

**PENYISIPAN GEN *pncA* *Mycobacterium tuberculosis*
PENYANDI PIRAZINAMIDASE KE DALAM VEKTOR
pET30a UNTUK PREPARASI EKSPRESI PROTEINNYA**

SKRIPSI



THESALINA MEITARA PANJAITAN

**PROGRAM STUDI S1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

PENYISIPAN GEN *pncA* *Mycobacterium tuberculosis*
PENYANDI PIRAZINAMIDASE KE DALAM VEKTOR
pET30a UNTUK PREPARASI EKSPRESI PROTEINNYA

SKRIPSI



THESALINA MEITARA PANJAITAN

PROGRAM STUDI S1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022

**PENYISIPAN GEN *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* PENYANDI
PIRAZINAMIDASE KE DALAM VEKTOR pET30a UNTUK PREPARASI
EKSPRESI PROTEINNYA**

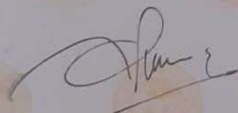
SKRIPSI

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

Thesalina Meitara Panjaitan
NIM. 081811533084

Disetujui oleh :

Pembimbing I,



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

Pembimbing II,



Dr. Sri Sumarsih, Dra., M.Si.
NIP. 196001101988102001

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Penyisipan Gen *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* Penyandi
Pirazinamidase ke dalam Vektor pET30a Untuk Preparasi
Ekspresi Proteinnya
Penyusun : Thesalina Meitara Panjaitan
NIM : 081811533084
Tanggal Ujian : 22 Juli 2022

Disetujui oleh :

Pembimbing I

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

Pembimbing II

Dr. Sri Sumarsih, Dra., M.Si.
NIP. 196001101988102001

Mengetahui,
Ketua Departemen Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga

Mochamad Zakki Fakmi, 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 Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penyisipan Gen *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* Penyandi Pirazinamidase ke dalam Vektor pET30a Untuk Preparasi Ekspresi Proteinnya”. Naskah proposal skripsi ini disusun guna memperoleh gelar sarjana sains bidang kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

Penyusunan naskah skripsi ini tidak lepas dari semua pihak yang telah membantu. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih, terutama kepada :

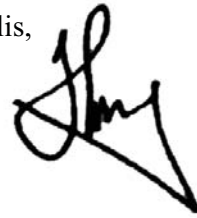
1. Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si. selaku Pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan dalam proses penyelesaian skripsi.
2. Dr. Sri Sumarsih, Dra., M.Si., selaku Pembimbing II yang telah banyak memberikan masukan dalam proses penyelesaian skripsi.
3. Mochamad Zakki Fahmi, M.Si., Ph.D. selaku Ketua Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga yang telah memberikan bimbingan dalam hal akademik.
4. Bu Siti Wafiroh, S.Si., M.Si. selaku dosen wali yang telah banyak memberikan bimbingan dalam proses penyelesaian skripsi maupun kegiatan akademik dan non akademik.
5. Seluruh dosen pengajar Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga yang telah mengajarkan ilmu dalam proses studi.
6. Kedua orang tua dan saudara-saudari saya yang selalu memberikan dukungan, semangat, motivasi dan doa demi kelancaran penyusunan naskah proposal skripsi ini.
7. Segenap keluarga Biokimia yang selalu memberikan ilmu, bantuan, semangat dan waktu dalam proses penyusunan naskah skripsi ini.
8. Teman-teman Kimia 2018 (Hibrid) yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.

9. Segala pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.

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

Surabaya, Juli 2022

Penulis,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Thesalina' followed by a stylized surname.

