MODUL PRAKTIKUM

IDENTIFIKASI MIRNA146A MENGGUNAKAN qPCR

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA

2020

PETUNJUK UMUM

1. **Tujuan Melakukan Praktikum**

   Melihat sendiri hasil praktikum.

   Membandingkan hasil percobaan dengan pendapat-pendapat/teori-teori yang ada dan kemudian mengambil kesimpulan akhir.

   Membantu dalam mempelajari efek yang ditimbulkan / diharapkan.

2. **Cara Pelaksanaan**

   Modul Praktikum digunakan sebagai pegangan dalam pelaksaan praktikum secara mandiri.

   Pada setiap kegiatan selalu dilakukan pencatatan pada buku catatan harian (log book).

   Pada setiap pelaksanaan praktikum, selalu didampingi oleh dosen dan analis laboratorium.

3. **Penilaian/Evaluasi**

   Penilaian dilakukan terhadap proses dan hasil akhir praktikum yang dilakukan.

   Pada akhir pelaksanaan praktikum dilakukan pembuatan laporan praktikum.

4. **Aturan Pelaksanaan**

   Lakukan praktikum sebaik-baiknya dan dengan tertib.

   Adakan persiapan secukupnya tiap kali akan melakukan praktikum, agar percobaan-percobaan yang dilakukan dapat bermanfaat.

   Ambillah pelajaran sebanyak mungkin dari percobaan yang dilakukan.

   Berhati-hatilah menggunakan alat-alat dan bahan-bahan praktikum.

PRAKTIKUM IDENTIFIKASI MIRNA146A MENGGUNAKAN qPCR

PENGANTAR

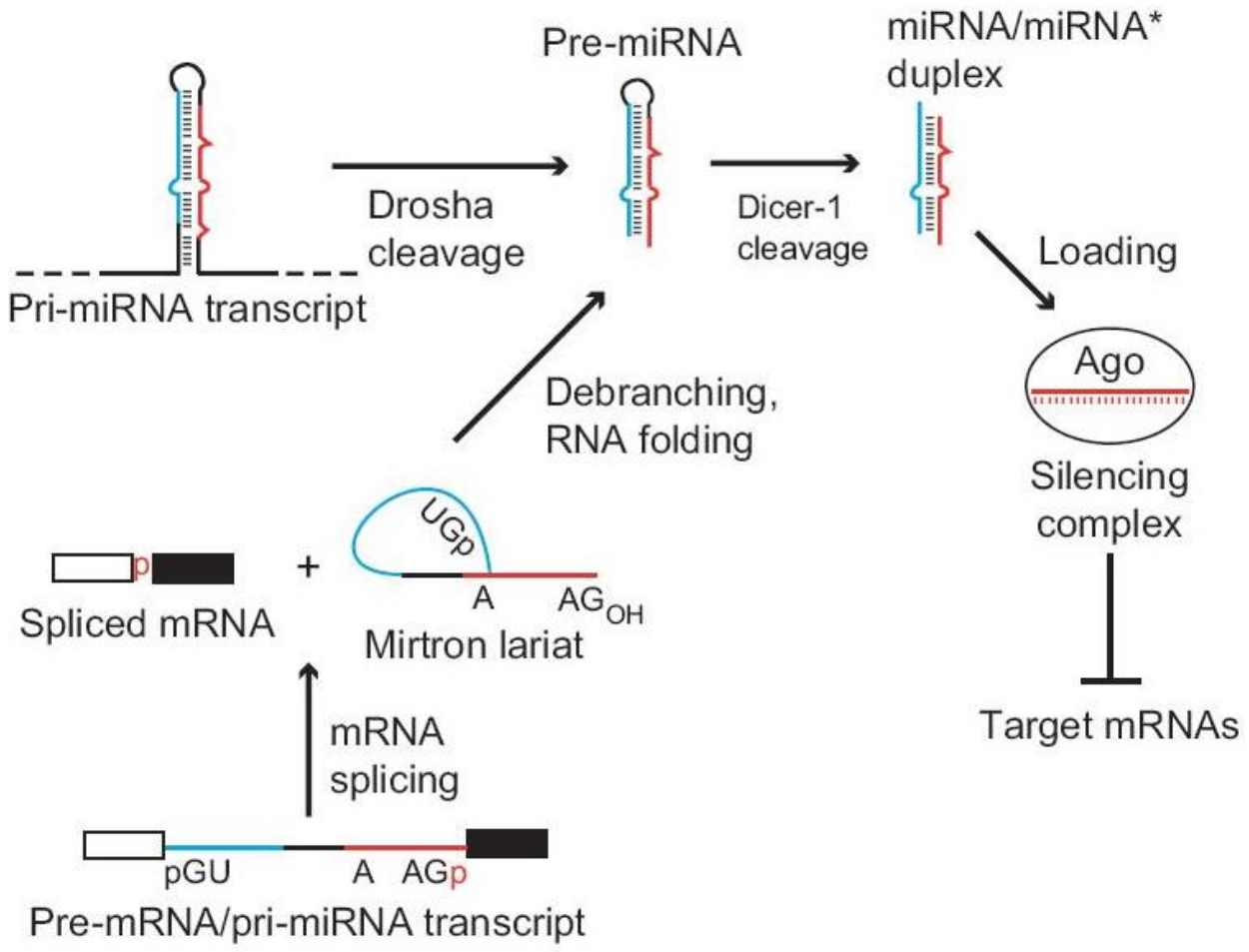
Molekul miRNA terdiri dari molekul RNA utas tunggal yang memiliki 2-25 nukleotida. miRNA normalnya akan berikatan dengan 3' *untranslated region* (UTR) dari target *messenger* RNA (mRNA) yang akan menyebabkan inhibisi dari translasi dan/atau degradasi mRNA (Djuranovic, Nahvi and Green, 2012). miRNA yang awalnya berbentuk dupleks akan terlepas kemudian membentuk *guide strand* (utas pemandu) yang bersifat komplementer dengan mRNA target lalu menempel pada RNA-*induced silencing complex* (RISC). Apabila miRNA dan target mRNA bersifat komplementer secara sempurna, RISC akan memotong target mRNA. Kebanyakan miRNA menunjukkan ketidaksesuaian dengan target mRNA, sehingga menghasilkan represi translasi dari gen target yang diinduksi RISC dengan hibridisasi miRNA ke 3' UTR. Hibridisasi miRNA ini akan menyebabkan represi dari tahap inisiasi dan elongasi translasi sehingga menyebabkan penurunan ekspresi protein (Baek *et al.*, 2008).

