

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. Latar Belakang

Gen *pdc* merupakan penyandi enzim *pyruvate decarboxylase* yang berperan dalam proses produksi asetaldehida secara homofermentatif dengan memanfaatkan metabolisme mikroorganisme seperti *Kluyveromyces lactis*, *Pisum sativum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* dan *Zymobacter palmae* (Dobritzsch *et al.*, 1998). Gen *pdc* banyak terdapat pada fungi, *yeast* serta tumbuhan tingkat tinggi. Namun hanya terdistribusi rendah pada mikroba dan tidak terdapat pada mamalia (Schenk *et al.*, 1997).

Asetaldehida merupakan bahan yang berperan penting dalam sintesis bahan-bahan organik, seperti asam asetat, anhidrid asam asetat, butanol, etil asetat, dan piridin. Asetaldehida telah dinyatakan oleh *U.S. Food and Drug Administration* sebagai produk yang memiliki status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dan memberikan aroma segar pada susu, yogurt, daging, roti, buah-buahan, dan sayuran (Wecker and Zall, 1987). Konsentrasi asetaldehida dalam makanan pada umumnya berkisar antara 0,047%. Tahun 1976, sekitar 19.000 pon asetaldehida digunakan untuk bahan tambahan pada produk makanan di Amerika Serikat (*National Toxicology Program*, 2002).

Asetaldehida memberikan banyak manfaat dalam dunia industri, antara lain:

1. Senyawa antara (*intermediet compound*) untuk produksi asam asetat (cuka), piridin dan basa piridin, asam perasetik, pentaeritritol, dan butilen glikol. Selain itu juga digunakan dalam produksi ester, khususnya etil asetat dan isobutilasetat, sintesis krotonaldehida sebagai pemberi rasa dan pemberi aroma, metaldehida yang digunakan sebagai pembasmi mollusca seperti siput dan keong (*National Toxicology Program, 2002*).
2. Bahan baku dalam industri karet sintetik, cermin perak dan untuk memperkuat serat gelatin (Merck, 1989).
3. Bahan baku dalam industri disinfektan, obat-obatan, parfum, pernis, bahan kimia untuk keperluan fotografi dan antioksidan (Sittig, 1985; Gosselin *et al.*, 1984).

Dari beberapa potensi yang disebutkan di atas, dapat dikatakan bahwa asetaldehida memberikan manfaat yang berarti sebagai bahan baku dalam berbagai bidang industri. Menurut data BPS (2003) dalam Nurfadzilla (2007), kebutuhan asetaldehida untuk industri di Indonesia terus mengalami peningkatan setiap tahun. Hal ini menunjukkan pesatnya industri kimia di Indonesia yang menggunakan bahan baku asetaldehida. Data statistik di bawah ini menunjukkan kenaikan permintaan impor asetaldehida.

Tabel 1. Data Statistik Impor Asetaldehida

Tahun	Jumlah (kg)	Tahun	Jumlah (kg)
1998	8.267.570	2001	16.549.570
1999	10.492.340	2002	20.827.660
2000	13.628.690		

Sumber: BPS, 2003 *dalam* Nurfadzilla, 2007

Penduduk Indonesia dari tahun ke tahun terus meningkat sehingga kebutuhan dunia industri akan asetaldehida juga mengalami peningkatan. Selama ini asetaldehida diproduksi dengan beberapa cara antara lain:

1. Pabrik asetaldehida didirikan dengan bahan baku etanol dan udara dengan proses oksidasi etanol berkapasitas 15.000 ton/tahun (Sasmito, 2007).
2. Sejak tahun 1940, pola produksi asetaldehida telah mengalami perubahan mulai dari teknik hidrasi asetilen dan oksidasi etil alkohol menjadi fase cairan dari oksidasi etilen menggunakan *Wacker-Hoechst processes* (EPA, 1994).
3. *Electrohol Process* dilakukan dengan mengkonversi etanol menjadi asetaldehida. Kelemahan dari sistem ini adalah memiliki ketergantungan yang tinggi terhadap etanol. Jika konsentrasi etanol dikurangi, maka efisiensi dari produk asetaldehida yang dihasilkan akan menurun drastis (Trevino, 1985 *dalam* Wecker and Zall, 1987).

