

**PEMBENTUKAN DNA REKOMBINAN ANTARA VEKTOR
EKSPRESI pET-30a DENGAN GEN *pncA* PENYANDI ENZIM
PIRAZINAMIDASE DARI *Mycobacterium tuberculosis***

SKRIPSI



CHUMAIRA IFADA

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2022

**PEMBENTUKAN DNA REKOMBINAN ANTARA VEKTOR
EKSPRESI pET-30a DENGAN GEN *pncA* PENYANDI ENZIM
PIRAZINAMIDASE DARI *Mycobacterium tuberculosis***

SKRIPSI



CHUMAIRA IFADA

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2022

**PEMBENTUKAN DNA REKOMBINAN ANTARA VEKTOR EKSPRESI
pET-30a DENGAN GEN *pncA* PENYANDI ENZIM PIRAZINAMIDASE
DARI *Mycobacterium tuberculosis***

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia
pada Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Chumaira Ifada
NIM 081811533071

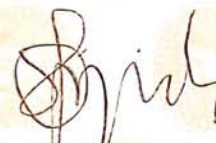
Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si.
NIP. 197211161997021001

Pembimbing II,



Drs. Sofijan Hadi, M.Kes.
NIP. 196507141992031001

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Pembentukan DNA Rekombinan Antara Vektor
Ekspresi pET-30a dengan Gen *pncA* Penyandi Enzim
Pirazinamidase dari *Mycobacterium Tuberculosis*
Penyusun : Chumaira Ifada
NIM : 081811533071
Pembimbing I : Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si.
Pembimbing II : Drs. Sofijan Hadi, M.Kes.
Tanggal Sidang : 26 Juli 2022

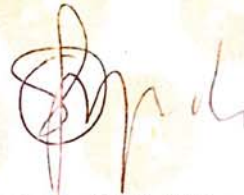
Disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,



Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si.
NIP. 197211161997021001



Drs. Sofijan Hadi, M.Kes.
NIP. 196507141992031001

Mengetahui,

Ketua Departemen Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga



Mochamad Zakki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D
NIP. 198307022009121005

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan atas rahmat, karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul **“Pembentukan DNA Rekombinan Antara Vektor Ekspresi pET-30a dengan Gen *pncA* Penyandi Enzim Pirazinamidase dari *Mycobacterium Tuberculosis*”**. Naskah skripsi ini disusun sebagai syarat untuk kelulusan program studi Sarjana Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

Terselesaikannya naskah skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih, terutama kepada:

1. Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing I atas seluruh waktu, bimbingan, ilmu, saran, nasihat, masukan, dan motivasi yang telah diberikan selama proses penyusunan hingga terselesaikannya naskah skripsi ini.
2. Bapak Drs. Sofijan Hadi, M.Kes., selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan masukan dan bersedia meluangkan waktu untuk berdiskusi selama proses penyusunan hingga terselesaikannya naskah skripsi ini.
3. Bapak Mochamad Zakki Fahmi, M.Si., Ph.D., selaku Ketua Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan bimbingan dalam hal akademik.
4. Ibu Siti Wafiroh, S.Si., M.Si., selaku dosen wali atas nasihat, motivasi, inspirasi, dan dukungan yang selalu diberikan selama menjalani proses perkuliahan.
5. Seluruh dosen pengajar Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga yang telah mengajarkan ilmu yang bermanfaat dalam proses studi.
6. Keluarga besar terutama kedua orang tua, Bapak Umar Sidik selaku ayah tercinta dan Ibu Siti Nikmah selaku ibu tersayang, beserta saudara penulis

yang tiada hentinya selalu memberikan doa, motivasi, dukungan, semangat, dan nasihat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.

