

OPTIMASI DAN VALIDASI KONDISI *POLYMERASE CHAIN REACTION* PADA IDENTIFIKASI CYP2A6*9

Cindy

cindy.na13@gmail.com

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, Indonesia

ABSTRAK

CYP2A6 merupakan anggota famili CYP2 dari sitokrom P450 dan diketahui memiliki polimorfisme yang tinggi. CYP2A6*9 merupakan alel CYP2A6 yang mengalami mutasi titik pada *TATA box* (T-48G) pada ujung '5 sehingga menyebabkan penurunan aktivitas. Adanya polimorfisme pada CYP2A6 dapat dideteksi dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Adapun parameter penting yang mempengaruhi spesifisitas reaksi dalam PCR antara lain suhu penempelan primer (*annealing*) dan jumlah siklus amplifikasi.

Primer *forward*, primer *reverse* dan reagen yang digunakan dalam penelitian ini berturut-turut adalah 5'-GAT TCC TCT CCC CTG GAA C-3', 5'-GGC TGG GGT GGT TTG CCT TTA-3', dan Promega *Go Taq Green Master Mix*. Suhu *annealing* dioptimasi dengan pengaturan pada suhu 56°C, 60°C, dan 64°C, sedangkan siklus amplifikasi pada 25 siklus dan 30 siklus.

Adapun kondisi PCR optimum yang didapatkan: *initial denaturation* pada suhu 94°C selama 3 menit; diikuti dengan 30 siklus terdiri dari *denaturation* pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 70°C selama 25 detik; kemudian diakhiri dengan *final extension* pada suhu 72°C selama 5 menit. Kondisi ini memenuhi parameter spesifisitas dan reproduibilitas pada validasi metode analisis.

Kata kunci:

CYP2A6*9, CYP2A6*1, PCR, optimasi, validasi

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF CONDITION OF POLYMERASE
CHAIN REACTION USED FOR IDENTIFYING CYP2A6*9**

Cindy

cindy.na13@gmail.com

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

*CYP2A6 belongs to the CYP2 family of P450 cytochromes is known having a high polymorphism. CYP2A6*9 is an allele of CYP2A6 having point of mutation in TATA box (T-48G) that reduced its activity. The polymorphism of CYP2A6 could be determined using polymerase chain reaction (PCR). There have been a few parameters important for reaction specificity in PCR including annealing temperatures and amplification cycles number.*

5'-GAT TCC TCT CCC CTG GAA C-3', 5'-GGC TGG GGT GGT TTG CCT TTA-3', and Promega Go Taq Green Master Mix were used as the forward primer, the reverse primer, and the reagent in these study, respectively. The annealing temperature were optimized by adjusting the temperature at 56°C, 60°C, and 64°C, while the amplification cycles were at 25 cycles and 30 cycles.

The PCR was carried out under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 3 minutes; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and extension at 70°C for 25 seconds; and subsequently a final extension at 72°C for 5 minutes. These conditions met parameters of specificity and reproducibility on analytical method validation.

Keywords: *CYP2A6*9, CYP2A6*1, PCR, optimize, validation*