Produksi asetaldehida yang dihasilkan dengan metode-metode tersebut secara kualitas dan kuantitas kurang mendukung untuk kebutuhan industri di Indonesia mengingat kebutuhannya selalu meningkat setiap tahun. Selain itu, harga etanol sebagai bahan baku produksi yang dipakai dalam metode-metode

tersebut semakin membumbung tinggi. *BUMN Online* (2006) dalam situs resminya [www.bumn.go.id](http://www.bumn.go.id) menyatakan bahwa cukai etanol mencapai lebih dari 200%. Dengan harga etanol Rp. 5000 per liter, maka pihak Pertamina harus membayar cukai Rp. 10000 per liter jika cukai etanol tidak dibebaskan. Oleh karena itu, diperlukan suatu teknologi alternatif untuk memproduksi asetaldehida secara efektif dan efisien yang salah satunya adalah penerapan bioteknologi melalui proses fermentasi mikroorganismenya dengan memanfaatkan limbah pertanian.

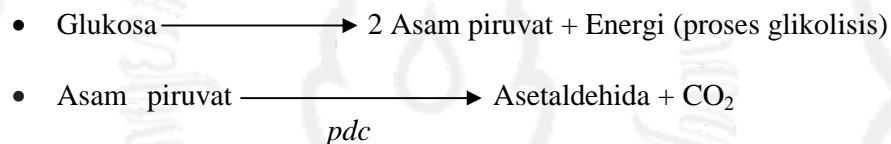
Limbah pertanian berupa jerami dan sekam tersedia secara berlimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal. Jumlah sekam menurut Rahmat (2006) sekitar 20-23% gabah, sedangkan menurut BPS (2005) dalam Rahmat (2006), produksi gabah kering giling hingga 1 November 2005 mencapai 54 juta ton. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sekam yang dihasilkan mencapai sekitar 10,8 juta ton. Padahal melalui pendekatan bioteknologi, limbah pertanian dapat diolah lebih lanjut menjadi hasil samping yang bernilai ekonomi tinggi (Nugraha dan Setiawati, 2004) yang salah satunya adalah produk berupa asetaldehida.

Beberapa potensi limbah biomassa pertanian antara lain:

1. Produksi limbah perkebunan kelapa sawit secara fisik cukup potensial sebagai sumber pakan ternak (pelepah 486 ton/ha, daun sawit 17,1 ton/ha, solid 840 ton/ha, bungkil inti sawit 567 ton/ha) dan dikaitkan dengan populasi ternak kambing di Indonesia sekarang ini (13.065.700 ekor) dapat ditingkatkan kapasitas tampung pakan sebesar 33,1 kali lipat dari populasi yang ada sekarang (Sianipar dkk, 2003).

2. Sekam dan jerami diketahui mengandung karbohidrat seperti silosa, arabinosa, dan selulosa. Menurut Suharno (1979) dalam Nugraha dan Setiawati (2004), kandungan karbohidrat dalam sekam sebesar 33,71%. Proses sakarifikasi terhadap karbohidrat dalam biomassa mampu menghasilkan monosakarida yang melalui proses fermentasi dengan memanfaatkan metabolisme mikroorganisme bakteri dapat menghasilkan asetaldehida.

Menurut Purwoko (2007), peranan enzim *pyruvate decarboxylase* yang disandikan oleh gen *pdv* terkait produksi asetaldehida dengan memanfaatkan metabolisme mikroorganisme dan potensi limbah biomassa digambarkan pada reaksi di bawah ini:



Permasalahan yang dihadapi saat ini adalah jumlah mikroorganisme bakteri yang memiliki gen *pdv* sebagai penyandi enzim *pyruvate decarboxylase* sangat terbatas. Teknologi DNA rekombinan, yaitu dengan menginsersikan gen *pdv* ke dalam *Escherichia coli* sebagai bakteri inang, diharapkan mampu menjawab permasalahan tersebut sekaligus dapat menjadi teknologi alternatif dalam proses produksi asetaldehida. Untuk mengembangkan teknologi tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan kloning dan ekspresi gen *pdv* dari *Zymobacter palmae*. *E. coli* DH5 $\alpha$  akan digunakan sebagai bakteri inang dalam proses kloning dan *E. coli* BL21 DE3pLys akan digunakan sebagai bakteri inang dalam proses ekspresi. Namun, sebelum melangkah ke dalam proses kloning dan ekspresi gen,

maka perlu dilakukan isolasi genom *Z. palmae* dan amplifikasi gen *pdC* yang menyandikan enzim *pyruvate decarboxylase* melalui metode PCR. Studi bioinformatika yang merupakan kegiatan pendahuluan dari penelitian ini dilakukan dengan pencarian kandidat mikroorganisme sumber gen *pdC* melalui *GenBank Online* NCBI.