Thesalina Meitara Panjaitan

Panjaitan, T.M., 2022, Penyisipan Gen *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* Penyandi Pirazinamidase Ke Dalam Vektor pET30a Untuk Preparasi Ekspresi Proteinnya, Skripsi Dibawah Bimbingan Prof. Dr. Purkan, S.Si., M.Si. dan Dr. Sri Sumarsih, M.Si. Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan melakukan penyisipan gen *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam vektor pET30a untuk preparasi ekspresi proteinnya. Gen *pncA* disisipkan ke dalam vektor ekspresi pET30a DNA melalui proses transformasi *E. coli* TOP10. Karakterisasi pET30a-*pncA* rekombinan dilakukan melalui pemotongan dengan dua enzim restriksi yaitu *Bgl*III dan *Nde*I serta dilanjutkan dengan penentuan urutan nukleotida gen *pncA* dengan metode dideoxy-Sanger menggunakan primer T7 promotor dan T7 terminator kemudian hasil nukleotida yang terbaca dilakukan *multiple sequence alignment* menggunakan program DNASTAR : Seqman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* dapat disisipkan kedalam vektor plasmid pET30a DNA. Restriksi pET30a-*pncA* dengan metode *double digest* menggunakan enzim restriksi *Bgl*III dan *Nde*I menghasilkan 2 fragmen berukuran $\pm 5,4$ kb sesuai ukuran pET30a DNA dan $\pm 0,6$ kb sesuai ukuran gen *pncA*. Sedangkan pemotongan tunggal plasmid pET30a-*pncA* masing-masing dengan *Bgl*III dan *Nde*I menghasilkan 1 fragmen berukuran ± 6 kb. Gen *pncA* R2 memiliki 4 titik mutasi yakni, G76T; G112C; A403C; G419A yang menyebabkan kemungkinan struktur molekul proteinnya berubah sehingga menjadi resisten dengan PZA.

Kata Kunci : gen *pncA* R2, *Mycobacterium tuberculosis*, plasmid rekombinan

Panjaitan, T.M., 2022, Insertion of The *pncA* Gene Encoding Pyrazinamidase Enzyme From *Mycobacterium tuberculosis* Into pET30a Vector for Expression Preparing of Its Protein, Undergraduate Thesis under guidance of Prof. Purkan, S.Si., M.Si. and Dr. Sri Sumarsih, M.Si. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Airlangga University

ABSTRACT

This study aims to insert the *Mycobacterium tuberculosis* gene which is *pncA* gene into the pET30a vector to prepare its protein expression. The *pncA* gene was inserted into the pET30a DNA expression vector through the transformation process of *E. coli* TOP10. The characterization of recombinant pET30a-*pncA* was carried out by cutting with two restriction enzymes, *Bgl*/II and *Nde*I, followed with determination of the nucleotide sequence of the *pncA* gene using the dideoxy-Sanger method using T7 promotor and T7 terminator primers, then multiple sequence alignment was performed using DNASTAR : Seqman program. The results showed that the *Mycobacterium tuberculosis pncA* gene could be inserted into the pET30a DNA plasmid vector. Restriction of pET30a-*pncA* by double digest method using restriction enzymes *Bgl*/II and *Nde*I resulted in 2 fragments measuring ± 5.4 kb according to the size of pET30a DNA and ± 0.6 kb according to the size of the *pncA* gene. Meanwhile, single cutting of the pET30a-*pncA* plasmid with *Bgl*/II and *Nde*I, respectively, resulted in 1 fragment measuring ± 6 kb. The *pncA* R2 gene has 4 point mutations namely, G76T; G112C; A403C; G419A which causes the possible structure of the protein molecule to change so that it becomes resistant to PZA.

Key Word : *pncA* R2 gene, *Mycobacterium tuberculosis*, rekombinant plasmid

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Thesalina Meitara Panjaitan
NIM : 081811533084
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa tidak melakukan plagiasi dalam penelitian skripsi saya yang berjudul:

Penyisipan Gen *pncA* *Mycobacterium tuberculosis* Penyandi Pirazinamidase ke dalam Vektor pET30a Untuk Preparasi Ekspresi Proteinnya

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan tindakan plagiasi, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 3 Agustus 2022



Thesalina Meitara Panjaitan

NIM. 081811533084

DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Kasus Tuberkulosis di Dunia dan Indonesia	5
2.2. Resistensi Obat Penyakit Tuberkulosis.....	6
2.2.1. Obat penyakit tuberkulosis.....	6
2.2.2. Resistensi obat penyakit tuberkulosis	9
2.3. Enzim.....	10
2.3.1. Pengertian enzim.....	10
2.3.2. Sifat-sifat enzim	11
2.3.3. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim	11
2.4. Enzim Pirazinamidase (PZase).....	13
2.5. Pirazinamid (PZA)	13
2.5.1. Pengertian pirazinamid.....	13
2.5.2. Mekanisme kerja pirazinamid	13

