

INSERSI GEN *pncA* KE DALAM PLASMID *pGEM-T*

Eli Hendrik Sanjaya

Jurusan Kimia, FMIPA
Universitas Negeri Malang
email: eli.hendrik.fmipa@um.ac.id

Received 3 Juli 2016

Accepted 30 November 2016

Abstrak

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) merupakan sesuatu yang paling berbahaya di antara kasus pandemik resistensi terhadap antibiotik. Sebagai obat lini pertama, pirazinamida sering dipakai untuk mengobati pasien TB sehingga semakin banyak pula kasus TB resisten terhadap pirazinamida. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa isolat L20 MDR-TB mengalami mutasi T539C. Mutasi tersebut dimungkinkan sebagai penyebab resistensi pada level genetik. Untuk memastikan mekanisme resistensi tersebut, harus didapatkan PZAse murni kemudian dikristalisasi dan ditentukan struktur Kristal 3D-nya menggunakan defraksi sinar X. Langkah pertama untuk mendapatkan PZAse murni adalah melakukan kloning gen *pncA* ke plasmid *pGEM-T*. Prosedur untuk melakukan kloning tersebut adalah amplifikasi, insersi gen *pncA* ke plasmid *pGEM-T*, dan transformasi melalui seleksi koloni biru putih. Langkah terakhir adalah isolasi plasmid rekombinan (*pGEM-T-pncA*) diikuti dengan elektroforesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *pncA* isolat L20 telah berhasil diinsersi ke plasmid *pGEM-T*. Hal ini ditunjukkan pada hasil seleksi koloni biru putih dan hasil elektroforesis plasmid rekombinan. Elektroforegram menunjukkan bahwa panjang plasmid rekombinan *pGEM-T-pncA* dari koloni putih lebih panjang sekitar 0,7 kb dibandingkan plasmid kontrol *pGEM-T*. Perbedaan ini sama dengan panjang gen *pncA* yang diinsersikan (0,72 kb).

Kata kunci: kloning, *pGEM-T*, gen *pncA*, pirazinamida (PZA)

Abstract

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is among the most worrisome elements of the pandemic of antibiotic resistance. As the first line drug, pyrazinamide is often used to treat TB disease so there are many case of TB resistant to pyrazinamide. The previous research show that *pncA* gene of isolate L20 MDR-TB have mutated T539C. That mutation propose as the cause of resistance M. tuberculosis to pyrazinamide at the genetic level. For make sure the resistance mechanism, we have to get the pure PZAse and then crystallize it, and the 3D structure can be determined by X-ray defraction. The first step to get pure PZAse is cloning the *pncA* gene to the plasmid. The aim of this research is to know that is the *pncA* gene can be cloned to *pGEM-T* plasmid. The prosedure for cloning the *pncA* gene to the *pGEM-T* plasmid is amplification, follow-ed by insert the *pncA* gene to the *pGEM-T* plasmid, and transformation by a selection of blue and white colony. The last step are isolation of recombinantplasmid (*pGEM-T-pncA*) followed by electrophoresis. The result of the research showed that *pncA* gene from isolate L20 was successfully cloned to *pGEM-T* plasmid. It was showed on blue and white colony and the result of isolation and electrophoresis *pGEM-T-pncA*. The electrophoregram showed that the length of *pGEM-T-pncA* from white colony is

different with pGEM-T standart about 0,7 kb. It is similar with the length of *pncA* gene (0,72 kb).

Keywords: *cloning, pGEM-T, pncA gene, pyrazinamide (PZA)*

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang menjadi tantangan global. Saat ini Indonesia telah turun dari urutan ketiga menjadi urutan kelima negara dengan beban TB tertinggi di dunia. Meskipun program pengendalian TB nasional telah berhasil mencapai target MDG, akan tetapi penatalaksanaan TB terutama di sebagian besar rumah sakit, klinik dan praktek swasta belum sesuai dengan strategi DOTS atau-pun standar pelayanan sesuai *International Standards for Tuberculosis Care* (ISTC). Demikian pula ketersediaan fasilitas laboratorium, penerapan standar pencegahan infeksi nosokomial serta kolaborasi TB-HIV yang belum optimal berkontribusi terhadap munculnya tantangan TB resisten obat terutama *multidrug-resistant tuberculosis* (MDR-TB) di Indonesia (Utarini, A. dkk., 2011).