### **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah gen *pdC* dapat diisolasi dari genom bakteri *Z. palmae*?
2. Apakah gen *pdC* dapat dikloning pada vektor plasmid pGEM-T easy?
3. Apakah gen *pdC* terekspresi pada vektor plasmid pET21b?

### **C. Tujuan Penelitian**

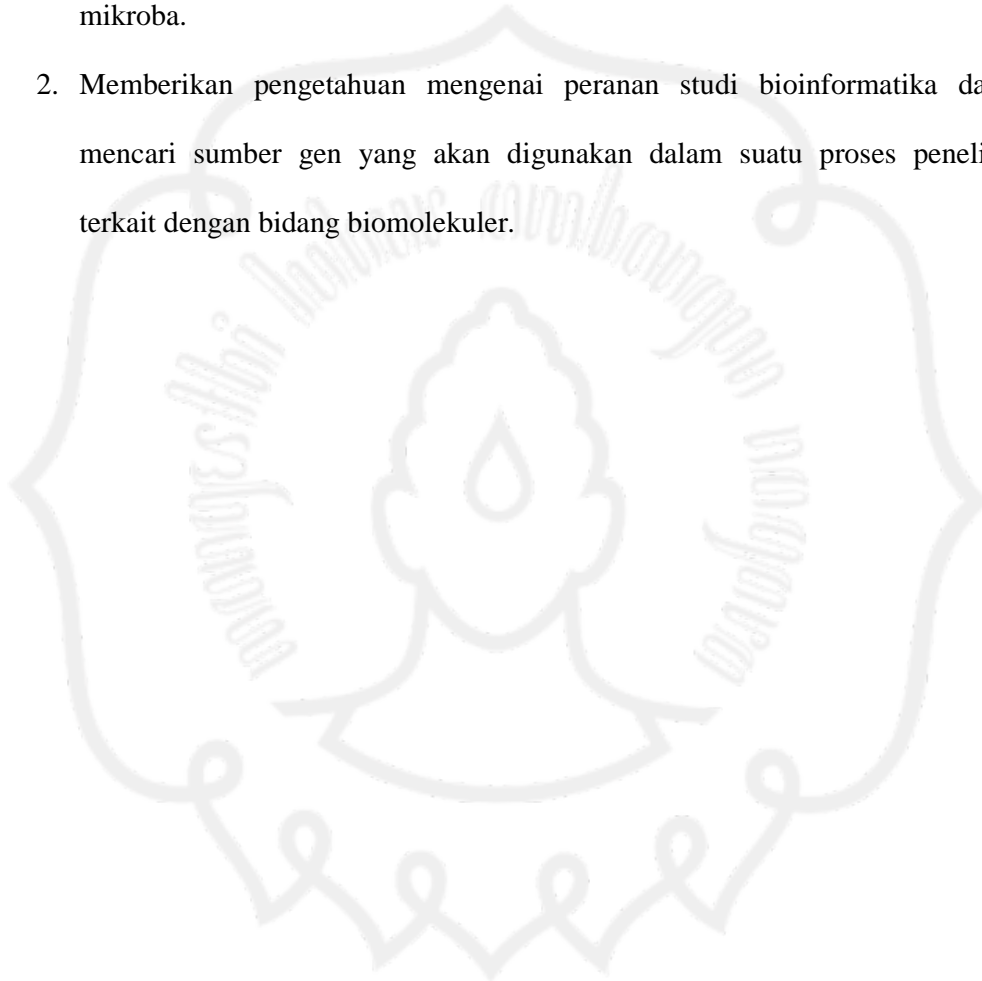
Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengisolasi gen *pdC* dari genom bakteri *Z. palmae*.
2. Mendapatkan klon gen *pdC* pada vektor plasmid pGEM-T easy.
3. Menguji ekspresi gen *pdC* pada vektor plasmid pET21b.

