



**ANALISIS PCR HASIL KLONING GEN MUTAN C169S
ENZIM ALKIL HIDROPEROKSIDA REDUKTASE
DARI *Helicobacter pylori***

SKRIPSI

Oleh

**Fauqa Arinil Aulia
NIM 062010101047**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2009**



**ANALISIS PCR HASIL KLONING GEN MUTAN C169S
ENZIM ALKIL HIDROPEROKSIDA REDUKTASE
DARI *Helicobacter pylori***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Fauqa Arinil Aulia
NIM 062010101047**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2009**

PERSEMBAHAN

Kupersembahkan tulisan ini kepada:

1. Allah Subhanahu wa Ta'ala dan Rasulullah Muhammad Salallahu 'alaihi Wasallam;
2. Indonesia Tanah Airku Tercinta;
3. Ibunda Dra. Hj. Masriatin, M.Pd. dan Ayahanda Dr. Ir. H. Zainal Abidin, MS.;
4. Kakanda Muhammad Rodlin Billah, ST. dan Adinda Muhammad Afnan Habibi;
5. Almamaterku Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
6. Guru, Dosen, Pembimbing, Pengajar, Pengasuh, dan Pemberi Ilmu;
7. Keluarga Besar;
8. Teman-teman dan Sahabat (Coeloex, Hygiea, Bebek Rangers dan dr. Syahrudi).

MOTO

“Kami akan memperlihatkan kepada mereka tanda-tanda (kekuasaan) Kami di segenap ufuk dan pada diri mereka sendiri, sehingga jelaslah bagi mereka bahwa Al-Quran itu adalah benar. Dan apakah Tuhanmu tidak cukup (bagi kamu) bahwa sesungguhnya Dia menyaksikan segala sesuatu?”
(Al-Quran Surat Fushshilat ayat 53)^{*)}

“Sebaik-baik manusia di antara kamu adalah yang paling banyak manfaatnya bagi orang lain.”
(Hadits Riwayat Muslim)^{**)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

^{**)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2000. *'Arba'in Nawawi*. Jakarta: Grafindo Pustaka.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama: Fauqa Arinil Aulia

NIM : 062010101047

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis PCR Hasil Kloning Gen Mutan C169S Enzim Alkil Hidroperoksida Reduktase dari *Helicobacter pylori*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 23 Oktober 2009

Yang menyatakan,

Fauqa Arinil Aulia

NIM 062010101047

SKRIPSI

**ANALISIS PCR HASIL KLONING GEN MUTAN C169S
ENZIM ALKIL HIDROPEROKSIDA REDUKTASE
DARI *Helicobacter pylori***

Oleh

Fauqa Arinil Aulia
NIM 062010101047

Pembimbing

Dosen Pembimbing I : Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.

Dosen Pembimbing II : dr. Elly Nurus Sakinah

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis PCR Hasil Kloning Gen Mutan C169S Enzim Alkil Hidroperoksida Reduktase dari *Helicobacter pylori*” telah diuji dan disahkan pada:
hari, tanggal : Kamis, 29 Oktober 2009
tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.
NIP. 196504261994031001