MDR-TB merupakan hal yang paling berbahaya pada pasien penderita TB yang resisten antibiotik. Resistensi TB terhadap antibiotik biasanya disebabkan oleh kegagalan menyelesaikan kemoterapi dengan penanganan dan kombinasi obat yang tepat (Dye, C. & Williams, B.B., 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sejak tahun 1990-an, MDR-TB di Haiti terus meningkat. Tidak kurang dari 1,0% penderita TB baru merupakan TB resisten terhadap isoniazid and rifampisin. Hal serupa terjadi di Republik Dominika, 10,2% dari total kasus TB adalah MDR-TB dan 6,6% MDR-TB dari kasus TB baru (Ocheretina *et al.*, 2012).

Beberapa negara maju telah berhasil mengeliminasi TB tetapi resiko TB tetap ada disebabkan oleh adanya imigran yang berpotensi membawa kuman TB. Setelah kemoterapi selesai dan pasien sembuh maka pasien masih memiliki TB laten. Sekitar 10% pasien TB laten akan menjadi TB aktif

kembali (Kenyorini dkk., 2006). TB laten akan menjadi aktif kembali ketika daya tahan tubuh pasien tersebut lemah.

Pada tahun 2012, Direktur ECDC menyatakan bahwa tingkat resiko orang-orang eropa terjangkit TB meningkat. Memerangi TB semakin sulit karena selain sulit didiagnosa, TB juga sulit ditangani. Gejala klasik dari TB yang pertama adalah mudah kecapekan, demam, dan batuk. Padahal gejala-gejala tersebut juga merupakan gejala yang sama untuk beberapa penyakit yang lainnya. Untuk memastikan bahwa pasien terkena TB adalah melakukan tes dengan cara mengirim sampel spuntum ke laboratorium dengan peralatan dan keahlian yang tepat. Apabila peralatan dan keahlian laboratorium kurang memadai maka hasil diagnosa bisa salah ataupun terlambat sehingga TB bisa menyebar. Hasil analisis genotipe menunjukkan bahwa beberapa kasus resistensi TB terhadap antibiotik disebabkan oleh adanya mutasi gen sehingga protein target menjadi tidak aktif kembali terhadap antibiotik (Gillespie, 2002). Akan tetapi, meskipun mutasi pada gen yang menjadi target obat dipercaya menjadi mekanisme primer terjadinya resistensi, mekanisme tersebut tidak bisa menjadi mekanisme tunggal (Motiwala *et al.*, 2010).

The Broad Institute KZN XDR sequencing project menemukan bahwa terjadi mutasi pada MDR-XDR tetapi tidak bisa digeneralisasi bahwa mutasi pada MDR terjadi secara spesifik (Gupta *et al.*, 2010). Menurut Motiwala, *et al.*, 2010, ada mekanisme alternatif, yaitu *efflux pumps*. *Efflux pumps* merupakan kemampuan protein membran plasma untuk mengeluarkan berbagai macam antimikroba dari dalam sel sehingga antimikroba bisa bekerja untuk mematikan mikroba. Salah satu gene yang mengkode protein yang

berfungsi sebagai *efflux pumps* adalah *efpA* (Rv2846c). Gen *efpA* (Rv2846c) mengkode protein *efflux pumps* terhadap INH.

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kasus TB yang sangat tinggi. Seperti di negara yang lainnya di dunia, salah satu obat yang dipakai di Indonesia adalah pirazinamida. Dengan demikian kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap pirazinamida juga banyak terjadi. Hasil penelitian yang menunjukkan bahwa resistensi *M. tuberculosis* terhadap pirazinamida dapat disebabkan oleh adanya mutasi pada gen *pncA*. Hasil riset menunjukkan adanya mutasi pada gen *pncA* T539C isolat L20 MDR-*M. tuberculosis* yang diduga menjadi penyebab resistensi *M. tuberculosis* terhadap pirazinamid pada tingkat genotipe (Sanjaya, 2012).

Mutasi substitusi T539C mengakibatkan terjadinya perubahan residu asam amino penyusun pirazinamidase pada posisi ke-180, yaitu dari valin menjadi alanin. Asam amino valin dan serin sama-sama memiliki rantai samping nonpolar alifatik. Rantai samping valin berupa gugus isopropil sedangkan pada alanin metil. Perbedaan rantai samping ini dimungkinkan tidak mengubah struktur 3D protein pirazinamidase secara signifikan dan mengubah aktivitasnya karena selain letak perubahan asam amino jauh dari daerah pusat katalitik, sifat kedua asam amino tersebut sama-sama non polar. Akan tetapi, hal ini harus diuji secara eksperimen. Informasi mengenai residu katalitik *PZAse* dan mekanisme reaksi *PZAse* sangat diperlukan untuk kajian resistensi *M. tuberculosis* terhadap *PZA*. Selain itu, analisis efek perubahan asam-asam amino pada *PZAse* terhadap aktivitas enzimatisnya juga diperlukan untuk mengetahui penyebab resistensi *M. tuberculosis* terhadap *PZA*.