#### **D. Manfaat Penelitian**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat:

1. Mengembangkan teknologi alternatif dalam proses produksi asetaldehida yang efektif, efisien dan ramah lingkungan dengan memanfaatkan metabolisme mikroba.
2. Memberikan pengetahuan mengenai peranan studi bioinformatika dalam mencari sumber gen yang akan digunakan dalam suatu proses penelitian terkait dengan bidang biomolekuler.



## BAB II

### LANDASAN TEORI

#### A. Tinjauan Pustaka

##### 1. Studi Bioinformatika

Bioinformatika merupakan kajian yang memadukan disiplin ilmu biologi molekuler, matematika dan teknik informasi (TI) serta sebagai bidang ilmu pengetahuan yang saat ini mengalami perkembangan yang cukup signifikan (Wibowo, 2003). Aplikasi dari bioinformatika meliputi bidang farmasi, kedokteran dan pertanian (Nugroho *et al.*, 2005). Menurut Nugroho (2003), Bioinformatika merupakan suatu bidang yang melibatkan berbagai metode analisis sehingga kuantitas dan kualitas data menjadi aspek penting dalam melakukan suatu penelitian.

Kajian ilmu tersebut didefinisikan sebagai aplikasi dari teknik informatika dan analisis untuk menangkap dan menginterpretasikan data tentang biologi molekuler. Kajian ini berkembang atas inisiatif para ahli biologi molekuler dan ahli statistik berdasarkan pola pikir bahwa semua gejala yang ada di alam ini bisa dibuat secara *artificial* melalui simulasi dari data yang tersedia. Pada saat ini, bioinformatika mempunyai peranan yang sangat penting, diantaranya adalah untuk manajemen data biologi molekuler terutama sekuen DNA dan informasi genetika. Perangkat utama bioinformatika adalah *software* dan ketersediaan jaringan internet (Aprijani dan Elfaizi, 2004).



Bioinformatika merupakan program pencarian *database* protein yang masih dikembangkan sampai saat ini. Pemanfaatan *GenBank online* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dengan alamat website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dapat memberikan kemudahan dalam pencarian gen berdasarkan tingkat homologi sekuen dengan menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Program BLAST merupakan alat yang digunakan secara luas dalam mencari *database* protein dan DNA untuk mendapatkan daerah dengan persamaan sekuen terbanyak (*Conserve region*) (Altschul *et al.*, 1997).

Menurut Utama (2003), berbagai *tool* atau *software* telah dikembangkan untuk analisis gen virus. Berdasarkan analisis tersebut, dapat dilakukan proses klasifikasi, analisis tingkat mutasi, prediksi rekombinasi, dan prediksi bagian antigenik suatu virus. Walaupun hasil yang didapatkan dengan menggunakan *tool* bioinformatika hanya memberikan data-data sebagai bahan pertimbangan, namun dengan bioinformatika, pekerjaan menjadi lebih efektif dan efisien karena tidak harus melakukan eksperimen secara *trial and error*.

Perkembangan bioinformatika telah memberikan kemudahan dalam menganalisis berbagai data hasil penelitian di bidang biologi molekuler. Program serta data-data yang berhubungan dengan biologi molekuler dapat diakses melalui jaringan internet, antara lain untuk mendapatkan sekuen nukleotida yang tersimpan dalam *GenBank*, menganalisis tingkat similaritas dengan *multiple sequence alignment* menggunakan program *Clustal-W*, membandingkan suatu sekuen dengan sekuen lain yang tersimpan dalam *GenBank* menggunakan

program BLAST (*Basic Local Allignment Search Tool*), mendesain sepasang primer PCR dan untuk mengetahui situs enzim restriksi dalam utas DNA (Darmono dkk., 2006).

Menurut Heliyanti (2005), produk teknologi baru yang dikenal sebagai bioinformatika mempunyai pasar yang menjanjikan untuk komersialisasi *software*. Selain BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), ada beberapa perangkat *software* seperti *Clustal-W* yang berfungsi untuk menganalisis sejauh mana suatu virus berbeda dengan virus lainnya. Data yang telah dianalisis dapat dilihat dengan menggunakan program *TreeView* yang bisa *download* bebas dari berbagai situs internet.

