka gen pengkode PolHBV adalah primer degeneratif. Penggunaan polimerase *Pfu* pada penelitian ini menyebabkan potongan DNA yang diinginkan tidak teramplifikasi karena

eksonuklease 3'-5' dari enzim *Pfu* dapat menghancurkan primer generatif.

KESIMPULAN

Potongan DNA kerangka baca terbuka gen pengkode PolHBV berhasil diperbanyak menggunakan teknik LPCR 1 jenis enzim *Taq polymerase* dan primer yang dirancang secara generatif.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, peneliti menyarankan agar teknik LPCR dapat dipertimbangkan untuk diterapkan dalam optimalisasi PCR yang amplifikasinya berukuran lebih dari 2,5 kbp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada DIKTI yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ponce M. R, and Micol J. L, 1992, PCR Amplification of Long DNA Fragments. *Nucleic Acid Research* 20: 623.
2. Cheng dkk., 1994, Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA. *Proc.Nati.Acad.Sci. USA* 91: 5695-5699.
3. Barnes, W. M, 1994, PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from 1 bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 91:2216-2220.
4. Tellier dkk., 1996, Long PCR and Its Application to Hepatitis Viruses: Amplification of Hepatitis A, Hepatitis B, and Hepatitis C Virus Genomes. *Journal of Clin. Microbiol.* 34(12): 3085-3091.
5. Gunther dkk., 1998, Amplification of Full-Length Hepatitis B Virus Genomes From Samples from Patients with Low Levels of Viremia: Frequency and Functional Consequencies of PCR-Introduced Mutations. *Journal of Clin. Microbiol.* 36: 531 – 538.
6. Stuyver dkk., and The HEP DART International Committee, 2000, Nomenclature for Antiviral-Resistant Human Hepatitis B Virus Mutation in the Polymerase Region, The HEP DART International Committee U.S.
7. Allen dkk. 1999. Two Sensitive PCR-Based Methods for Detection of Hepatitis B Virus Variants Associated with Reduced Susceptibility to Lamivudine, *Journal of Clin. Microbiol.* 37, 3338-3347.
8. Beck J, and Nassal M. 2007. Hepatitis B Virus Replication. *World J Gastroenterol* 13(1): 48-64.
9. Lam dkk., 2004. Reverse Transcriptase Activity of Hepatitis B Virus (HBV) DNA Polymerase within Core Capsid: Interaction with Deoxynucleoside Triphosphates and Anti-HBV L-Deoxynucleoside Analog Triphosphates. *Mol Pharmacol* 65:400-406.
10. Nakanishi dkk., 2005. Polymerase Domain B Mutation Is Associated with Hepatitis Relapse during Long-Term Lamivudine Therapy for Chronic Hepatitis B. *Intervirology* 48:381-388.
11. Loffert dkk., 1998, PCR Optimization: Degenerate Primers. QIAGEN GmbH, Hilden, Germany.
12. Kobsch S, Decker K, Loffert D, 2002, A New Protocol for Highly Efficient Amplification of Long PCR Products. QIAGEN GmbH, Hilden, Germany.
13. Cline J, Braman J.C, Hogrefe H.H, 1996, PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and Other Thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acid Research* 24 (18): 3546-3551.