Anggota I,

Anggota II,

dr. Elly Nurus Sakinah
NIP. 198409162008012003

dr. Cholis Abrori, M. Kes, M. Pd. Ked.
NIP. 197105211998031003

Mengesahkan
Dekan,

Prof. dr. Bambang Suhariyanto, Sp. KK (K)
NIP. 194701211983031001

RINGKASAN

Analisis PCR Hasil Kloning Gen Mutan C169S Enzim Alkil Hidroperoksida Reduktase dari *Helicobacter pylori*; Fauqa Arinil Aulia; 062010101047; 2006; 30 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Sejak penemuan kuman *Helicobacter pylori* oleh Marshall dan Warren (1983), terbukti bahwa infeksi *H. pylori* merupakan masalah global, termasuk di Indonesia, sampai saat ini belum jelas proses penularan serta patomekanisme infeksi kuman ini pada berbagai keadaan patologis saluran cerna bagian atas (SCBA). Pada tukak peptik infeksi *H. pylori* merupakan faktor etiologi yang utama sedangkan untuk kanker lambung termasuk karsinogen tipe I yang definitif. Prevalensi infeksi *H. pylori* di negara berkembang lebih tinggi dibandingkan dengan negara maju. Infeksi *H. pylori* melibatkan adesi sampai kolonisasi lapisan mukosa saluran cerna dan pengaktifan sistem imun dan respon inflamasi gaster, termasuk pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) dari makrofag dan lekosit PMN (Olczak *et al.*, 2002; Serbaum dan Michetti, 2002; Petersen dan Krogfelt, 2003). Untuk dapat bertahan dengan stres oksidatif ini *H. pylori* ini mengandalkan berbagai sistem proteksi enzimatik, termasuk *thioredoxin-dependent alkyl hydroperoxide reductase* (*AhpC*), katalase dan superoksida dismutase (Olczak *et al.*, 2002; Comtois *et al.*, 2003). Pada penelitian ini akan dilakukan tahap awal dari rangkaian ekspresi, pemurnian dan pengkristalan protein *HpAhpC wild type* dan mutannya, yaitu kloning gen mutan C169S enzim *HpAhpC* dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis hasil kloning gen mutan C169S enzim alkil hidroperoksida reduktase dari *H. pylori* dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi baru mengenai gen mutan C169S enzim alkil hidroperoksida reduktase dari *H. pylori* (*HpAhpC*) dan mendorong diadakannya penelitian lebih lanjut.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember. Waktu pelaksanaannya adalah pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2009. Tahap awal penelitian ini bertujuan untuk membuat benih hasil mutasi. Setelah pembenihan, DNA *Escherichia coli* XL 1 Blue mutatif akan diisolasi. Selanjutnya DNA tersebut diukur konsentrasinya untuk kemudian diamplifikasi menggunakan metode PCR (*polymerase chain reaction*). Data yang diperoleh dari penelitian ini dicatat dalam buku catatan harian (*lock book*) dan direkam dalam komputer. Data disajikan dalam bentuk plasmid DNA yang telah berhasil diisolasi, pengukuran konsentrasi DNA yang telah berhasil diisolasi, serta foto hasil elektroforesis.

Hasil analisis PCR menunjukkan 2 konsentrasi DNA yang dicobakan yaitu 2 ng/ μ l dan 100 ng/ μ l tidak ditemukan adanya pita plasmid DNA target. Hal ini dapat disebabkan oleh primer yang dicobakan tidak homolog dengan templatnya atau perlu adanya optimasi PCR sehingga DNA primer bisa homolog dengan templatnya melalui perubahan suhu annealingnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi untuk menentukan suhu annealing yang tepat pada proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sehingga bisa diperoleh pita tunggal DNA sebagai target.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis PCR Hasil Kloning Gen Mutan C169S Enzim Alkil Hidroperoksida Reduktase dari *Helicobacter pylori*”. Karya tulis ini disusun untuk memenuhi persyaratan meraih gelar Sarjana Kedokteran pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. dr. H. Bambang Suhariyanto, Sp.KK (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS. selaku Dosen Pembimbing I, dr. Elly Nurus Sakinah selaku Dosen Pembimbing II, dr. Supangat, M. Kes. PhD., dr. Al-Munawir, M.Kes. PhD., dan Dr. Ir. Tri Handoyo selaku Dosen Pembimbing Lapangan, serta dr. Cholis Abrori, M. Kes. M. Pd. Ked. selaku Dosen Penguji sekaligus yang telah meluangkan waktu guna memberikan ilmu, bimbingan dan motivasi demi terselesaikannya karya tulis ilmiah ini;
3. Ibunda Dra. Hj. Masriatin, M.Pd., Ayahanda Dr. Ir. H. Zainal Abidin, MS., Kakanda Muhammad Rodlin Billah, ST., Adinda Muhammad Afnan Habibi dan seluruh keluarga: kasih sayang kalian tiada bertepi;
4. Senior FK UNEJ, teman, sahabat, serta semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini yang tak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan karya tulis ilmiah ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat.