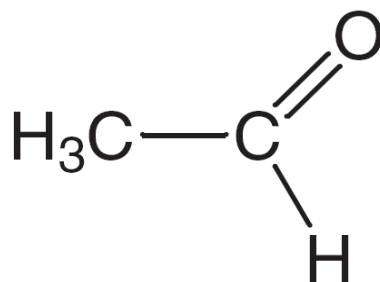
Pelacak DNA spesifik gen dapat dibuat dengan memanfaatkan kemajuan bioinformatika yang diikuti dengan pengujian PCR terhadap primer pelacak hasil rancangan. Studi bioinformatika ini sangat penting dalam bioteknologi modern, karena hasil dari studi bioinformatika digunakan sebagai dasar dalam perancangan primer PCR (Santoso, 2001). Menurut Heliyanti (2005), kalangan industri menggunakan data-data dari bioinformatika untuk pencarian biokatalis baru atau desain obat seperti antibiotik dan inhibitor.

Dalam penelitian ini akan digunakan *Genamics Expression*, *FastPCR*, *BioEdit*, *CLC Workbench*, dan *DNA Calculator Online* sebagai *software* yang digunakan dalam pembuatan desain pasangan primer PCR dan pengujian pasangan primer untuk memprediksi hasil PCR.

## 2. Asetaldehida

Asetaldehida atau etanal adalah sebuah senyawa organik dari kelompok aldehida dengan rumus kimia  $\text{CH}_3\text{CHO}$ . Senyawa ini merupakan cairan mudah terbakar, memiliki bau yang tajam seperti buah-buahan, tidak berwarna pada suhu  $30^\circ\text{C}$  dan tekanan 1 atm serta dapat bercampur dengan air. Asetaldehida juga merupakan senyawa antara dalam sintesis asam asetat, beberapa ester, dan zat-zat kimia lainnya (*Nasional Toxicology Program*, 2002).

Asetaldehida adalah bahan yang mempunyai kegunaan sangat luas dalam industri kimia. Prosentase penggunaan asetaldehida sebagai bahan baku dalam industri mencapai  $\pm 90\%$  untuk menghasilkan produk kimia yang lain, seperti: bahan baku pembuatan asam asetat, piridin, 2-etil heksanol, pentaeritritol, n-butanol, trimetilpropana, krotonaldehid, asam laktat, kloral, 1-3 butilen glikol (Nurfadzilla, 2007).



Gambar 1. Rumus molekul asetaldehida (*Nasional Toxicology Program*, 2002)

### a. Sifat fisis asetaldehida

Formula :  $\text{CH}_3\text{CHO}$

Berat molekul : 44,052 gr/mol

Titik didih	: 20,16°C
Titik leleh	: -123,5°C
Densitas	: 0,778 gr/ml pada 20°C
Tekanan kritis	: 6,40 mPa
Temperatur kritis	: 181,5°C
Viskositas	: 0,2237 pada 20,3°C
<i>Flash point</i>	: -38°C
<i>Specific heat</i> 15°C	: 2,18 J/gr K
<i>Specific heat</i> 25°C	: 1,41 J/gr K
Panas pembakaran	: 12867,9 kJ/mol
Kelarutan	: tidak terbatas, baik dalam air atau alkohol
Tegangan permukaan	: 21,2 dyne/cm pada 20°C
Kapasitas panas cair	: 0,522 kal/gr
Kapasitas panas uap	: 0,336 kal/gr

b. Sifat kimia asetaldehida

Asetaldehida adalah senyawa yang sangat reaktif dan secara umum dipakai sebagai bahan baku dalam industri. Reaksi oksidasi, reduksi dan polimerisasi merupakan contoh-contoh reaksi keaktifan.

1). Reaksi oksidasi

Reaksi oksidasi asetaldehida fase cair dengan oksigen merupakan reaksi yang sangat penting dalam sebuah industri. Kebanyakan asam asetat diproduksi dengan cara tersebut.

## 2). Reaksi reduksi

Reaksi reduksi menjadi alkohol sangat mudah terjadi. Jenis katalis yang dapat digunakan antara lain: platina, asam kloroplatinat, nikel dan palladina.

