

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Sampul Luar .....	i
Halaman Sampul Dalam .....	ii
Halaman Prasyarat Gelar .....	iii
Halaman Pengesahan .....	iv
Kata Pengantar .....	v
Abstrak .....	vii
<i>Abstract</i> .....	viii
Daftar Isi .....	ix
Daftar Tabel .....	xi
Daftar Gambar .....	xii
Daftar Lampiran .....	xiv
Ringkasan .....	xv
<i>Summary</i> .....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4

1.3.1 Tujuan umum.....	4
1.3.2 Tujuan khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	PENELITIAN 20
BAB IV METODE PENELITIAN .....	25
4.1 Tempat dan waktu pelaksanaan.....	25
4.2 Alat dan bahan.....	25
4.3 Cara Kerja.....	26
4.4 Diagram alir.....	34
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	36
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	57
6.1 Tempat dan waktu pelaksanaan.....	57
6.2 Alat dan bahan.....	57
DAFTAR PUSTAKA .....	58
LAMPIRAN.....	65

## DAFTAR TABEL

No.	Judul Tabel	Halaman
Tabel 2.1	Beberapa penanda genetik yang digunakan dalam teknologi DNA rekombinan ragi.....	13
Tabel 5.1	Primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i> untuk amplifikasi gen <i>SLPI</i> ....	42



## DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Struktur membran amnion.....	5
Gambar 2.2	Mekanisme membran amnion pada penyembuhan luka...	6
Gambar 2.3	Ragi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
Gambar 2.4	Peta vektor pYHM1.....	14
Gambar 2.5	Reaksi hidrolisis serin protease terhadap ikatan peptide.....	18
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian.....	23
Gambar 4.1	Diagram alir isolasi gen penyandi SLPI.....	34
Gambar 4.2	Diagram alir isolasi DNA plasmid pYHM1.....	35
Gambar 4.3	Diagram alir cloning gen penyandi SLPI ke dalam pYHM1.....	35
Gambar 4.4	Diagram alir isolasi dan pemurnian protein SLPI.....	35
Gambar 5.1	Isolat <i>E. coli</i> TOP10.....	36
Gambar 5.2	Elektroforegram isolasi DNA plasmid pET-ESLPI.....	38
Gambar 5.3	Peta plasmid pET-ESLPI.....	39
Gambar 5.4	Elektroforegram isolasi DNA plasmid pYHM1.....	40

Gambar 5.5	Amplikon hasil PCR <i>SLPI</i> .....	43
Gambar 5.6	Reaksi ligasi secara umum.....	45
Gambar 5.7	Ikatan fosfodiester antara ujung 5'-fosfat dengan 3'-hidroksil pada rantai polinukleotida.....	45
Gambar 5.8	Reaksi ligasi pada ujung lengket dengan bantuan DNA ligase.....	45
Gambar 5.9	Transformasi plasmid ke sel inang <i>E. coli</i> .....	48
Gambar 5.10	Hasil transformasi ke dalam sel inang <i>E. coli</i> TOP10.....	49
Gambar 5.11	Elektroforegram hasil ligase.....	50
Gambar 5.12	BLAST antara hasil sekuensing pYHM1-ESLPI (query) dengan <i>SLPI</i> dengan nomor akses sekuen nukleotida EU116331 (subject).....	51
Gambar 5.13	Penampang koloni ragi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BJ1824.....	53
Gambar 5.14	Hasil uji kemampuan inhibisi SLPI terhadap enzim PPE.....	54
Gambar 5.15	Reaksi enzimatik antara substrat N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-NitroAnilin dengan enzim <i>porcine pancreatic elastase</i> .....	55

**DAFTAR LAMPIRAN**

No.	Judul Lampiran	Halaman
Lampiran 1.	Data hasil sekuensing plasmid pYHM1-ESLPI.....	65
Lampiran 2.	Data hasil BLAST dan urutan asam amino dari protein SLPI.....	66
Lampiran 3.	Data Absorbansi Uji Kemampuan Inhibisi SLPI Terhadap Enzim PPE.....	67
Lampiran 4.	Perhitungan.....	70
Lampiran 5.	Preparasi larutan.....	71