Resistensi memang menjadi masalah yang sangat sulit, akan tetapi setelah ditemukannya metode kloning dan penentuan struktur 3D protein, pembuatan obat menjadi lebih terarah, spesifik, dan efektif. Untuk mengetahui penyebab sifat

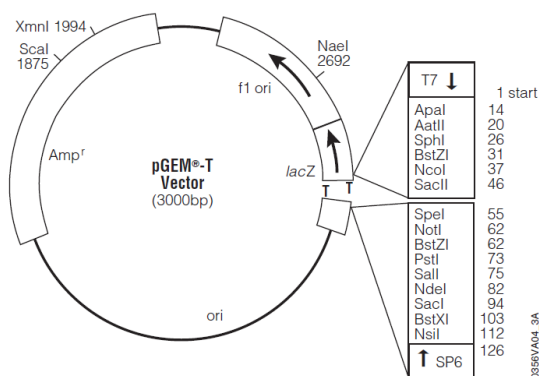
resistensi suatu obat dapat diketahui dengan cara menentukan struktur 3D protein target dari obat tersebut. Gen *pncA* merupakan target dari obat pirazinamida (Mathema, et al., 2006). Pada *M. tuberculosis* gen *pncA* diekspresikan menjadi enzim pirazinamidase. Pirazinamidase merupakan target dari pirazinamida. Dengan demikian untuk mendeteksi apakah *M. tuberculosis* resisten terhadap pirazinamida atau tidak dapat dilakukan dengan cara uji genotipe pada gen *pncA*. Kemudian dapat dianalisis dengan cara membandingkan dengan urutan nukleotida gen *pncA* pada *M. tuberculosis* strain H37Rv (*wild type*). Tahap berikutnya dianalisis pada tingkat urutan asam amino dan protein.

Pada tingkatan yang lebih tinggi adalah desain obat. Desain obat perlu dilakukan analisis protein target obat. Apabila *M. tuberculosis* resisten terhadap pirazinamida maka perlu dilakukan analisis struktur 3D enzim pirazinamidase. Dengan demikian berdasarkan analisis sisi aktifnya dapat dilakukan desain obat. Untuk analisis struktur 3D suatu protein diperlukan produksi protein yang dapat diawali dengan melakukan kloning gen *pncA* melalui teknik DNA rekombinan. Permasalahan dalam penelitian ini adalah apakah gen *pncA* Isolat L20 MDR-*M. tuberculosis* resisten pirazinamid dapat diinsersikan ke dalam plasmid pGEM-T melalui teknik DNA rekombinan.

Penelitian yang melibatkan rekombinasi DNA sudah dilakukan sejak tahun 1946 oleh Lederberg dan Tatum. Teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetika merupakan suatu metode yang dilakukan untuk memanipulasi DNA suatu makhluk hidup tertentu guna memperoleh sifat-sifat tertentu dalam organisme tersebut. Pada umumnya dalam teknologi DNA rekombinan, peneliti berusaha menambahkan sifat-sifat unggul ke dalam suatu organisme, sehingga diharapkan menjadi organisme yang menguntungkan kehidupan manusia (Susanti dan Ariani, 2004).

Ada empat komponen penting yang harus ada pada saat melakukan rekombinasi DNA, yaitu enzim restriksi, vektor, enzim ligase dan gen target yang akan diinsersikan ke vektor. Gen target dan vektor harus memiliki sisi pemotongan yang sama sehingga fragmen gen target bisa masuk ke dalam vektor. Selain itu, enzim yang dipilih harus memotong pada satu sisi pemotongan saja, kecuali bila ujung-ujung gen target dipotong oleh enzim yang sama sehingga fragmen gen yang bisa masuk ke vektor adalah fragmen yang diinginkan.

Apabila gen target berasal dari hasil amplifikasi menggunakan proses PCR maka sebelum diinsersi ke vektor ekspresi maka harus diinsersikan ke vektor kloning seperti pGEM-T atau pJET. Hasil PCR bisa diligasi ke vektor pGEM-T secara langsung karena hasil PCR urutan nukleotidanya memiliki ujung-ujung basa A, sedangkan pGEM-T ujung-ujungnya memiliki urutan nukleotida T. Hasil PCR akan bergabung dengan vektor pGEM-T membentuk vektor rekombinan. Peta vektor pGEM-T diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta vektor pGEM-T. Vektor pGEM-T memiliki panjang 3000 bp yang memiliki beberapa sisi pemotongan enzim (Promega, 2009).