## 3). Reaksi polimerisasi

Asam mineral akan mengkristalkan trimerisasi menjadi paraldehida pada suhu kamar. Jika metasetal dititrasi dengan HCl kering pada suhu rendah, maka akan berubah kembali menjadi asetaldehida dan paraldehida jika diinkubasikan pada suhu 60-65°C selama beberapa hari. Peristiwa ini dinamakan dipolimerisasi (Celanese, 2006).

## 3. Enzim *Pyruvate Decarboxylase*

Enzim adalah katalis hayati. Hal ini karena enzim adalah senyawa organik yang dihasilkan oleh sel-sel hidup. Katalis juga menampakkan spesifikasi yang artinya adalah suatu katalis tertentu akan berfungsi pada hanya satu jenis reaksi tertentu. Walaupun dalam jumlah yang amat sedikit, enzim mempunyai kemampuan unik untuk mempercepat berlangsungnya reaksi kimiawi tanpa enzim itu sendiri terkonsumsi atau berubah setelah reaksi selesai. Fungsi utama suatu enzim ialah mengurangi hambatan energi aktivasi pada suatu reaksi kimiawi. Energi aktivasi merupakan jumlah energi yang dibutuhkan untuk membawa suatu substansi ke status reaktifnya (Pelczar and Chan, 1986).

*Pyruvate decarboxylase* adalah enzim yang disandikan oleh gen *pdc* dan berperan dalam mengkatalisis dekarboksilasi non-oksidatif dari piruvat untuk menghasilkan asetaldehida dan CO<sub>2</sub>. Aktivitas dari enzim tergantung dari *Thiamin*

*diphosphate* (ThDP) dan  $Mg^{2+}$  yang tersedia secara melimpah di alam. Namun keberadaan dari  $Mg^{2+}$  dapat digantikan dengan *bivalent cations* seperti  $Mn^{2+}$ ,  $CO^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  tanpa mempengaruhi aktivitas katalisis dari enzim tersebut (Diefenbach *et al.*, 1991). Enzim *pyruvate decarboxylase* yang memiliki *EC Number* 4.1.1.1 terdapat pada beberapa organisme seperti *Kluyveromyces lactis*, *Pisum sativum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* dan *Zymobacter palmae* (Dobritzsch *et al.*, 1998).

*Pyruvate decarboxylase* adalah suatu enzim sitosol yang ditemukan pada fungi, tanaman dan beberapa bakteri. Enzim tersebut menggunakan ThDP sebagai kofaktor (Schenk *et al.*, 1997). Menurut Kaczowka *et al* (2004), enzim *pyruvate decarboxylase* yang disandikan oleh gen *pdc* dari *Zymomonas mobilis* berupa homotetramer dengan berat molekul 240 kDa dan enzim serupa yang berasal dari yeast berbentuk heterotetramer ternyata juga memiliki berat molekul yang sama.

#### 4. Mikroorganisme

Mikroorganisme adalah organisme kehidupan yang terdiri dari berbagai jasad renik (kebanyakan bersel satu atau uniseluler), memiliki ukuran kecil dalam satuan mikrometer ( $\mu m$ ). Mikroorganisme dapat ditemukan dimana-mana dan sangat berperan dalam semua kehidupan di muka bumi. Dunia mikroorganisme terdiri dari lima kelompok organisme, yaitu: bakteri, protozoa, virus, algae dan cendawan mikroskopis (Purwoko, 2007).

a. Pertumbuhan Mikroorganismen

Menurut Salmah (2004), ada beberapa faktor yang berhubungan dengan daya hidup dan pertumbuhan dari mikroorganismen pada sebuah bahan makanan (faktor intrinsik), diantaranya adalah: kandungan nutrisi, kandungan air, derajat keasaman, kandungan oksigen, struktur biologi, kandungan antimikrobia. Sedangkan faktor ekstrinsik yang berpengaruh terutama yang berkaitan dengan lingkungan tempat bahan makanan tersebut disimpan, yaitu suhu, kelembaban relatif, dan kandungan gas yang ada disekitar bahan makanan.

