

KONSTRUKSI VEKTOR EKSPRESI GEN KEX2-650 DENGAN METODE SUBKLONING

SALSABILA BENING



**DEPARTEMEN BIOKIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Konstruksi Vektor Ekspresi Gen KEX2-650 dengan Metode Subkloning” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2024

Salsabila Bening
G8401201032



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

ABSTRAK

SALSABILA BENING. Konstruksi Vektor Ekspresi Gen KEX2-650 dengan Metode Subkloning. Dibimbing oleh POPI ASRI KURNIATIN dan ASRUL MUHAMAD FUAD.

KEX2 (EC3.4.21.61) dari *Saccharomyces cerevisiae* adalah enzim protease yang memproses pematangan pro-protein secara intraselular di dalam retikulum endoplasma (RE) dan kompartemen akhir badan Golgi. KEX2 memiliki domain transmembran yang menyebabkan enzim ini tertahan di dalam membran RE dan tidak dapat diekspresikan secara ekstraselular seutuhnya. Penelitian ini bertujuan untuk konstruksi gen Kex2-650 tanpa domain transmembran dengan metode subkloning. Gen Kex2-650 diamplifikasi dengan metode PCR dari plasmid pD902-KEX2-699 dan disubklon ke dalam pPICZ α . Metode yang digunakan meliputi konstruksi gen rekombinan KEX2-650 dengan PCR untuk amplifikasi sekuen gen dan menambahkan situs restriksi *XhoI* pada kedua ujungnya, restriksi gen dan plasmid dengan *XhoI*, ligasi fragmen gen ke plasmid pPICZ α , transformasi plasmid rekombinan ke *E. coli* DH5 α , isolasi plasmid, dan verifikasi sisipan dengan PCR. Amplifikasi gen KEX2-650 berhasil dilakukan, ditunjukkan oleh terbentuknya ampikon berukuran 1.6 kb. Plasmid rekombinan pPICZ α -KEX2-650 berhasil ditransformasikan ke sel *E. coli* yang ditunjukkan oleh terdeteksinya ampikon berukuran 2.2 kb.

Kata kunci: *E. coli* DH5 α , KEX2, PCR, plasmid rekombinan, subkloning

ABSTRACT

SALSABILA BENING. Construction of KEX2-650 Gene Expression Vector Using Subcloning Method. Supervised by POPI ASRI KURNIATIN and ASRUL MUHAMAD FUAD.

KEX2 (EC3.4.21.61) from *Saccharomyces cerevisiae* is a protease enzyme that processes intracellular maturation of pro-proteins within the endoplasmic reticulum (RE) and late compartments of the Golgi apparatus. KEX2 has a transmembrane domain, causes this enzyme to be retained in the ER membrane and can not be completely expressed extracellularly. This study aimed to construct the Kex2-650 gene without the transmembrane domain using the subcloning method. The Kex2-650 gene was amplified using PCR method from plasmid pD902-KEX2-699 and subcloned into pPICZ α . The techniques used include constructing the KEX2-650 recombinant gene using PCR to amplify the gene sequence while adding *XhoI* restriction sites at both ends, restricting the gene and plasmid with *XhoI*, ligating the gene fragment to the pPICZ α plasmid, transforming the recombinant plasmid into *E. coli* DH5 α , isolating the plasmid, and verifying the insert by PCR. Amplification of the KEX2-650 gene was successful as indicated by the detection of 1.6 kb amplicon. The recombinant plasmid pPICZ α -KEX2-650 were successfully transformed into *E. coli* cells, as indicated by the detection of 2.2 kb.

Keywords: *E. coli* DH5 α , KEX2, PCR, recombinant plasmid, subcloning.



@Hak cipta milik IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2024¹
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

KONSTRUKSI VEKTOR EKSPRESI GEN KEX2-650 DENGAN METODE SUBKLONING

SALSABILA BENING

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana pada
Program Studi Biokimia

**DEPARTEMEN BIOKIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tim Penguji pada Ujian Skripsi:

1. Ukhradiya Magharaniq Safira P, S.Si, M.Si

2. Dr. Syamsul Falah, S.Hut, M.Si



Judul Skripsi : Konstruksi Vektor Ekspresi Gen KEX2-650 dengan Metode Subkloning

Nama : Salsabila Bening

NIM : G8401201032

Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Dr. Popi Asri Kurniatin, S.Si., Apt., M.Si.