Seleksi plasmid rekombinan hasil ligasi dilakukan melalui seleksi koloni biru putih, hasil ligasi ditransformasi terlebih dahulu ke sel inang (*host*) *E. coli top10'F* yang kemudian ditumbuhkan di media LB + Ampisilin yang telah di beri IPTG dan X-Gal. *E. coli top10'F* yang telah

tertransformasi dapat tumbuh membentuk koloni biru dan putih. Pada proses ligasi, fragmen hasil PCR yang ujung-ujungnya memiliki basa A akan masuk ke pGEM-T yang memiliki ujung basa T. Daerah pGEM-T yang dimasuki ini merupakan gen *lacZ* yang mengkode enzim β -galaktosidase yang dapat merubah warna medium X-Gal menjadi berwarna biru. Apabila gen *lacZ* ini terinsersi maka enzim β -galaktosidase tidak dapat dihasilkan. Dengan demikian *E. coli top10'F* yang membawa plasmid pGEM-T yang terinsersi dengan fragmen hasil PCR akan membentuk koloni putih, sedangkan *E. coli top10'F* yang membawa plasmid pGEM-T yang tidak terinsersi akan membentuk koloni biru.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan yang dipakai pada penelitian ini adalah cawan petri, gelas beaker, gelas ukur, erlenmeyer, labu takar, botol reagen, pipet mikrobesserta tip pipet mikro ukuran 2,5 μ L, 10 μ L, 100 μ L, dan 1000 μ L, tabung mikro ukuran 500 μ L dan 1500 μ L, vortex, spatula, kaki tiga, kasa dan bunsen. Peralatan lain yang digunakan adalah alat pengukur massa, yaitu neraca analitik digital Explorer (Ohaus, AS), Autoclave Electric Pressure Steam Sterilized, shaker incubator, deep freezer, alat PCR, elektroforesis gel agarosa, lampu UV dengan panjang gelombang 312 nm, dan kamera digital.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan pembuatan media tanam mikroba untuk keperluan kloning (tripton 1% (b/v), ekstrak ragi 0,5% (b/v), NaCl 1% (b/v), bakto agar 2% (b/v), dH₂O, antibiotik ampisilin 0,01% (b/v), X-Gal 5% (b/v), IPTG 1% (b/v), CaCl₂ 0,1 M, 2 μ L pellet paint, NaAc 3M, etanol 100% p.a., dan ddH₂O steril); bahan untuk proses elektroforesis (gel agarosa 1,5% (b/v), 10 mg mL⁻¹ EtBr, bufer TAE dan loading buffer, dan penanda (marker) pada gel elektroforesis digunakan plasmid pUC19/ *HinfI* 300 ng μ L⁻¹); dan bahan untuk keperluan insersi gen *pncA* ke plasmid

pGEM-T (*pGEM-T Vector Assay* (Merck), T4 DNA ligase, dan 2x rapid bufer ligasi).

Ada beberapa tahapan penelitian yang dilakukan pada proses kloning, diawali dengan amplifikasi dengan mesin PCR untuk keperluan insersi fragmen gen *pncA* ke vektor pGEM-T. Ujung 5' dan 3' hasil PCR mengandung basa A sedangkan vektor pGEM-T ujung 5' dan 3' adalah basa T maka hasil PCR bisa langsung diligasi ke pGEM-T. Berikut ini beberapa prosedur preparasi untuk keperluan proses kloning.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Media LB

Media LB cair dibuat dengan cara mencampurkan tripton 1% (b/v), ekstrak ragi 0,5% (b/v), NaCl 1% (b/v), bakto agar 2% (b/v) dan H₂O. Campuran disterilkan dengan *autoclave pada* temperature 110° C selama 15 menit. Setelah itu, media dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik. Media dibiarkan hingga menjadi padat, kemudian dapat langsung digunakan atau disimpan pada temperatur 4°C tetapi harus diinkubasi pada 37°C sebelum digunakan. Media LB cair dibuat dengan metoda yang sama dengan pembuatan media padat tetapi tanpa penambahan bakto agar.

Pembuatan Media LB Padat/Amp dan LB Padat/ Amp/X

Metode pembuatan media LB Padat/Amp dan LB Padat/Amp/X adalah dengan cara yang hampir sama dengan pembuatan media LB padat tetapi ada penambahan reagen lain seperti ampicilin dan X-Gal. Media LB padat/Amp ditambahkan antibiotik ampicilin 0,01% (b/v), dapat dilakukan dengan cara mencampurnya sesaat sebelum media dituang (hangat) atau disebar dengan merata ke atas permukaan media yang sudah padat. Sedangkan pada media LB padat/Amp/X-Gal/IPTG dibuat dengan cara yang sama dengan pembuatan media LB padat/Amp tetapi ditambahkan dengan X-Gal 5% (b/v) dan IPTG 1% (b/v) dengan cara disebar di atas permukaan media LB padat yang

sudah mengeras. Penambahan ini dilakukan 30 menit sebelum media ini digunakan.