Biomarker miRNA spesifik misal miRNA146a diketahui memiliki fungsi regulatorik terhadap beberapa proses dan status patofisiologis penyakit terkait komplikasi diabetes seperti retinopati, nefropati ataupun nefropati diabetik. Pada kasus retinopati diabetik, penurunan level dari miRNA146a diketahui terjadi pada serum pasien DMT2 yang diasosiasikan dengan inflamasi kronis (Baldeón *et al.*, 2014). Pada model tikus diabetik nefropati, ditemukan pula inhibisi dari ekspresi miRNA146a MiRNA146a juga berfungsi sebagai regulator pada nervus sciatikus model tikus diabetes neuropati (Feng *et al.*, 2018)**.**

A. BIOGENESIS MIRNA

Tahapan biogenesis miRNA dimulai dengan pembentukan dari transkrip pri-miRNA. Kompleks mikroprosesor yang terdiri dari Drosha dan DGCR8 akan memotong pri-miRNA menjadi precursor-miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA kemudian dikeluarkan ke sitoplasma dari nukleus dengan bantuan dari Exportin5 untuk mengalami proses maturasi. Proses maturasi menghasilkan dupleks miRNA dengan 2 utas. Utas pemandu akan berikatan dengan kelompok protein Argonaute (Ago) dan miRNA-*induced silencing complex* (miRISC) (Ruby *et al.*, 2007).

Apabila kompleks miRISC ini menempel dan komplementer dengan target mRNA maka akan terjadi proses penekanan translasi dan juga degradasi dari mRNA target. miRNA146a akan komplementer dengan mRNA protein adaptor TRAF6 dan IRAK1 yang menyebabkan penurunan ekspresi dari kedua protein tersebut sehingga tidak terjadi aktivasi pensinyalan inflamasi. Hal inilah yang menyebabkan miRNA146a cocok sebagai target biomarker baru spesifik untuk mendeteksi progresivitas komplikasi DMT2 (Ruby *et al.*, 2007).



