

**ISOLASI DAN OPTIMASI
PARAMETER *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)
KOLONI *Bordetella pertussis* pelita III TERHADAP ANTIGEN
PERTUSSIS TOXIN DAN *FILAMENTOUS HAEMAGGLUTININ***

SKRIPSI

**DEDE CHRISTIAN KURNIA
A161056**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2020**

**ISOLASI DAN OPTIMASI
PARAMETER *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)
KOLONI *Bordetella pertussis* pelita III TERHADAP ANTIGEN
PERTUSSIS TOXIN DAN *FILAMENTOUS HAEMAGGLUTININ***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**DEDE CHRISTIAN KURNIA
A161056**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2020**

**ISOLASI DAN OPTIMASI
PARAMETER POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
KOLONI *Bordetella pertussis* pelita III TERHADAP ANTIGEN
PERTUSSIS TOXIN DAN *FILAMENTOUS HAEMAGGLUTININ***

**DEDE CHRISTIAN KURNIA
A161056**

Juli 2020

Disetujui oleh :

Pembimbing



Dr. Erman Tritama, S.Si., M.Si

Pembimbing



Nur Asni Setiani, M.Si

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Skripsi ini dipersembahkan untuk orangtuaku, sahabat-sahabatku yang selalu mendampingi, memberikan semangat serta mendoakan setiap saat



ABSTRAK

Pertusis atau batuk rejan merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Bordetella pertussis* yang dapat dicegah oleh vaksin DTP atau Pentabio, vaksin ini dapat menyebabkan demam karena adanya endotoksin pada *Whole Cell Bordetella pertussis* dalam komponen vaksin tersebut. Penggunaan vaksin rekombinan atau bentuk acellular pertussis dapat mencegah terjadinya demam, karena komponen vaksin menggunakan bentuk sub unit atau aseluler. Antigen yang akan digunakan dalam vaksin aselular adalah *pertussis toxin* (Ptx) dan *filamentous haemagglutinin* (FHA). Tujuan penelitian ini untuk menentukan kondisi PCR yang optimal meliputi analisis primer dan variasi suhu *annealing* yang tepat pada proses PCR terhadap antigen Ptx dan FHA. Metode penelitian dilakukan dengan isolasi DNA *Bordetella pertussis* pelita III, kemudian verifikasi analisis interaksi primer *forward* dan *reverse* dari masing-masing antigen *pertussis toxin* dan *filamentous haemagglutinin* dengan program *Oligo Analyzer*. Primer yang sudah diverifikasi kemudian diamplifikasi dengan menggunakan PCR yang sebelumnya sudah ditambahkan *template* DNA dan *Master Mix*. Variasi yang dilakukan pada siklus PCR berupa tahap *annealing* pada masing-masing antigen dengan variasi Ptx (53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67°C) dan FHA (54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68°C). Analisis akhir menggunakan elektroforesis gel horizontal dengan hasil baik berupa berpendarnya gel agarosa saat dibawah lampu UV dengan warna hijau. Pada penelitian ini diperoleh nilai suhu optimum sebesar 55-65°C dengan panjang pita sebesar 2900 bp untuk Ptx dan suhu optimum pada FHA sebesar 54-68°C dengan panjang pita sebesar 658 bp.

Kata Kunci : *Bordetella pertussis* pelita III, Variasi *Annealing*, *Filamentous Haemagglutinin* , *Pertussis Toxin*, Optimasi PCR, dan *Oligo Analyzer*.

ABSTRACT

Pertussis or whooping cough is a disease caused by Bordetella pertussis which can be prevented by the DTP or Pentabio vaccines, this vaccine can cause fever due to the presence of endotoxin in the Bordetella pertussis Whole Cell in the vaccine component. Recombinant vaccines or acellular pertussis forms can prevent fever, because the vaccine components use the sub-unit or acellular form. The antigens that used in the acellular vaccine are pertussis toxin (Ptx) and filamentous haemagglutinin (FHA). The purpose of this study was to determine the optimal PCR conditions including primary analysis and the correct annealing temperature variations in the PCR process for Ptx and FHA antigens. The research method was carried out by isolating DNA from Bordetella pertussis pelita III, then analyzing the forward and reverse primary interactions of each pertussis toxin and filamentous haemagglutinin, analyzed antigen verified by the Oligo Analyzer program. Verified primers were then amplified using PCR which had previously been added template DNA and Master Mix. The variations in the PCR cycle were annealing steps for each antigen with variations of Ptx (53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67 63 °C) and FHA (54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 °C). The final analysis used horizontal gel electrophoresis with good results in the form of agarose gel fluorescence under a green UV lamp. In this study, the optimum temperature values were obtained at 55-65 °C with a band length of 2900 bp for Ptx and the optimum temperature at FHA of 54-68 °C with a ribbon length of 658 bp.