Pembuatan Media LB Cair/Amp

Pembuatan media LB cair/Amp dilakukan dengan cara yang sama dengan metode pembuatan media LB cair tetapi ada penambahan ampicilin 0,01% setelah media LB cair disterilkan.

Peremajaan Bakteri *E. coli Top10 F'* pada Media Padat

Mengambil koloni tunggal *E. coli Top10 F'* pada media padat sebelumnya menggunakan jarum ose kemudian digoreskan pada media LB padat yang baru secara aseptik. Kemudian kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Peremajaan dari stok gliserol dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 30 µL sel kemudian di-*spread* pada media LB padat dengan menggunakan batang L. Setelah inkubasi selama 18 jam, kultur disimpan suhu 4 °C.

Pembuatan Kultur *E. coli Top10 F'*

Kultur *E. coli Top10 F'* dibuat dengan cara mengambil koloni tunggal *E. coli Top10 F'* dari media LB padat dan menumbuhkannya pada media LB cair 5 mL secara aseptik. Kemudian kultur diinkubasi pada suhu 37°C dan 150 rpm selama 18 jam (*overnight*). Kultur ini dapat langsung digunakan atau disimpan pada temperatur 4°C.

Penyiapan Sel Kompeten *E. coli Top10 F'* dengan CaCl₂

Sel *E. coli Top10 F'* kompeten dibuat dengan cara menumbuhkan kembali 0,25 mL inokulum *overnight culture* yang telah dibuat sebelumnya di dalam 25 mL LB cair, diinkubasi selama 2-3 jam pada 37° C dan 150 rpm hingga OD₆₀₀ mencapai 0,4-0,6. Kultur sel dipindah ke tabung sentrifuga 60 mL, diamkan dalam es selama 30 menit, sentrifuga pada 4°C, 4.000 rpm (2.700g) selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 5 mL CaCl₂ 0,1 M (dingin dan steril), diamkan di es selama 10 menit, kemudian disentrifuga lagi pada 4°C, 4000 rpm (2.700 g) selama 10 menit. Supernatan

dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 mL CaCl₂ 0,1 M (dingin dan steril), *aliquote* 100 µL dan simpan kultur pada 4°C selama 2-24 jam. Sel kompeten siap dipakai untuk transformasi.

Ligasi Sel

Hasil amplifikasi bisa langsung diligasi, tetapi sebaiknya dimurnikan terlebih dahulu. Fragmen hasil amplifikasi ditambahkan 2µL *pellet paint*, 1/10 volume NaAc 3M, 2 volume etanol 100% p.a. Dicampur hingga homogen, inkubasi pada temperatur ruang selama 2 menit. Kemudian sentrifuga dengan kecepatan 13000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, pellet dicuci dengan etanol 70% dan sentrifuga pada 13000 selama 15 menit. Supernatan dibuang dengan cara dekantasi dan pelet dikeringkan dengan cara membuka tutup tabung *microcentrifuge* dan dibiarkan hingga tidak berbau etanol (bisa di suhu ruang atau 37°C). Kemudian ditambahkan 5 µL H₂O pada pellet DNA dan diresuspensi hingga pelet DNA larut. Fragmen DNA siap diligasi. Akan tetapi pada penelitian ini hasil PCR langsung diligasi tanpa proses pemurnian. Komposisi komponen-komponen yang diperlukan untuk proses ligasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi komponen-komponen yang diperlukan untuk proses ligasi (Promega, 2008)

No.	Komponen	Sampel	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
1	2x rapid ligation buffer	5µL	5µL	5µL
2	pGEM-T	1µL	1µL	1µL
3	Produk PCR	XµL	-	-
4	Control DNA insert	-	2µL	-
5	T ₄ DNA ligase (3 Weiss Unit/µL)	1µL	1µL	1µL
6	Deionized water hingga volume total	10µL	10µL	10µL

Hasil yang didapatkan pada saat PCR dipekatkan menggunakan alat *freeze dry* agar konsentrasi yang diperoleh mencukupi untuk 1x reaksi ligasi. Sebanyak 10 µL

master mix untuk ligasi diperoleh dengan mencampurkan 5 µL *2x rapid ligation buffer*, 50 ng vektor pGEM-T, 1 µL T4 DNA Ligase (3 Weiss unit/µL) dan 3µL hasil PCR. Semua komponen dicampurkan dengan memipet pada suhu ruang dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 12 jam. Untuk menganalisa gen *pncA* sudah terinsersi ke dalam pGEM-T atau belum dilakukan proses gel elektroforesis. Jumlah hasil PCR yang diperlukan untuk proses ligasi dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