Gambar 1. Biogenesis miRNA

B. IDENTIFIKASI MIRNA146A MENGGUNAKAN qPCR

Alat dan Bahan:

- Sampel darah
- RNA Total
- Total RNA Kit
- *Primer* RNA forward dan reverse (5'-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGT-3' dan 5'-CGGCAATTGCACTGGATACGACaaccca-3')
- *Forward primer* untuk miRNA146a adalah GGGTGAGAACTGAATTCCA dan menggunakan pula *reverse primer* CAGTGCGTGTCGTGGAGT.
- *Forward primer* untuk gen normalisasi (RNAU6–1 *small nuclear*) 5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′ dan *reverse primer* 5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′
- dNTP, *nuclease-free water*, *buffer* yang sesuai

Prosedur Kerja:

Adapun prosedur kerja yang dilakukan untuk mengidentifikasi miRNA146a menggunakan qPCR yaitu:

- Ekstraksi RNA total dilakukan dari sampel darah menggunakan Total RNA Kit (Tiangen Biotech Beijing, China) sesuai dengan protokol manufaktur.
- RNA total kemudian dilakukan *reverse transcription* menjadi rantai pertama cDNA menggunakan primer spesifik *reverse transcription* untuk *stem loop primer* yaitu 5'-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGT-3' dan 5'-CGGCAATTGCACTGGATACGACaaccca-3'.
- Campuran reaksi sebanyak 20 µL berisikan 20 ng total RNA, 2 μL primer, 2 μL dNTP, 1 μL RT *enzyme*, 2μL RT *buffer*, 0.5 μL (20 unit) RNase *inhibitor*, dan *nuclease-free water* hingga volume mencapai 20 μL.
- cDNA kemudian dilarutkan hingga volume 200 μL.

- Jumlah target miRNA (miRNA146a) dinormalisasi terhadap RNA referensi endogen (RNAU6–1 *small nuclear*). Kuantitas relatif dari miRNA146a dinormalisasi terhadap kuantitas relatif dari gen referensi (RNAU6–1 *small nuclear*) dengan *forward primer* 5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′ dan *reverse primer* 5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′ (Abdulfattah, 2020). *Fold expression changes* dikalkukasi menggunakan persamaan $2^{-\Delta\Delta ct}$.
- *Real time q*PCR dilakukan menggunakan *super real premix plus* (*sybr green*) kit (TIANGEN, Biotech, Beijing).
- *Forward primer* untuk miRNA146a adalah GGGTGAGAACTGAATTCCA dan menggunakan pula *reverse primer* CAGTGCGTGTCGTGGAGT.
- Campuran reaksi berisikan 10 μL 2x *super real premix plus*, 1 μL *forward primer*, 1μL *reverse primer*, 5 μL cDNA, 0.4 50x ROX *reference dye*, dan 2.6 *RNase-free water*.
- Amplifikasi miRNA146a dan U6 dilakukan di dalam tabung PCR terpisah. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan primer 62°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 1 menit dan ekstensi final pada suhu 72°C selama 10 menit (Ele-Refaei, 2015).

DAFTAR PUSTAKA

Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. 2008. The impact of microRNAs on protein output. Nature. 455(7209):64-71.

Baldeón R, L., Weigelt, K., de Wit, H., Ozcan, B., van Oudenaren, A., Sempértegui, F., Sijbrands, E., Grosse, L., Freire, W., Drexhage, H. A., & Leenen, P. J. 2014. Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. PloS one, 9(12), e115209.

Djuranovic S, Nahvi A, Green R. 2012. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. Science. 336(6078):237-40.

Ele-Refaei, A. M. dan El-Esawy, F. M. 2015 Effect of Narrow-Band Ultraviolet B Phototherapy and Methotrexate on MicroRNA (146a) Levels in Blood of Psoriatic Patients. *Dermatology Research and Practice*, 2015:145769.

Feng Y, Chen L, Luo Q, Wu M, Chen Y, Shi X. 2018. Involvement of microRNA-146a in diabetic peripheral neuropathy through the regulation of inflammation. Drug Des Devel Ther. 12:171-177.

Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature. 2007 Jul 5;448(7149):83-6.