

**KLONING GEN NS1 VIRUS DENGUE PADA VEKTOR EKSPRESI
pGEX-6P1 DALAM *Escherichia coli* BL21 STAR™(DE3)**



RENALDI KOESTOER

0304040656



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN BIOLOGI

DEPOK

2008

**KLONING GEN *NS1* VIRUS DENGUE PADA VEKTOR EKSPRESI
pGEX-6P1 DALAM *Escherichia coli* BL21 STAR™(DE3)**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

Oleh:

RENALDI KOESTOER

0304040656



DEPOK

2008

SKRIPSI : KLONING GEN NS1 VIRUS DENGUE PADA VEKTOR
EKSPRESI pGEX-6P1 DALAM *Escherichia coli* BL21
STAR™(DE3)

NAMA : RENALDI KOESTOER

NPM : 0304040656

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 11 DESEMBER 2008

VANNY NARITA, Ph.D.
PEMBIMBING I

Dr. ABINAWANTO
PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana: 19 Desember 2008

Penguji I : Dr. Andi Salamah

Penguji II : Dra. Sitaresmi, M.Sc.

Penguji III : Retno Lestari, M.Si.

“Impossible is nothing”

I dedicate this to
(Almh.) Oma, Mama, Papa,
Vana, Vanny, Reno & Shanty.

You are My SHINING LIGHT..

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbilalamin. Sujud syukur serta doa dipanjatkan kepada Allah SWT atas limpahan nikmat, rizki, karunia, dan mukjizatNya yang memberi kekuatan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini tepat pada waktunya. Skripsi ini dapat berguna sebagai bahan koreksi diri di masa yang akan datang, kembali mengingatkan bahwa keberhasilan hanya dapat diperoleh dengan doa, kerja keras, dan perencanaan yang matang.

Rasa terima kasih yang sebesar-besarnya ingin penulis sampaikan pada Pembimbing I Vanny Narita, Ph.D., dan Pembimbing II Dr. Abinawanto, yang telah memberikan pengetahuan, bimbingan, perhatian serta motivasi. Penulis juga berterima kasih kepada para penguji, Dr. Andi Salamah, Dra. Sitaresmi, M.Sc., dan Retno Lestari, M.Si., atas kritik dan saran yang amat membangun. Terima kasih untuk Dr. rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc., Drs. Wisnu Wardhana, M.Si., Dr. Luthfirda, Dr. Upi Chairun Nisa, serta seluruh staf pengajar dan karyawan Departemen Biologi atas curahan ilmu, bimbingan, serta bantuan yang sangat berharga bagi kehidupan penulis.

Segala pengetahuan, pelajaran, dan keceriaan yang diberikan oleh pasukan Laboratorium Biologi Molekular Kesehatan, BPPT, Sabar Pambudi S.Si., Doddy Irawan S.Si., Wahyu Hidayati S.Si., dan Lindi, takkan dapat dibalas oleh penulis. Terima kasih juga kepada Drs. Agung Eru Wibowo, Apt., M.Si, Dr. Etik Mardiyati, Micho, Mas Nurhadi, Mas Nuralih, Bang Julham, Mba Mumu yang memfasilitasi dan sangat membantu penelitian di Serpong.

Sahabat-sahabat Pleigrub Kepompong-ku (Bancedz, Radutz, Ades, Cc, Tina, Acidz, Tika, Mariboy, dan Dindut), terima kasih atas berbagai kericuhan yang sangat menggembirakan. Persahabatan kita takkan lekang oleh waktu meski semua telah bermetamorfosis menjadi kupu-kupu indah. Teman-teman Baliveau '04 (Tari, Ronggo, Toni, Aya, Xty, Elly, Femy, Ina, AE, Valen) yang selalu solid sampai kapanpun, terima kasih atas 9 semester pencarian teka-teki kehidupan yang begitu mempesona. Terima kasih untuk senior dan junior yang memberikan warna pada kehidupan biologis penulis (Kak Alex, Kak Ganda, Adiep, Nunu, Kak Rita, Time, Agung, Frans, Andreas, Bos Aya, Pandu, Pingkan, Calvinov, Fajar). Terima kasih pula atas ikatan persahabatan yang tulus dari Reza, Regi, Juju, Adli, Valdo, Karin, dan Syeni.