Jumlah hasil PCR (ng) =

$$\frac{\text{Massa vektor (ng)} \times \text{ukuran DNA sisipan (kb)} \times \text{Ukuran vektor (kb)}}{\text{DNA sisipan vektor molar ratio}}$$

Transformasi dengan Metode Heat Shock

Transformasi dilakukan dengan cara memasukkan 100 µL sel *E.coli* Top10 F' kompeten ke dalam tabung 1,5 mL dingin dan ditambahkan 2 µL hasil ligasi. Kemudian campuran diinkubasi di dalam es selama 30 menit. *Heat shock* dilakukan dengan inkubasi pada suhu 42 °C selama 60-90 detik dilanjutkan inkubasi di dalam es selama 2 menit. Sel diresuspensi dan ditambahkan 900 µL media LB cair, kemudian diinkubasi pada 37°C, 150 rpm selama 1-2 jam. Suspensi disentrifuga pada 4°C, 12.000 rpm selama 2 menit. Pelet sel diresuspensi dengan media LB cair yang tersisa, kemudian disebarakan pada media LB padat/Amp/X-Gal/ IPTG dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Koloni biru dan putih yang tumbuh diamati.

Skrining

Skrining dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan koloni putih yang mengandung sisipan dan *false positive*. Koloni putih ditumbuhkan untuk diisolasi plasmidnya menggunakan metode *miniprep*. Hasil isolasi plasmid dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Sedangkan untuk mengetahui ukuran plasmid rekombinan dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi yang bisa memotong satu sisi pemotongan pada plasmid tersebut. Pada penelitian ini memakai enzim restriksi

NdeI. Setelah diketahui ukuran plasmid rekombinan sesuai dengan yang diharapkan, maka dilakukan isolasi plasmid rekombinan memakai Kit isolasi plasmid produksi Geneaid.

Isolasi Plasmid Hasil Rekombinasi

Isolasi plasmid metode *miniprep* diawali dengan membuat 3-5 mL *overnight culture*, diambil 1 mL dan masukkan pada tabung mikro 1,5 mL, sentrifuga pada 12.000 rpm selama 30 detik. Pellet yang dihasilkan diresuspensi dengan 500 μ L buffer STE dan dihomogenkan dengan cara *vortex*, disentrifuga pada 10.000 rpm selama 30 detik, ditambahkan 300 μ L larutan A (glukosa 17 mM, Tris-Cl 8 mM pH 8, lisozim 2 mg/mL, NaOH 0,13M dan SDS 0,2%) pada pellet yang dihasilkan, diinversi hingga homogen. Langkah berikutnya ditambahkan 150 mL larutan III (60mL KOAc 5M, 11,5 mL asam asetat glasial dan 20,5 mL ddH₂O), kemudian dihomogen dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil 400 μ L dan dimasukkan pada tabung mikro 1,5 mL yang baru, 800 μ L etanol p.a (2x volume) ditambahkan, kemudian campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan dicuci pellet yang dihasilkan dengan etanol 70% dengan cara meresuspensi, kemudian sentrifuga pada 12.000 rpm selama 3 menit. Pelet yang dihasilkan dikeringkan dengan dengan cara membuang supernatan membiarkan hingga pellet tidak mengandung etanol (bisa di suhu ruang atau 37°C). Kemudian ditambahkan 25 μ L ddH₂O pada pellet DNA plasmid dan resuspensi hingga pellet DNA plasmid larut. Larutan DNA plasmid siap digunakan sebagai templat untuk keperluan PCR dan sekuensing. Templat disimpan pada suhu -20 °C.