2.6.	Gen <i>pncA</i>	14
2.7.	Vektor Plasmid	14
2.8.	Bakteri	16
2.8.1.	Bakteri <i>Escherichia coli</i>	16
2.8.2.	Bakteri <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.9.	Kloning Gen	16
2.9.1.	Pengertian dan tujuan kloning gen	16
2.9.2.	Komponen dalam kloning gen	17
2.10.	Mutasi Gen	18
2.10.1.	Pengertian	18
2.10.2.	Macam-macam mutasi	18
2.10.3.	Jenis mutasi gen berdasarkan perubahan genetik	19
BAB III METODE PENELITIAN		21
3.1.	Waktu dan Tempat	21
3.2.	Alat dan Bahan Penelitian	21
3.2.1.	Alat penelitian	21
3.2.2.	Bahan penelitian	21
3.3.	Diagram Alir Penelitian	23
3.4.	Prosedur Penelitian	24
3.4.1.	Pembuatan media cair	24
3.4.2.	Pembuatan media cair <i>ampicillin</i> (Amp) dan <i>kanamycin</i> (Kan)	24
3.4.3.	Pembuatan media padat	24
3.4.4.	Pembuatan media padat Amp dan Kan	24
3.4.5.	Kultivasi <i>E. coli</i> TOP 10	25
3.4.6.	Pembuatan sel kompeten <i>E. coli</i> TOP 10	25
3.4.7.	Transformasi	25
3.4.8.	Isolasi plasmid	26
3.4.9.	Elektroforesis gel agarosa	27
3.4.10.	Resktriksi pET30a dan pGEMT- <i>pncA</i>	27
3.4.11.	Ligasi gen <i>pncA</i> ke vektor pET30a dan seleksi klon (dengan enzim ligase)	27
3.4.12.	Sekuensing gen <i>pncA</i>	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		29

4.1.	Transformasi pGEMT- <i>pncA</i> dan pET30a	29
4.2.	Isolasi DNA pGEMT- <i>pncA</i> dan pET30a.....	31
4.3.	Restriksi Gen <i>pncA</i> dan Pemurniannya	32
4.4.	Ligasi Gen <i>pncA</i> dan Plasmid pET30a.....	33
4.5.	Transformasi Plasmid Rekombinan pET30a- <i>pncA</i>	34
4.6.	Isolasi DNA Rekombinan pET30a- <i>pncA</i> R2 dan H7	35
4.7.	Penentuan Urutan Nukleotida	37
4.8.	Analisis Hasil Sekuensing	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		43
5.1.	Kesimpulan.....	43
5.2.	Saran	43
DAFTAR PUSTAKA		44
LAMPIRAN.....		48

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.1	Kelompok obat anti-TBC	8
2.2	Komponen-komponen dari suatu eksperimen kloning	17
4.1	Tabel Profil Mutasi gen <i>pncA</i> dari <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Isolat R2 terhadap Isolat H7 dan Genbank serta Perubahan Asam Aminonya	42

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Obat lini pertama saat ini untuk terapi <i>M. tuberculosis</i> sensitif obat	6
2.2.	Ilustrasi skematik tempat aksi anti tuberkulosis yang tersedia	7
2.3	Konversi Pirazinamid menjadi bentuk asamnya oleh PZase	14
2.4	Gambar peta plasmid dari pET30a	15
4.1	Hasil Transformasi pGEMT- <i>pncA</i> dan pET30a	30
4.2	Elektroforegram pGEMT- <i>pncA</i> R2 dan H7 dan pET30a	32
4.3	Elektroforegram Pemotongan <i>Double Digest</i> pGEMT- <i>pncA</i> R2 dan H7 dengan Enzim <i>NdeI</i> dan <i>BglII</i>	33
4.4	Hasil Transformasi Ligasi	34
4.5	Elektroforegram Plasmid Rekombinan pET30a- <i>pncA</i> R2 dan H7	35
4.6	Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan pET30a- <i>pncA</i> R2 dan H7 dengan Enzim Restriksi <i>NdeI</i> dan <i>BglII</i>	36
4.7	Elektroforegram Hasil Sekuensing Gen <i>pncA</i> R2	37
4.8	Elektroforegram Hasil Pensejajaran Gen <i>pncA</i> Isolat R2 terhadap <i>pncA</i> Genbank dan Isolat H7	41

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1.	Pembuatan Reagen dan Larutan Stock
2.	Pembuatan Media