

ABSTRAK

OPTIMASI AMPLIFIKASI DAN KLONING GEN *Chaperonin 60.1* PADA *Mycobacterium tuberculosis*

Nia Oktriviany, 2009 Pembimbing I : Ernawati Arifin Giri Rachman, Ph.D
Pembimbing serta I : Debbie Sofie Retnoningrum, Ph.D
Pembimbing II : Widura, dr., M.S.

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* merupakan salah satu bakteri paling patogen di dunia yang menyebabkan penyakit tuberkulosis. Sepertiga penduduk dunia telah diestimasi telah terinfeksi oleh basil tuberkulosis. Kegagalan vaksin BCG dalam mengontrol penyakit tuberkulosis di dunia, mencetuskan penemuan vaksin baru yang lebih efektif. Protein Chaperonin 60.1 *Mycobacterium tuberculosis* dipercaya dapat digunakan sebagai kandidat vaksin baru yang efektif.

Melalui penggunaan metode PCR, gen *Chaperonin 60.1* diamplifikasi. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus, dengan denaturasi 94°C selama 60 detik, *annealing* 52°C selama 30 detik, dan *extension* 72°C selama 120 detik. Produk PCR dianalisis dengan elektroforesis dan didapatkan pita yang mendekati ukuran 1620 pasangan basa (pb). Kemudian hasil PCR ini diligasikan ke dalam plasmid pGEM-T *Easy Cloning Vector*, hasil ligasi ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* DH5 α . Dari hasil kloning didapatkan 7 koloni putih dan 24 koloni biru. Untuk melihat koloni putih yang mengandung DNA sisipan maka digunakan metode lisis cepat. Dari hasil lisis cepat didapatkan 2 plasmid yang berasal dari koloni nomor 4 dan 6 yang diduga mengandung DNA target.

Kata kunci : *Mycobacterium tuberculosis*, gen Chaperonin 60.1, PCR, Kloning, Lisis Cepat

ABSTRACT

OPTIMATION OF AMPLIFICATION TECHNIQUE AND GENE CLONING OF *Chaperonin 60.1* ON *Mycobacterium tuberculosis*

Nia Oktriviany, 2009 1st Tutor : Ernawati Arifin Giri Rachman, Ph.D
 1st Joined Tutor : Debbie Sofie Retnoningrum, Ph.D
 2nd Tutor : Widura, dr., M.S.

Mycobacterium tuberculosis is one of the most pathogens in the world that cause tuberculosis disease. Estimates are that roughly one third of the world's population is infected with the bacillus. The failure of BCG vaccination to control the global tuberculosis epidemic underline the need for better vaccine. *Chaperonin 60.1*, a protein base from *Mycobacterium tuberculosis* was believed to be a new effective vaccine for tuberculosis disease.

The *Chaperonin 60.1* gene was amplified by PCR method. The PCR technique was performed in 30 cycles, denaturation at 94°C for 60 second; annealing at 52°C for 30 second; and extension at 72°C for 120 second. Analysis by gel agarose electrophoresis shown PCR fragment in the expected size 1620bp. Subsequently, resulted PCR product was ligated into pGEM-T Easy Cloning Vector and transformed into *Escherichia coli* DH5α. The result of cloning were 7 white colonies and 24 blue colonies. In order to examined the recombinant plasmid in white colonies contain target insert, quick lysis method was performed. It was found that two plasmids from the colony number 4 and 6 were predicted to be insert with DNA target.