Pembimbing 2:

Dr. Asrul Muhamad Fuad, M.Si.

Diketahui oleh

Ketua Departemen Biokimia:

Dr. Mega Safithri, S.Si., M.Si

NIP. 197709152005012002

Tanggal Ujian:
14 Agustus 2024

Tanggal Lulus:



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Penelitian yang dilaksanakan sejak bulan November 2023 sampai bulan Juli 2024 ini ialah rekayasa genetik, dengan judul “Konstruksi Vektor Ekspresi Varian Gen KEX2-650 dengan Metode Subkloning”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Dr. Popi Asri Kurniatin, S.Si., Apt., M.Si. dan Dr. Asrul Muhamad Fuad, M.Si. yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada pembimbing akademik, moderator seminar, dan penguji luar komisi pembimbing. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Hanifah Aryani, S.Si. selaku kakak dan rekan kerja selama penelitian ini berlangsung. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Pusat Riset Rekayasa Genetika, BRIN, yang telah mengizinkan penulis melaksanakan penelitian di tempat yang bersangkutan. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada Papa, Mama, serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2024

Salsabila Bening

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	ii
DAFTAR TABEL	ii
DAFTAR LAMPIRAN	ii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
1.5 Hipotesis	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Enzim KEX2	3
2.2 Plasmid pD902	4
2.3 Vektor Ekspresi pPICZ α	5
2.4 Metode Subkloning	6
III. METODE	8
3.1 Waktu dan Tempat	8
3.2 Alat dan Bahan	8
3.3 Prosedur Kerja	9
IV. HASIL	12
4.1 Fragmen Gen Rekombinan KEX2-650-Xho	12
4.2 Subklon Gen KEX2-650-Xho ke Plasmid pPICZ α	12
4.3 Isolasi Plasmid pPICZ α -KEX2-650	14
4.4 Verifikasi Sisipan pPICZ α -KEX2-650 dengan PCR	15
V. PEMBAHASAN	16
5.1 Konstruksi Gen KEX2-650-Xho	16
5.2 Subklon Gen KEX2-650 ke Plasmid pPICZ α	17
5.3 Isolasi Plasmid pPICZ α -KEX2-650	18
5.4 Verifikasi Sisipan pPICZ α -KEX2-650 dengan PCR	19
VI. SIMPULAN DAN SARAN	21
6.1 Simpulan	21
6.2 Saran	21
LAMPIRAN	26
RIWAYAT HIDUP	32



DAFTAR GAMBAR

1	Lokasi domain protein KEX2	3
2	Skema struktur domain protein KEX2	3
3	Peta plasmid pD902-KEX2-699	5
4	Peta plasmid pPICZ α	6
5	Ilustrasi ligasi fragmen plasmid dan vektor	7
6	Elektroforegram amplifikasi gen KEX2-650-Xho	12
7	Elektroforegram restriksi dengan XhoI	13
8	<i>E. coli</i> DH5 α transforman pPICZ α -KEX2-650	14
9	Elektroforegram isolasi 10 koloni tunggal pPICZ α -KEX2-650	15
10	Elektroforegram verifikasi sisipan pPICZ α -KEX2-650	15
11	Penempelan primer pada konstruksi gen KEX2-650	16
12	Situs penempelan primer spesifik <i>backbone</i>	20
13	Situs penempelan primer spesifik <i>backbone</i> pada plasmid yang membawa gen non-target	20

DAFTAR TABEL

1	Sekuen primer untuk amplifikasi gen KEX2-650	8
2	Sekuen primer untuk deteksi gen KEX2-650 pada pPICZ α	8
3	Kuantifikasi konsentrasi plasmid pPICZ α dan fragmen gen KEX2-650 hasil restriksi dengan enzim XhoI	13

DAFTAR LAMPIRAN

1	Diagram alir penelitian	27
2	Peta plasmid pPICZ α B	27
3	Sekuens DNA plasmid pPICZ α B	28
4	Komposisi campuran dan kondisi reaksi PCR	29
5	Komposisi buffer	30
6	Perhitungan volume reaksi ligasi	31