7. Mbak Devi dan Mbak Renta selaku mentor terbaik, Cholifah dan Mbak Jazi selaku partner laboratorium, seluruh laboran, analis, tenaga kependidikan Departemen Kimia, dan segenap keluarga besar Biokimia yang senantiasa membantu dan menemani kegiatan penelitian penulis di laboratorium.
8. Tariza, Bella, dan Rahma yang selalu setia untuk berjuang bersama-sama dengan penulis dari awal masuk kimia hingga terselesaikannya penyusunan naskah skripsi ini.
9. Naufal, Faqih, Shadi, dan Risa selaku teman-teman seperjuangan skripsi biokimia cabang proteomik yang selalu kebersamai penulis, meluangkan waktu untuk berdiskusi, mendengarkan keluh kesah dan berbagi ilmu kepada penulis selama penyusunan naskah skripsi ini.
10. Agits, Vita, Hajar, Lidya, Diyah sebagai sahabat yang selalu memberikan motivasi dan berbagi tawa bersama penulis selama penyusunan naskah skripsi ini.
11. Teman-teman Kimia angkatan 2018 (H18RID) yang selalu kebersamai dan saling memberi semangat serta dukungan kepada penulis selama masa perkuliahan.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi, yang tidak bisa disebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa naskah skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran dari pembaca sangat diharapkan untuk perbaikan naskah skripsi ini.

Surabaya, 11 Juli 2022

Chumaira Ifada

Ifada, Chumaira, 2022. Pembentukan DNA Rekombinan Antara Vektor Ekspresi pET-30a dengan Gen *pncA* Penyandi Enzim Pirazinamidase dari *Mycobacterium tuberculosis*, skripsi ini dibawah bimbingan Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si. dan Drs. Sofijan Hadi, M.Kes. Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari urutan gen *pncA* *M. tuberculosis* isolate klinis R1 resisten pirazinamid terhadap isolat H sensitif pirazinamid. Metode yang digunakan adalah teknik subcloning gen *pncA* ke dalam vektor pET-30a. Pembentukan DNA rekombinan dilakukan melalui penyisipan gen *pncA* ke dalam vektor ekspresi pET-30a. Gen *pncA* disisipkan ke dalam vektor ekspresi pET-30a dengan enzim ligase. DNA rekombinan yang terbentuk dimasukkan *E. coli* TOP10 dalam proses transformasi. Plasmid rekombinan pET-30a-*pncA* dipotong dengan 2 enzim restriksi yaitu *NdeI* dan *Bgl/II* yang menghasilkan 2 fragmen DNA berukuran $\pm 5,4$ kb sesuai ukuran pET-30a *empty* dan $\pm 0,6$ kb sesuai ukuran gen *pncA*. Karakterisasi dilakukan dengan penentuan urutan nukleotida gen *pncA* menurut metode Sanger menggunakan primer T7 promoter dan terminator. Nukleotida hasil sekuesing disejajarkan dengan urutan nukleotida pembanding gen, yaitu *pncA* GenBank yang berasal dari *M. tuberculosis* sensitif obat pirazinamid. Hasil pensejajaran menunjukkan adanya mutasi nukleotida gen *pncA* dari isolat *M. tuberculosis* isolat R1, yaitu mutasi T41C, G419A dan A535G. Mutasi nukleotida gen tersebut mengubah urutan asam amino dari protein PZAse yang disandinya, yaitu penggantian asam amino Cis14Arg, Arg140His, dan Ser179Gly. Sementara gen *pncA* *M. tuberculosis* isolat H memiliki urutan yang sama dengan *pncA* GenBank, yaitu isolat sensitif obat pirazinamid. Gen *pncA* isolat R1 mengalami mutasi dibanding dengan gen *pncA* dari isolat H dan GenBank. Mutasi yang ada diduga menjadi penyebab munculnya resistensi obat pirazinamid pada isolat R1.

Kata kunci: gen *pncA* R1, pET-30a, pirazinamid, pirazinamidase (PZAse).