Hasil dan Pembahasan

Insersi gen *pncA* ke dalam plasmid pGEM-T

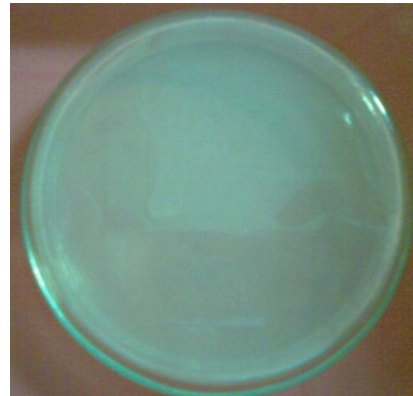
Gen *pncA* hasil PCR telah berhasil diinsersikan ke vektor pGEM-T. Keberhasilan insersi dapat dilihat pada hasil seleksi koloni biru putih pada Gambar 2. Kontrol negatif di media LB + ampisilin (Gambar 2.a) menunjukkan bahwa tidak ada koloni yang tumbuh sehingga dapat dipastikan bahwa media telah positif mengandung ampisilin yang aktif membunuh mikroba *wild type*. Pada Gambar 2.b, *E. coli* tumbuh baik karena media tanpa ampisilin, hal ini sesuai dengan target bahwa *E. coli* yang dipakai memang dalam kondisi yang baik. Kontrol positif di media LB + ampisilin ditumbuhi banyak *E. coli Top 10 F'*, hal ini menunjukkan bahwa *E. coli Top 10 F'* resisten terhadap ampisilin sehingga bisa dipakai sebagai sel inang untuk proses transformasi. Gambar 2.d dan 2.e menunjukkan adanya koloni biru dan koloni putih, hal ini menunjukkan bahwa proses insersi gen *pncA* berhasil diinsersi ke dalam plasmid pGEM-T. Koloni yang mengandung plasmid pGEM-T rekombinan akan menghasilkan warna putih sedangkan yang tidak mengandung plasmid pGEM-T rekombinasi menghasilkan koloni warna biru. Dengan demikian yang akan diproduksi dan diisolasi dikarakterisasi plasmid rekombinannya adalah koloni yang berwarna biru.

Isolasi dan karakterisasi plasmid pGEM-T rekombinan

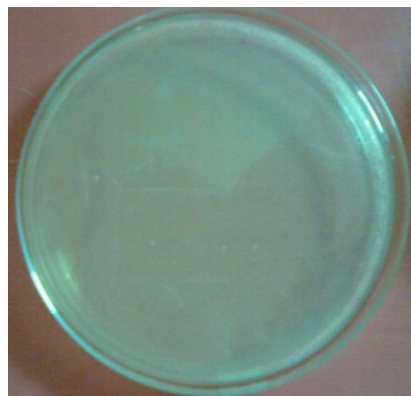
Setelah hasil skrining insersi gen *pncA* ke plasmid pGEM-T menunjukkan hasil yang positif maka langkah selanjutnya adalah isolasi plasmid pGEM-T rekombinan dan dilakukan karakterisasi menggunakan elektroforesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi plasmid pGEM-T rekombinan telah berhasil. Keberhasilan insersi dan isolasi dapat dilihat pada elektroforegram hasil elektroforesis pGEM-T-*pncA* dengan pembanding/ kontrol pGEM-T kosong (Gambar 3).



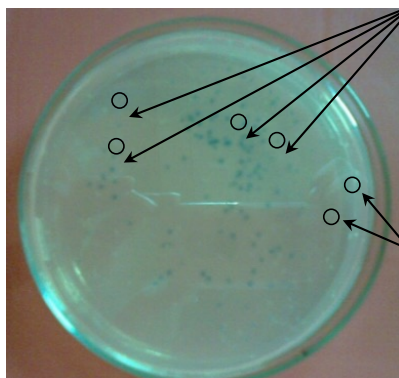
a. Kontrol Negatif (-) di Media LB + Ampisilin
Tidak terlihat adanya koloni yang tumbuh



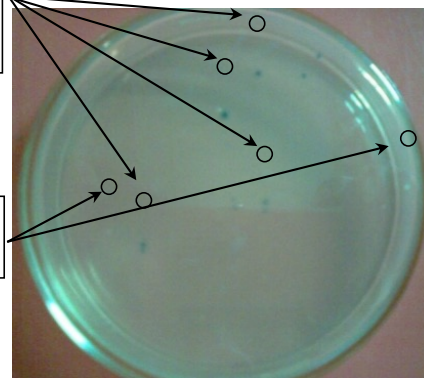
b. Kontrol Negatif (-) di Media LB tanpa Ampisilin
Tumbuh koloni (*E. coli*) yang sangat rapat



c. Kontrol Positif di Media LB + Ampisilin
Tumbuh koloni (*E. coli*) yang sangat rapat

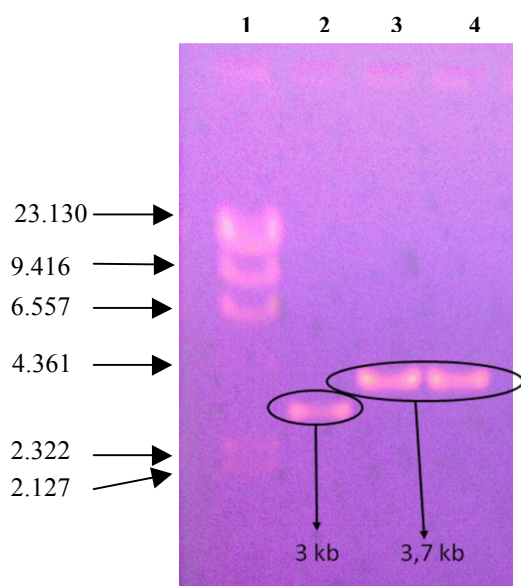


d. Hasil Ligasi (pGEM-T-pncA) tanpa pengenceran
Terlihat ada koloni putih dan biru



e. Hasil Ligasi (pGEM-T-pncA) pengenceran 100x
Terlihat ada koloni putih dan biru