## RINGKASAN

Membran amnion merupakan salah satu bahan alami yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Bahan aktif dari membran amnion yang diduga mampu mempercepat proses penyembuhan luka adalah *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI). Munadzirah (2008) telah melakukan penelitian untuk mengisolasi gen penyandi *SLPI* dari membran amnion manusia dan mengkloning gen ke dalam sel inang *Escherichia coli* BL21 star. Ekspresi gen di dalam sel *E. coli* memiliki beberapa kekurangan, seperti protein SLPI diekspresikan dalam jumlah kecil dan secara intraseluler. Selain itu, *E. coli* merupakan mikroba prokariotik yang secara umum memiliki pirogen – pirogen dinding sel yang bersifat toksik (endotoksin) sehingga dipilih sel eukariot sebagai sel inang alternatif. Sel inang yang dianggap paling aman untuk keperluan komersial adalah ragi *Saccharomyces cerevisiae*. Penelitian Wirajana (2010) telah berhasil mengkonstruksi vektor pYHM1 yang sesuai untuk sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824. Penelitian ini bertujuan untuk mengekspresikan gen penyandi *SLPI* menggunakan sistem vektor pYHM1 di sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824, mensekresikan protein SLPI rekombinan ke dalam medium pertumbuhan, dan mengetahui kemampuan inhibisi protein SLPI dari membran amnion terhadap enzim *porcine pancreatic elastase* (PPE).

Tahap penelitian yang dilakukan meliputi isolasi DNA rekombinan pET-ESLPI dan pYHM1, amplifikasi *SLPI* menggunakan PCR, restriksi *double digest* menggunakan *EcoRI* dan *XhoI*, ligasi, transformasi ke dalam sel *E. coli* TOP10, sekuensing, transformasi ke dalam sel *S. cerevisiae* BJ1824, dan uji kemampuan inhibisi SLPI terhadap enzim PPE.

Kemampuan inhibisi paling besar ditunjukkan oleh SLPI yang berasal dari G ekstraseluler dan D ekstraseluler sebesar 66,67 %. Hal ini memberikan keuntungan karena pada proses produksi biomassa sel ragi tidak perlu menambahkan inducer galaktosa. Kemampuan inhibisi paling rendah ditunjukkan oleh SLPI yang berasal dari G intraseluler sebesar 33,33 %. Hal ini mungkin dikarenakan kemampuan SLPI intraseluler dalam menghambat enzim PPE dipengaruhi oleh protein intraseluler lainnya.

## SUMMARY

Amniotic membrane is one of natural substance which is capable of accelerating wound healing process. The active material from amniotic membrane which suspected can accelerate wound healing is secretory leukocyte protease inhibitor. Munadzirah (2008) has been done research to isolation of gene encoding SLPI from human amniotic membrane and cloning the gene into *Escherichia coli* BL21 star. The expression gene in *E. coli* has disadvantages, such as protein of SLPI was expressed in small numbers and intracellular. Furthermore, *E. coli* is a prokaryotic microbes, usually has pyrogen cell walls which is toxic (endotoxin) so that eukaryotic cell were selected as an alternative host cell. The host cell considered safe for commercial purposes is yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Wirajana's (2010) research has been successfully construction vector pYHM1 according to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 as host cell. This research purpose are expressing gene encoding SLPI using pYHM1 vector system in yeast *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 host cell, secreting SLPI recombinant protein into the growth medium, and knowing inhibitory activity of SLPI protein amniotic membrane toward porcine pancreatic elastase enzyme (PPE).

The research steps conducted include isolation DNA recombinant pET-ESLPI and pYHM1, amplification SLPI using PCR, restriction double digest using *EcoRI* and *XhoI*, ligation, transformasi into *E. coli* TOP10 cell, sequencing, transformation into *S. cerevisiae* BJ1824, and analysis inhibition activity of SLPI toward PPE enzyme.

The biggest inhibition activity of SLPI was demonstrate by SLPI from G extracellular and D extracellular of 66,67 %. It has an advantage in production process of biomass yeast cells because it doesn't need to add galactose as an inducer. The lowest inhibition activity of SLPI demonstrate by SLPI from G intracellular of 33,33 %. It is possible because the ability of intracellular SLPI to inhibited PPE enzyme was influenced by another intracellular protein.