Dalam sebuah kelompok, mikroorganismen dapat tumbuh pada kisaran temperatur yang cukup luas. Namun jumlah dan jenisnya sangat berkaitan dengan suhu lingkungan dimana dia berada. Menurut Manglayang (2006), secara umum, berdasarkan suhu, mikroorganismen dapat dibedakan menjadi 4 jenis utama:

- 1). *Mikroorganismen Psycrophillic*, tumbuh optimum pada suhu antara 20°C-30°C. Masih dapat tumbuh pada suhu dibawah 7°C. Dibagi dua kelompok lagi, *Obligate Psycrophillic* (0-15° C) dan *Facultative Psycrophillic* (0- 40°C). Pada umumnya organismen inilah yang bertanggung jawab terhadap pembusukan dalam suhu ruang pendingin.
- 2). *Mikroorganismen Mesophillic*, tumbuh optimum pada suhu 30°C-40°C. Mikroorganismen mesofilik cenderung tidak tumbuh pada suhu dalam ruang pendingin (*Refrigerator*).
- 3). *Mikroorganismen Thermophillic*, tumbuh optimum pada suhu 55°C-65° C.

4). *Mikroorganisme Hyperthermophilic*, yang hidup dengan baik pada suhu sangat tinggi (sampai 110°C bahkan dalam percobaan, ada yang tahan pada suhu 130°C selama 2 jam).

b. Mikroorganisme dan Industri

Menurut Pelczar dan Chan (1988), dilihat dari sudut perindustrian, mikroorganisme merupakan pabrik zat kimia yang mampu melakukan perubahan yang dikehendaki. Mikroorganisme merombak bahan mentah (beberapa komponen dari medium tempat tumbuhnya dan yang dapat dianggap sebagai suatu substrat) dan mengubah bahan mentah menjadi suatu produk baru. Maka dapat digambarkan reaksi umum sebagai berikut:



Beberapa keuntungan dari pemanfaatan bakteri sebagai inang dalam teknik DNA rekombinan khususnya untuk keperluan produksi asetaldehida dalam kegiatan industri antara lain: (1) Bakteri memiliki ukuran kecil dan rasio permukaan terhadap volume besar, sehingga memungkinkan penyerapan bahan makanan (substrat) dalam jumlah banyak dan cepat serta berakibat laju reaksi metabolik menjadi cepat, (2) Berdasarkan keanekaragaman aktivitas biologis mikroba terhadap makanan, memungkinkan mikroba dapat memakai tidak hanya satu jenis bahan makanan. Hal ini terlihat pada pemanfaatan limbah *molase* sebagai pengganti bahan makan, (3) Mudah beradaptasi, (4) Terdapat di alam bebas, (5) Tidak menyebabkan gangguan ekologi lingkungan yang berarti karena bahan kimia yang dipakai relatif sedikit, (6) Indonesia yang merupakan sumber



plasma nutfah yang luas, sehingga memiliki peluang untuk pengembangan bioteknologi (Salmah, 2004).

Mikroorganisme yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Z. palmae* sebagai bakteri sumber gen *pdv* dan *E. coli* sebagai bakteri inang dalam proses kloning dan ekspresi gen *pdv*.

1). *Zymobacter palmae*

Klasifikasi *Z. palmae* menurut Okamoto *et al.*, 1993

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gammaproteobacteria

Ordo : Oceanospirillales

Familia : Halomonadaceae

Genus : *Zymobacter*

Spesies : *Zymobacter palmae*

*Z. palmae* sebagai bakteri etanologenis telah dilaporkan memiliki enzim PDC dalam organisasi tubuhnya. Bakteri tersebut diisolasi dari air buah palem dan menghasilkan etanol sebagai produk utama fermentasi dari berbagai jenis gula heksosa dan sakarida. Kandungan G+C DNA  $55,8 \pm 0,4$  mol% (Okamoto *et al.*, 1993).