Keywords : *Bordetella pertussis pelita III, Annealing Variations, Filamentous Haemagglutinin, Pertussis Toxin, PCR Optimization, and Oligo Analyzer.*



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat dan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang Berjudul “**Isolasi Dan Optimasi Parameter *Polymerase Chain Reaction (PCR) Koloni *Bordetella Pertussis* Pelita III Terhadap Antigen *Pertussis Toxin* dan *Filamentous Haemagglutinin*”.***

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada jurusan Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Dr. Erman Tritama, S.Si., M.Si dan Nur Asni Setiani, M.Si atas bimbingan, nasihat, dukungan serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Adang Firmansyah, M.Si., Apt, selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Revika Rachmaniar, M.Farm., Apt selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
3. Nur Asni Setiani, M.Si selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis,
4. Seluruh staf dosen, staf administrasi serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
5. Serta sahabat-sahabat terdekat dan sahabat angkatan 2016 yang telah memberikan inspirasi dan kegembiraan selama penulis kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, September 2020

Penulis



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Bordetella pertussis</i>	4
2.2 Vaksin Rekombinan	5
2.3 PCR	6
2.3.1 Denaturasi	7
2.3.2 <i>Annealing</i>	8
2.3.3 Pemanjangan Primer (<i>Extention</i>)	8
2.4 Komponen-komponen PCR.....	8
2.4.1 DNA <i>template</i>	8
2.4.2 <i>Oligonukleotida</i> primer.....	9
2.4.3 <i>Deoksiribonukelotida trifosfat</i> (dNTP).....	9
2.4.4 Enzim DNA <i>Polymerase</i>	9
2.4.5 Komponen Pendukung Lainnya.....	10
2.5 Elektroforesis gel	10

BAB III TATA KERJA	12
3.1 Alat	12
3.2 Bahan	12
3.3 Metode Penelitian	12
3.3.1 Isolasi DNA <i>Bordetella pertussis</i> Pelita III	12
3.3.2 Pengujian dengan PCR.....	13
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Isolasi Koloni <i>Bordetella pertussis pelita III</i>	15
4.2 Analisis Primer	16
4.2.1 Primer <i>Filamentous hamagglutinin</i>	16
4.2.2 Interaksi Primer <i>Filamentous haemagglutinin</i>	17
4.2.3 Hasil analisis kedua primer FHA	21
4.2.4 Primer <i>Pertusis toxin</i>	21
4.2.5 Interaksi Primer <i>Pertusis toxin</i>	22
4.2.6 Hasil analisis kedua primer Ptx	26
4.3 Pengujian dengan PCR.....	27
4.4 Hasil uji dengan elektroforesis gel agarosa	27
BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	32
5.1 Simpulan	32
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 <i>Sequence</i> primer FHA dan Ptx	13
3.2 Pengujian dengan variasi siklus PCR	14
4.1 Hasil analisis data <i>Oligo Analyzer</i> Primer FHA	16
4.2 Hasil analisis Hairpin Primer FHA.....	18
4.3 Hasil analisis <i>Self Dimer</i> Primer FHA.....	19
4.4 Hasil analisis <i>Cross Dimer</i> Primer FHA	20
4.5 Hasil analisis data <i>Oligo Analyzer</i> Primer Ptx.....	21
4.6 Hasil analisis Hairpin Primer Ptx	23
4.7 Hasil analisis <i>Self Dimer</i> Primer Ptx	24
4.8 Hasil analisis <i>Cross Dimer</i> Primer Ptx	25
4.9 ΔG hasil interaksi hairpin, self dimer dan cross dimer Ptx dan FHA.....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Bagian-bagian faktor <i>virulensi Bordetella pertussis</i>	5
4.1 Ikatan <i>Forward</i> Primer FHA dengan <i>Template</i>	21
4.2 Ikatan <i>Reverse</i> Primer FHA dengan <i>Template</i>	21
4.3 Ikatan <i>Forward</i> Primer Ptx dengan <i>Template</i>	26
4.4 Ikatan <i>Reverse</i> Primer Ptx dengan <i>Template</i>	26
4.5 Hasil elektroforesis FHA.....	27
4.6 Hasil elektroforesis Ptx	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pengenceran 10x TBE.....	36
2. Kit yang digunakan dalam Master mix	36
3. Pengerjaan saat elektroforesis gel agarosa	36



DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F.M., Roger, B., Robert, E.K., David, D.M., J.G., Seidman., John, A.S., and Kevin,S. 2003. *Current protocols in Molecular Biology*. Unites States of America : John Willey and sons. P. 219.
- Almeida, G., Tais, Patricia, Morgana, and Valente. 2012. *Rapid Yeast DNA Extraction By Boiling And Freeze- Thawing Without Using Chemical Reagents And DNA Purification*. Doi : 1516-8913. P. 321.
- Ambion. 2013. *TE Buffer pH 7.0 and 8.0*. Doi : 4386653. P. 1.
- Baitil, Atiq. 2019. “Gambaran Pengetahuan dan Perilaku Orangtua dalam Pemberian Antipiretik pada anak sebelum Berobat Berdasarkan Jenis Pekerjaan Orangtua .“ *Skripsi*. Jurusan Kedokteran. Jakarta : Universitas Indonesia. Hal. 5.
- Biofarma. 2012. *Preventif Efektif: Imunisasi dalam Sketsa Sejarah*. Bandung : BUMN. Hal 2.
- Btlabs. 2019. *Horizontal Or Vertical Electrophoresis: What You Need To Know*. USA: Geno Technology Inc. P.1
- Efendi, Y.S., Dwi, S., Erman, T., Michelle, L.P., Gilang, N.N., Sugeng, R., Iskandar, Pingkan, A., Ernawati, A., Biswarup, M., and Endang, P. 2017. “*Complete Genome Sequence of Bordetella pertussis Pelita III, the Production Strain for an Indonesian Whole-Cell Pertussis Vaccine.*” *Genome Announcements*(5): P. 1-2.
- Guiso, Nicole. 2009. *Bordetella pertussis and Pertussis Vaccines*. Doi : 10.1086/644733. P. 1.
- Harahap, M. 2018. *Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika*. Doi : 2549-3698/2549-3701. Hal. 22.
- IDT. 2019. *Oligo Analyzer*. Doi : FM 88954/FM 513 29. P. 1.
- Iqbal, M., Dwi, I., dan Nia. 2016. “Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi *White Spot Syndrome* Virus (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)”. *FPIK*, Vol 7. Jatinangor: Universitas Padjajaran. Hal. 55.
- Jannah, Siti N. 2014. “Analisis Sekuen Gen Sitokrom Oksidase I Dna Mitokondria Lalat Buah *Bactrocera sp* .“ *Skripsi*. Jurusan Sains Biologi. Semarang: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Hal. 12.

- Jovita, Bernadet. 2019. "Optimasi Isolasi Genom *Hansenula Polymorpha* Dengan Variasi Optical Density (OD) ." *Skripsi*. Jurusan Farmasi. Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia. Hal. 8.
- Lang, J. S. 2012. *Fundamental approaches in molecular biology for communication sciences and disorders*. Doi : 10.1044/1092-4388. P. 1.
- Loftus, Kevin. 2018. *Evolution of Bordetella pertussis genome may play a role in the increased rate of whooping cough cases in the United States*. US: James Madison University. P. 5.
- Maitriani, Luh., I Nengah, dan Sagung. 2015. "Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen Inha Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (Mdr-Tb) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction." *E journal*(3): Hal. 93.
- Marr, N., Alexey, N., Adeline, M.H., Martine, C., and Rachel C.F. 2010. *Variability in the Lipooligosaccharide Structure and Endotoxicity among Bordetella pertussis Strains*. Doi : 10.1086/657409. P. 1.
- Melvin, J.A., Enrich, V.S., Christopher, R.N., and Peggy A.C. 2015. "New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals a Role for Full-Length FhaB in Bordetella Virulence." *Mbio Announcements*(6): P. 2.
- Mulyani, Agus, P., dan Isni, N. 2011. "Perbandingan Beberapa Metode Isolasi Dna Untuk Deteksi Dini Koi *Herpes Virus* (Khv) Pada Ikan Mas (*Cyprinus Carpio L.*)". *FPIK*. Jatinangor: Universitas Padjajaran. Hal. 3.
- NEB. 2019. *Instruction Manual Taq PCR Kit*. Doi : 01938-2723. P. 1.
- Pahlevi. 2016. *Desain Primer untuk Identifikasi Gen GmDREB2 pada Kedelai*. Nomor Paten : 2541-3287. Hal. 4.
- Radji, Maksum. 2009. *Vaksin DNA : Vaksin generasi Keempat*, Nomor Paten: 1693-9883. P. 1.
- Riupassa, Pieter. 2009. "Perancangan Primer Oligonukleotida untuk Polimerisasi in Vitro Gen Sukrosa Sintase." *FMIPA*, Vol 3. Maluku: Universitas Pattimura. Hal. 1.
- Sigma. 2010. *Oligo Architect Online*. Doi : 77444-510152. P. 2.
- Switzer. 1999. *Experimental Biochemistry*. Basingstoke: Macmillan. P. 70.
- Susmiarsih, Tri P. 2018. *Kajian DNA Rekombinan pada Vaksin DNA dan Vaksin Subunit Protein*. Doi : 2085-5648. P. 1.

Yusuf, Z.K. 2010. "Polymerase Chain Reaction." Saintek, Vol 5. Gorontalo: UNG.

Yustinadewi, P., Putu, S., dan Inna. 2018. "Teknik Perancangan Primer Untuk Sekuen Gen Mdr-1 Varian 1199 Pada Sampel Buffy Coat Pasien Anak Dengan Lla Mdr-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques In Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla." *Farmasi*, Vol 1. Bali: Universitas Udayana. Hal. 109.