Keyword: *Mycobacterium tuberculosis*, *Chaperonin 60.1* gene, PCR, Cloning, Quick lysis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	3
1.3 Maksud dan Tujuan	3
1.4 Kegunaan Karya Tulis Ilmiah	3
1.5 Metode Penelitian	3
1.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Mycobacterium tuberculosis.....	5
2.1.1 Sejarah.....	5
2.1.2 Karakteristik Mikrobiologi	5
2.1.3 Faktor dan Mekanisme Virulensi.....	8
2.1.4 chaperonin.....	9
2.2. Tuberkulosis	11
2.2.1 Definisi.....	11
2.2.2 Epidemiologi.....	12
2.2.3 Patogenensis.....	12
2.2.4 Respon Imun	14
2.2.5 Gejala Klinik.....	16
2.2.6 Komplikasi.....	17
2.3. Vaksin	18
2.3.1 Perkembangan Vaksin Tuberculosis.....	18
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	20
2.5 Elektroforesis.....	23
2.6 Kloning	24

BAB III ALAT, BAHAN DAN METODE

3.1 Bahan Penelitian	29
3.2 Metode Penelitian	29
3.3. Alat dan Bahan	29
3.3.1 Alat dan Bahan Percobaan PCR	29
3.3.2 Alat dan Bahan Percobaan Elektroforesis.....	30
3.3.3 Alat dan Bahan Percobaan Kloning	30

3.3.3.1 Alat dan Bahan Purifikasi	30
3.3.3.2 Alat dan Bahan Ligasi.....	30
3.3.3.3 Alat dan Bahan Transformasi	31
3.3.4 Alat dan Bahan Lisis Cepat.....	31
3.4. Cara Kerja	32
3.4.1 Tahap I : Pembuatan Cetakan DNA.....	32
3.4.2 Tahap II : PCR	32
3.4.2.1 PCR Menggunakan Primer Chap 60.1	32
3.4.3 Tahap III : Elektroforesis	33
3.4.4 Tahap IV : Purifikasi.....	33
3.4.5 Tahap V : Ligasi.....	34
3.4.6 Tahap VI : Transformasi.....	34
3.4.7 Tahap VII : Lisis Cepat.....	35

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Cetakan DNA.....	36
4.2 PCR dengan Primer Chap 60.1	36
4.3. Kloning	42
4.3.1 Purifikasi	42
4.3.2 Ligasi.....	44
4.3.3 Transformasi	44
4.4 Lisis Cepat	46

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran	48

DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	52
RIWAYAT HIDUP	55

DAFTAR GAMBAR

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mycobacterium tuberculosis.....	5
2.2 Mycobacterium tuberculosis dalam pewarnaan Ziehl Neelsen	6
2.3 Dinding sel Mycobacterium tuberculosis	7
2.4 Tahapan PCR.....	22
2.5 Elektroforesis.....	24
2.6 Cara Kloning.....	27

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil PCR suhu <i>annealing</i> 40°C dan jumlah cetakan DNA sebanyak 10µL dengan primer <i>Chap 60.1-FWD</i> dan <i>Chap 60.1-REV</i>	38
4.2 Hasil PCR suhu <i>annealing</i> 50°C dan jumlah cetakan DNA sebanyak 1µL dan 5µL dengan primer <i>Chap 60.1-FWD</i> dan <i>Chap 60.1-REV</i>	39
4.3 Hasil PCR suhu <i>annealing</i> 55°C dan jumlah cetakan DNA sebanyak 1µL dan 5µL dengan primer <i>Chap 60.1-FWD</i> dan <i>Chap 60.1-REV</i>	40
4.4 Hasil PCR suhu <i>annealing</i> 52°C dan jumlah cetakan DNA sebanyak 5µL dengan primer <i>Chap 60.1-FWD</i> dan <i>Chap 60.1-REV</i>	41
4.5 Hasil PCR suhu <i>annealing</i> 53°C dan 54°C dengan jumlah cetakan DNA sebanyak 5µL dengan primer <i>Chap 60.1-FWD</i> dan <i>Chap 60.1-REV</i>	42
4.6 Hasil Purifikasi DNA.....	43
4.7 Hasil Kloning dan Kontrol	45
4.8 Hasil Lisis Cepat.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

Tabel Variasi Kondisi dan Komposisi PCR	52
---	----

LAMPIRAN 2

Foto Kontrol Proses Kloning.....	53
----------------------------------	----

LAMPIRAN 3

Perhitungan Perbandingan DNA Insert Gen <i>Chaperonin 60.1</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Dengan pGEM-T <i>Easy Vector</i>	54
--	----