

RINGKASAN

ISOLASI FRAGMEN cDNA GEN HYALURONIDASE DARI TESTIS MENCIT (*Mus musculus L.*) HASIL AMPLIFIKASI RT-PCR

Itsna Ulfyanti

Gen hyaluronidase yang disandi dalam urutan basa nukleotida (DNA) merupakan gen yang penting dalam pembentukan enzim hyaluronidase, dimana enzim ini yang berperan dalam proses fertilisasi melalui penetrasi sel sperma ke dalam dinding sel ovum. Penelitian tentang isolasi fragmen cDNA gen hyaluronidase dari testis mencit ini merupakan penelitian awal dari serangkaian penelitian untuk menguji mutagenitas hyaluronidase setelah diberi fraksi air Gendarussa sebagai syarat obat kontrasepsi yang ideal.

Penelitian ini bersifat kualitatif yang bertujuan mendapatkan dan memperbanyak cDNA testis mencit yang menyandi gen hyaluronidase dalam jumlah yang tidak terbatas dengan metode amplifikasi RT-PCR dalam waktu yang relatif singkat (3-4 jam), efektif, dan spesifik dengan panjang nukleotida 710 bp.

Penelitian ini dimulai dengan mengisolasi total RNA dari testis mencit jantan dewasa (± 2 bulan) dengan metode isolasi yang ada pada Sambrook *et.al*, 1989. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi spesifitas reaksi RT-PCR, diantaranya *primer* dan suhu *annealing*. Sebelum memulai proses RT-PCR didesain dahulu *primer forward* dan *reverse* dengan cara menghomologkan hasil *sequencing* nukleotida gen hyaluronidase testis mencit dengan beberapa spesies mencit (*Mus musculus L.*) dan tikus (*Rattus norvegicus*). Melalui proses RT-PCR, total RNA sebagai RNA *template* ini diubah menjadi cDNA dan diperbanyak. Untuk mengetahui keefektifan proses digunakan kontrol positif yang terdapat pada *Kit* RT-PCR dari PROMEGA. Hasilnya adalah urutan basa nukleotida dengan panjang 710 bp. Faktor kedua selain *primer* adalah temperatur *annealing*. Pada penelitian ini digunakan suhu 55° C dan setelah dilakukan RT-PCR menunjukkan bahwa pada suhu 55° C hasilnya kurang bagus (masih ada *band-band smear*). Setelah itu dicobakan suhu *annealing* 57° C dan ternyata didapatkan *single band* yang jelas, kemudian *band* diisolasi dari gel agarosa 1% menghasilkan *band* dengan *recovery* yang tinggi, hal ini terlihat dari adanya *band* tunggal saat dielektroforesis. cDNA murni hasil isolasi dari gel ini dapat digunakan untuk proses lebih lanjut seperti, kloning gen atau sebagai *probe* pada analisis *northern blot*.

Keberhasilan proses RT-PCR tidak terlepas dari kendala seperti, faktor *human* dan instrumen sehingga disarankan untuk selalu berhati-hati dalam setiap tahap proses untuk mencegah terjadinya kontaminasi maupun *carryover* dengan selalu menjaga setiap bahan dan alat agar bebas dari DNA/RNA.

ABSTRACT

Isolation of cDNA Hyaluronidase Gene Fragment from Mice Testis, The Result of RT-PCR Amplification

Hyaluronidase gene is one of genes in DNA mice testis that related to hyaluronidase enzyme taken a part of fertilization process. Hyaluronidase gene of mice testis which is 710 bp of a specific cDNA fragment had been amplified by RT-PCR and got a lot of cDNA fragments that specific and done in a short time. Many factors can affect the RT-PCR reactions including *primer* and annealing temperature. Primer was made first time before starting RT-PCR process. There are two kinds of primer i.e. primer forward and primer reverse to define sequences and used for synthesize cDNA from RNA. Total RNA is isolated from mice testis and became RNA template in RT-PCR process and than for processing RT-PCR amplification using annealing temperature 57° C. This RT-PCR product was isolated from 1% agarose gel resulting a pure and specific single band of 710 bp cDNA long. It can used for next experiment such as cloning gene and northern blot analysis.

Key words: hyaluronidase gene, mice testis, cDNA, RT-PCR analysis