Ifada, Chumaira, 2022, Construction of Recombinant DNA from pET-30a Vector and The *pncA* Gene Encoding Pyrazinamidase Enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*, this thesis is under the supervision of Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si. and Drs. Sofijan Hadi, M.Kes. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRACT

This study aimed to study the *pncA* gene sequence of *M. tuberculosis* clinical isolate R1 pyrazinamide resistant against pyrazinamide sensitive H isolates. The method used is the *pncA* gene subcloning technique into the pET-30a vector. Recombinant DNA was carried out by inserting the *pncA* gene into the pET-30a expression vector. The *pncA* gene was inserted into the pET-30a expression vector with the ligase enzyme. Recombinant DNA formed by *E. coli* TOP10 in the transformation process. The recombinant pET-30a-*pncA* plasmid was cut with 2 restriction enzymes, namely *NdeI* and *BglII* which resulted in 2 DNA fragments measuring ± 5.4 kb according to the size of the empty pET-30a and ± 0.6 kb according to the size of the *pncA* gene. The characterization was carried out using the nucleotide sequence method of the *pncA* gene according to Sanger using T7 primers and terminators. The nucleotides from the sequencing were aligned with the nucleotide sequences of the gene comparison, namely *pncA* GenBank derived from pyrazinamide drug-sensitive *M. tuberculosis*. Alignment results showed that there was a nucleotide mutation of the *pncA* gene from the isolate *M. tuberculosis* isolate R1, namely mutations T41C, G419A and A535G. The nucleotide mutation of the gene changes the amino acid sequence of the PZase protein it encodes, namely the substitution of the amino acids Cys14Arg, Arg140His, and Ser179Gly. Meanwhile, the *pncA* gene of *M. tuberculosis* isolate H had the same sequence as the *pncA* GeneBank, which was a pyrazinamide drug sensitive isolate. The *pncA* gene of R1 isolate was mutated compared to the *pncA* gene of isolate H and GeneBank. The mutation is considered to be the cause of the emergence of pyrazinamide drug resistance in isolate R1.

Keywords: *pncA* R1 gene, pET-30a, pyrazinamide, pyrazinamidase (PZase)

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Chumaira Ifada
NIM : 081811533071
Program Studi : S1 Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

Pembentukan DNA Rekombinan Antara Vektor Ekspresi pET-30a dengan Gen *pncA* Penyandi Enzim Pirazinamidase dari *Mycobacterium tuberculosis*

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan Tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, Juli 2022



Chumaira Ifada
NIM. 081811533071

DAFTAR ISI

	halaman
SKRIPSI.....	i
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI.....	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
BAB II.....	5
TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan Tentang Enzim	5
2.1.1. Pengertian Enzim	5
2.1.2. Sifat-Sifat Enzim.....	5

2.1.3. Faktor yang Mempunyai Aktivitas Enzim	6
2.2. Tinjauan Tentang Enzim Pirazinamidase.....	7
2.2.1. Pengertian Enzim Pirazinamidase (PZAse/pncA)	7
2.3. Tinjauan Tentang Bakteri.....	8
2.3.1. Pengertian Bakteri.....	8
2.3.2. Bentuk Bakteri	9
2.3.3. Fase Pertumbuhan Bakteri	10
2.3.4. Bakteri Mycobacterium tuberculosis	11
2.3.5. Bakteri Eschericia coli	12
2.4. Tuberculosis di Dunia dan Indonesia.....	13
2.5. Gen pncA pada Isolat-isolat M. tuberculosis Resistensi Pirazinamidase	14
2.6. Tinjauan tentang Kloning Gen	15
2.6.1. Pengertian Kloning Gen.....	15
2.6.2. Komponen dalam Kloning Gen	17
2.7. Penanda Resistensi Antibiotik.....	17
2.8. Transformasi	18
2.9. Sekuensing DNA.....	19
2.10. Endonuklease Restriksi	20
BAB III	24
METODE PENELITIAN.....	24
3.1. Tempat dan Waktu penelitian	24
3.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	24
3.2.1. Bahan penelitian.....	24
3.2.2. Alat penelitian	25
3.3. Prosedur Penelitian.....	26
3.3.1. Diagram alir penelitian.....	26
3.4. Prosedur Kerja.....	27