Gambar 2. Hasil insersi gen *pncA* ke dalam plasmid pGEM-T: a. Kontrol Negatif (-) di Media LB + Ampisilin; b. Kontrol Negatif (-) di Media LB tanpa Ampisilin; c. Kontrol positif di Media LB + Ampisilin; d. Hasil Ligasi (pGEM-T-pncA) tanpa pengenceran; dan e. Hasil Ligasi (pGEM-T-pncA) pengenceran 100x.



Gambar 3. Elektroforegram hasil insersi gen *pncA* ke vektor pGEM-T.

Gambar lajur 1 adalah marker λ HindIII, sedangkan lajur 2, 3, dan 4 masing-masing p-GEM-T kosong, pGEM-T-*pncA* koloni 1, dan pGEM-T-*pncA* koloni

Daftar Pustaka

- Dye, C. & Williams, B.G. (2000): *Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis*, Communicable Disease Control, Prevention and Eradication, World Health Organization, CH-1211 Geneva 27, Switzerland & Council for Scientific and Industrial Research, P.O. Box 91230, Auckland Park 2006, Johannesburg, South Africa.
- ECDC Director's Presentation. (2012): *Multidrug resistant tuberculosis in the EU*, Exchange of views with the Committee on the Environment Public Health and Food Safety (ENVI), European Parliament, Brussels.
- Gillespie, S. H. (2002): Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective, *American Society for Microbiology*, 46, 267–274.
- Gupta, A.K., Reddy, V.P., Lavania, M., Chauhan, D.S., Venkatesan, K., Sharma, V.D., Tyagi, A.K., & Katoch, V.M. (2010): *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. *Indian. J. Med. Res.*, 132, 176–188.
- Kenyorini, Suradi, dan Surjanto (2006): Uji Tuberkulin, *Jurnal Tuberkulosis Indonesia*, 3, 7–1.
- Mathema, B., Kurepina, N. E., Bifani, P. J., & Kreiswirth, B. N. (2006): Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights, *American Society for Microbiology*, 19, 4.
- Motiwala, A.S., Dai, Y., Jones-Lo, E.C, Hwang, S.H., Lee, J.S., Cho, S.N., Via, L.E., Barry, C.E., & Alland, D. (2010): Mutations in Extensively Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* That Do Not Code for Known Drug-Resistance Mechanisms. *The Journal of Infectious Diseases: America*. All rights reserved, 201, 881–888.

15 yang telah dipotong oleh enzim restriksi *NdeI*. Kondisi elektroforesis adalah gel agarosa 0,7%, bufer TAE 1x, tegangan 75 volt, lama elektroforesis 60 menit. Marker dan hasil amplifikasi yang di-load masing-masing 5 μ L.

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *pncA* Isolat L20 MDR-*M. tuberculosis* yang resisten terhadap pirazinamida telah berhasil diinsersikan ke dalam plasmid pGEM-T. Hal ini dapat diamati dari hasil skrining koloni biru putih dan elektroforegram hasil elektroforesis plasmid pGEM-T-*pncA* yang bila dibandingkan dengan plasmid pGEM-T kosong ukurannya selisih seitar 0,7 kb (ukuran gen *pncA*).

- Ocheretina O, Morose W, Gauthier M, Joseph P, D'Meza R, & Escuyer VE, et al. (2012): Multidrugresistant tuberculosis in Port-au-Prince, Haiti. *Rev Panam Salud Publica.*, 31, 221–225.
- Promega. (2009): pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems: Instructions for Use of Products A1360, A1380, A3600 AND A3610. *Technical Manual* No. 042. Printed in USA. Revised 6/09.
- Sanjaya, E.H. (2012): MUTASI T539C GEN *pncA* (Val180Ala) ISOLAT KLINIS L20MDR *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Sains*, 40, 47–53.
- Susanti, E. dan Ariani, S. R. D. (2004): Kloning Gen Penisilin V Asilase dari *Bacillus* sp BAC4 melalui Pembuatan Pustaka Genom, *Biodiversitas*, 5, 1–6.
- Utarini, A., Basri, C., Faralina, M., Laksono, S.D., Boestan, S.P., Lestari, T., & Dinihari, T.N. (2011): *Rencana Aksi Nasional: Programmatic Management of Drug resistance Tuberculosis Pengendalian Tuberculosis Indonesia: 2011–2014*. Kementerian Kesehatan RI Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.