Apresiasi penulis yang utama adalah kepada keluarga tercintaku, (Almh.) Oma, Mama, Papa, Vana, Vanny, dan Reno, terima kasih atas dukungan kalian yang tak kenal waktu dan tempat. Terima kasih atas dukungan dari The Koestoers dan d'Moenadjat Wiratmadjas. Terima kasih pula kepada Indah Susanti Setyarini, yang selalu mendorong semangat serta memfasilitasi momen-momen senang dan sedih penulis dengan penuh kasih sayang. Akhir kata, skripsi ini adalah hasil karya yang masih jauh dari sempurna. Semoga dapat diimplementasikan menjadi sesuatu yang bermanfaat bagi kemajuan teknologi dan kesejahteraan umat manusia.

Penulis

2008

ABSTRAK

Penelitian yang bertujuan menghasilkan klon gen *NS1* virus dengue pada vektor ekspresi pGEX-6P1 dalam *Escherichia coli* BL21 Star™(DE3) telah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular, LAPTIB, BPPT, Serpong selama Januari--November 2008. Gen *NS1* dengue diamplifikasi dengan primer spesifik d3-2336sbam (*forward*) dan d3-NS1-1056c (*reverse*). Produk PCR gen *NS1* (1.160 pb) yang telah dipurifikasi, didigesti dengan enzim *Bam*HI-*Xho*I (*double digestion*) kemudian diligasikan pada vektor ekspresi pGEX-6P1. Reaksi ligasi ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21 Star™(DE3). Sebanyak 19 koloni diisolasi secara acak dari 162 koloni yang tumbuh pada medium seleksi ampisilin. Hasil verifikasi dengan digesti dan PCR menunjukkan koloni 1b3 sebagai koloni positif rekombinan. Hasil *sequencing* terhadap 356 basa pertama gen *NS1* menggunakan primer spesifik d3-2716c, menunjukkan bahwa plasmid rekombinan 1b3 mengandung gen *NS1*. Analisis BLASTN terhadap *database* DNA pada GenBank menunjukkan homologi 96% dengan sekuen DEN-3 *strain* KJ71 (*accession number* AY858044.2). Kloning gen *NS1* dengue pada vektor pGEX-6P1 dalam *E. coli* BL21 Star™(DE3) berhasil dilakukan.

Kata kunci: dengue, *E. coli* BL21 Star™(DE3), gen *NS1*, kloning, pGEX-6P1

x + 101 hlm; gbr.; lamp.; tab.

Bibliografi: 85 (1990--2008)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Dengue.....	5
1. Penyakit infeksi virus dengue.....	5
2. Virus dengue.....	7
B. Kloning gen.....	10
1. Definisi dan manfaat kloning gen.....	10
2. Komponen-komponen kloning.....	11
a. Sumber DNA.....	11
b. Vektor.....	11
c. Enzim endonuklease restriksi.....	13
d. Enzim ligase.....	14
e. Sel inang.....	14

3.	Tahap-tahap kloning.....	16
a.	Amplifikasi fragmen gen spesifik.....	16
b.	Penyisipan fragmen DNA ke dalam vektor.....	17
c.	Introduksi vektor rekombinan ke dalam sel inang...	17
d.	Seleksi hasil kloning.....	19
C.	Elektroforesis.....	20
D.	<i>Sequencing</i>	21
BAB III.	BAHAN DAN CARA KERJA.....	23
A.	Lokasi dan waktu penelitian.....	23
B.	Bahan.....	23
1.	Sampel.....	23
2.	Bakteri.....	23
3.	Vektor.....	24
4.	Medium.....	24
5.	Larutan dan <i>buffer</i>	24
6.	Bahan kimia.....	24
C.	Peralatan.....	25
D.	Cara kerja.....	26
1.	Pembuatan medium.....	26
2.	Pembuatan larutan dan <i>buffer</i>	27
3.	Amplifikasi gen <i>NS1</i> dengue dengan PCR.....	27
4.	Elektroforesis dengan gel agarosa.....	28