3.4.1. Pembuatan Media.....	27
3.4.2. Transformasi E. coli TOP10 dengan plasmid dan seleksi transforman	27
3.4.3. Isolasi plasmid rekombinan.....	29
3.4.4. Pemotongan plasmid rekombinan dengan enzim restriksi.....	29
3.4.5. Analisis DNA dengan elektroforesis gel agarosa.....	30
3.4.6. Pemurnian DNA dari gel agarose	30
3.4.7. Kloning gen <i>pncA</i> ke dalam vektor pET-30a	31
3.4.8. Penentuan urutan nukleotida gen <i>pncA</i>	31
BAB IV	32
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1. Kultivasi isolat E. coli TOP10	32
4.2. Subkloning Gen <i>pncA</i> ke dalam Vektor pET-30a	33
4.2.1. Isolasi Plasmid Rekombinan	33
4.2.2. Restriksi Plasmid Rekombinan pGemT- <i>pncA</i>	35
4.2.3. Pemurnian DNA plasmid dari gel agarosa.....	37
4.3. Ligasi gen <i>pncA</i> ke dalam Plasmid pET-30a.....	38
4.4. Transformasi Plasmid Rekombinan pET-30a- <i>pncA</i>	40
4.5. Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan pET-30a- <i>pncA</i>	43
4.6. Penentuan Urutan Nukleotida gen <i>pncA</i>	44
4.7. Analisis Homologi Gen <i>pncA</i> Hasil Kloning	47
BAB V.....	51
KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
5.1. Kesimpulan	51
5.2. Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN.....	56

Lampiran 1. Pembuatan Reagen dan Larutan Stock	56
Lampiran 2. Pembuatan Media	57
Lampiran 3. Efisiensi Transformasi Plasmid pET-30a-pncA	57

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.1.	Jenis dan posisi mutasi tersering pada gen <i>pncA</i> <i>M. tuberculosis</i> isolat klinis dari beberapa daerah	15
2.2.	Komponen-komponen dari suatu eksperimen kloning	17
4.1.	Hasil transformasi	42
4.2.	Hasil analisis homologi BLAST	48
4.3.	Analisis hasil pensejajaran	50

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1.	Konversi nikotinamida dan pirazinamida menjadi bentuk asamnya oleh <i>pncA</i> /PZAse	8
2.2.	Bentuk Bakteri	10
2.3.	Bentuk Bakteri <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	12
2.4.	Bentuk Bakteri <i>E.coli</i>	12
2.5.	Proses Kloning	16
2.6.	Peta Vektor pET-30a	23
4.1.	Hasil isolasi plasmid pGemT- <i>pncA</i> rekombinan	35
4.2.	Analisis hasil restriksi pGemT- <i>pncA</i> R1	36
4.3.	Hasil pemurnian dari hasil restriksi <i>double digest</i>	38
4.4.	Perbedaan reaksi penggabungan yang dikatalisis oleh DNA ligase	39
4.5.	<i>E. coli</i> sebagai host kloning	40
4.6.	Hasil Transformasi	41
4.7.	Hasil elektroforegram dari hasil restriksi	43
4.8.	Elektroforegram hasil <i>sequencing</i> gen <i>pncA</i>	44
4.9.	Elektroforegram pensejajaran gen <i>pncA</i> isolate H, R1 dan GenBank	49
4.10.	Elektroforegram pensejajaran gen <i>pncA</i> isolate H, R1 dan GenBank	49

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran	Halaman
1.	Pembuatan Reagen dan Larutan Stock	56
2.	Pembuatan Media	57
3.	Efisiensi Transformasi	57