Jember, Oktober 2009

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUTAN	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Helicobacter pylori</i>	4
2.1.1 Taksonomi	4
2.2.2 Morfologi	4
2.2.3 Reaksi Biokimia dan Karakteristik Kultur	5
2.2.4 Patofisiologi	5

a. Transmisi	5
b. Struktur Antigen dan Toxin	6
c. Patogenesis	7
d. Enzim Alkil Hidroperoksida Reduktase dari <i>H. pylori</i> (<i>HpAhpC</i>)	7
2.2 Kloning Enzim Mutan C169S Alkil Hidroperoksida	
Reduktase dari <i>H. pylori</i> (<i>HpAhpC</i>)	12
2.2.1 Mutasi	12
2.2.2 Kloning	13
2.2.3 Elektroforesis dengan Gel Agarose	14
2.3 Kerangka Konseptual	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Teknik Pengumpulan Data	18
3.4 Rancangan Penelitian	18
3.5 Alat dan Bahan	18
3.5.1 Alat	18
3.5.2 Bahan	19
3.6 Metode Penelitian	19
3.6.1 Pembenihan (<i>Seeding</i>)	19
3.6.2 Isolasi DNA (<i>Minipreparation</i>)	19
3.6.3 Pengukuran Konsentrasi DNA	20
3.6.4 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)-Elektroforesis	21
3.7 Alur Penelitian	22
3.8 Penyajian Data	22
3.9 Masalah Etik	22

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN23

4.1 Pembenihan dan Isolasi DNA Mutan C169S Alkil

Hidroperoksida Reduktase dari *H. pylori* 23

4.2 Pengukuran Konsentrasi Plasmid DNA 24

4.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)26

4.4 Elektroforesis dan Interpretasinya 27

BAB 5. SIMPULAN DAN SARAN30

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR TABEL

4.1 Delta Absorbansi DNA Sampel	24
4.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi DNA	25

DAFTAR GAMBAR

2.1	Morfologi <i>H. pylori</i>	4
2.2	Koloni <i>H. pylori</i> dalam agar darah manusia	5
2.3	Transmisi <i>H. pylori</i>	6
2.4	(A) Gambaran penyusunan pita pentamerik <i>AhpC</i> dari <i>H. pylori</i> . Monomer A dan B berturut-turut tampak sebagai warna gelap dan abu-abu terang. (B) Gambaran pita dimer <i>AhpC</i> dari <i>H. pylori</i> . Atom Cys49 dan 169 tampak sebagai bulatan kecil, heliks- α dilabeli dari 1 sampai 5	9
2.5	(A) Tampilan stereo dari rangkaian rantai Ca dimer <i>AhpC</i> dari <i>H. pylori</i> (garis bersambung) superimposisi dengan dimer koresponden dari enzim manusia (garis putus-putus). (B) Superposisi dari heliks- $\alpha 5$ dan C-terminal dari protein, yang mengandung Cys169, dan heliks- $\alpha 2$, yang mengandung Cys49. <i>AhpC</i> dari <i>H. pylori</i> (garis bersambung), <i>AhpC</i> dari <i>S. typhimurium</i> (garis putus-putus)	11
2.6	Densitas elektron dari region di sekitar <i>peroxidatic</i> dan <i>resolving</i> <i>cysteine</i> (Cys49 dan Cys169) dalam dimer AB. Densitas elektron untuk jembatan disulfida antara Cys49A – Cys169B tampak secara jelas, sepanjang residu lain hingga 175B	12
2.7	Skema proses kloning menggunakan PCR	14
2.8	Unit Struktur Agarose	15
2.9	Foto dari gel agarose, menunjukkan pita pembatas dan bentuk ideal dari posisi sisir	16
2.10	Kerangka Konseptual	17
3.1	Alur Penelitian	22
4.1	Plasmid DNA dalam Gel Elektroforesis Setelah Proses Isolasi	25

4.2 Plasmid DNA setelah proses PCR dalam gel agarose 1%. (1) 2 ng/ μ l sampel DNA; (2) DNA marker; (3) 100 ng/ μ l sampel DNA..... 28