5. Purifikasi DNA dengan kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.....	29
6. Isolasi plasmid pGEX-6P1 manual dengan metode lisis alkali.....	30
7. Digesti plasmid pGEX-6P1 dan gen <i>NS1</i> dengue....	31
8. Pengukuran konsentrasi DNA.....	32
9. Ligasi plasmid pGEX-6P1 dengan gen <i>NS1</i> dengue.....	32
10. Pembuatan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> BL21 Star™(DE3).....	33
11. Transformasi dan seleksi kandidat koloni rekombinan.....	34
12. Verifikasi plasmid rekombinan dengan <i>single digestion</i> enzim <i>Bam</i> HI dan PCR.....	35
13. <i>Sequencing</i> dan analisis sekuen.....	36
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
A. Amplifikasi dan purifikasi gen <i>NS1</i> dengue.....	38
B. Isolasi DNA vektor ekspresi plasmid pGEX-6P1.....	45
C. Digesti plasmid pGEX-6P1 dan gen <i>NS1</i> dengue.....	46
D. Ligasi plasmid pGEX-6P1 dengan gen <i>NS1</i> dengue.....	50
E. Pembuatan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> BL21 Star™(DE3) dan transformasi.....	52
F. Seleksi dan verifikasi plasmid rekombinan pGEX-nk <i>NS1</i> ..	56
a. Seleksi dan isolasi kandidat plasmid rekombinan.....	56
b. Verifikasi plasmid rekombinan.....	57
G. <i>Sequencing</i> dan analisis sekuen.....	59

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	62
A. Kesimpulan.....	62
B. Saran.....	62
DAFTAR ACUAN.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Peta area distribusi infeksi dengue di seluruh dunia.....	76
2. Grafik perkembangan jumlah kasus infeksi dengue di Indonesia periode 2002--2007.....	76
3. Representasi skematis virion dengue.....	77
4. Representasi skematis struktur genom RNA <i>Flavivirus</i>	77
5. Vektor ekspresi plasmid pGEX-6P1.....	78
6. Kondisi dan siklus PCR dalam penelitian.....	78
7. Posisi primer yang digunakan dalam penelitian.....	79
8. Skema alur kerja penelitian.....	80
9. Elektroforesis gel agarosa hasil PCR gen <i>NS1</i> dengue.....	81
10. Elektroforesis gel agarosa hasil purifikasi produk PCR gen <i>NS1</i> dengue.....	81
11. Elektroforesis gel agarosa hasil isolasi plasmid pGEX-6P1.....	82
12. Elektroforesis gel agarosa hasil purifikasi vektor serta sisipan yang didigesti dengan <i>Bam</i> HI dan <i>Xho</i> I.....	82
13. Koloni <i>E. coli</i> BL21 Star™(DE3) hasil ligasi.....	83
14. Elektroforesis gel agarosa hasil isolasi kandidat plasmid rekombinan.....	84
15. Elektroforesis gel agarosa hasil verifikasi digesti DNA plasmid 1b3 dengan <i>Bam</i> HI.....	84
16. Elektroforesis gel agarosa verifikasi PCR DNA plasmid 1b3.....	85
17. Elektroferogram hasil <i>sequencing</i> plasmid 1b3.....	86

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Jumlah laporan kasus, kematian, dan <i>case fatality rate</i> infeksi dengue di zona Asia selama 2006--2007.....	88
2. Beberapa penelitian kloning gen <i>NS1</i> dengue.....	89
3. Kit diagnostik komersial yang dikembangkan berdasarkan antigen <i>NS1</i>	90

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara pembuatan dan komposisi larutan/ <i>buffer</i> yang digunakan dalam penelitian.....	92
2. Hasil analisis kemiripan primer d3-2336sbam dan d3-NS1-1056c dengan cetakan gen <i>NS1</i> dengue menggunakan perangkat lunak FastPCR [®]	94
3. Hasil analisis restriksi pada gen <i>NS1</i> dengue, pasangan primer dan plasmid pGEX-6P1 dengan perangkat lunak Genetyx7.....	95
4. Analisis konsentrasi DNA sisipan gen <i>NS1</i> dengue dan vektor plasmid pGEX-6P1 yang telah didigesti dengan <i>Bam</i> HI dan <i>Eco</i> RI serta dipurifikasi dengan perangkat lunak BIO1D.....	97
5. Volume vektor plasmid pGEX-6P1 dan sisipan gen <i>NS1</i> dengue pada reaksi ligasi dengan rasio molar vektor:sisipan (1:10).....	98
6. Jumlah inokulasi <i>starting culture</i> ke dalam <i>working culture</i> pada pembuatan sel kompeten.....	98
7. Nilai efisiensi transformasi sel kompeten.....	99
8. Hasil analisis BLASTN.....	100
9. <i>Alignment</i> sekuen gen <i>NS1</i> hasil kloning dengan sekuen DEN-3 <i>strain</i> KJ71.....	101