## 2). *Escherichia coli*

Klasifikasi *E. coli* menurut Pelczar dan Chan, 1986

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gammaproteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Familia : Enterobacteriaceae

Genus : *Escherichia*

Spesies : *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* adalah salah satu jenis spesies utama bakteri gram negatif. Pada umumnya, bakteri yang ditemukan oleh Theodor Escherich ini hidup pada tinja, dan dapat menyebabkan masalah kesehatan pada manusia, seperti diare, muntaber dan masalah pencernaan lainnya. *E. coli* banyak digunakan dalam teknologi rekayasa genetika. Biasa digunakan sebagai vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu yang diinginkan untuk dikembangkan. *E. coli* dipilih karena pertumbuhannya sangat cepat dan mudah dalam penanganannya (Wikipedia Indonesia, 2007). Menurut Pelczar *et al* (1988), *E. coli* merupakan bakteri gram negatif dengan bentuk batang lurus, berukuran 1,1-1,5 $\mu$ m x 2,0-6,0 $\mu$ m, motil dengan flagellum peritrikus atau nonmotil, tumbuh dengan mudah pada medium nutrisi sederhana. Laktosa difermentasi oleh sebagian besar galur dengan produksi asam dan gas. Kandungan G+C DNA ialah 50-51 mol%.

## 5. Biologi Molekuler

Pada dasarnya, lahirnya berbagai teknik molekuler dalam berbagai bidang kehidupan tidak terlepas dari berbagai penemuan yang mendahului terciptanya teknologi DNA rekombinan seperti: penemuan enzim restriksi yang dapat memotong molekul DNA, enzim ligasi yang dapat menyambung potongan-potongan DNA menjadi satu, serta berbagai proses biokimia lainnya. Penemuan spektakuler tentang teknologi DNA rekombinan serta berbagai aksesorisnya tersebut memungkinkan pengisolasian individual gen untuk dimanipulasi serta dipindahkan dari satu organisme ke organisme lain. Dengan penemuan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), perkembangan biologi molekuler menjadi semakin cepat dan hingga saat ini berbagai teknik yang memanfaatkan teknologi PCR tersebut telah banyak dilahirkan. Mensekuen DNA yang tadinya mengalami serangkaian proses yang panjang dan melelahkan, dengan pengembangan teknik sekuensing menggunakan metode Sanger dan Maxam-Gilbert, proses semacam itu menjadi lebih disederhanakan dan dipercepat pula dengan bantuan komputer (Muladno, 2002).

Menurut Mizawarti (2003), kloning merupakan suatu prosedur untuk memperoleh replika yang dapat sama dari sel atau organisme tunggal. Kloning dilakukan dengan mentransformasikan atau memasukkan fragmen DNA rekombinan dari penggabungan fragmen DNA dengan vektor, biasanya adalah plasmid, ke dalam sel kompeten atau sel bakteri. Menurut Richana dan Thontowi (2005), sel bakteri yang banyak digunakan sebagai sel kompeten dalam kloning adalah *E. coli* DH5 $\alpha$  yang merupakan salah satu jenis *E. coli* yang telah

mengalami rekayasa sehingga mampu mengenali gen *bla* ( $\beta$ -laktamase) sebagai penanda resistensi ampisilin.

Menurut Sitepoe (2001), ada beberapa prosedur yang harus dilakukan dalam melakukan kloning DNA, yaitu:

- a. Memurnikan DNA: menghancurkan atau melisis semua sel yang mengandung gen yang ditargetkan kemudian dipisahkan dengan melakukan sentrifugasi pada kecepatan tinggi dan ditambah dengan bahan kimia tertentu sehingga diperoleh DNA yang murni.
- b. Memecah DNA: molekul DNA yang besar dipecah dengan menggunakan gelombang ultra, sehingga akan dihasilkan fragmen random. Dengan menggunakan enzim yang khusus bagi fragmen DNA tersebut, maka akan diperoleh DNA intermolekuler dan intramolekuler.
- c. Memindahkan gen: transfer DNA ke bakteri yang hidup dapat dilakukan dengan beberapa cara. Antara lain: (1) mengintegrasikan DNA asing dengan kromosom menjadi genom (2) gen asing dapat dikembangkan sebagai bagian otonom molekul DNA yang disebut sebagai vektor. Pencangkakan gen dapat menggunakan dua jenis vektor berupa plasmid dan bakteriofag.
- d. Seleksi DNA baru yang diperoleh dari ciri klon rekombinan.

Perkembangan teknik molekuler yang sedemikian pesat pada tiga dasawarsa terakhir memberikan peluang yang besar bagi dikembangkannya teknik deteksi yang sensitif dan spesifik serta dapat dilakukan dalam waktu singkat.

Pendekatan molekuler pada berbagai bidang penelitian semakin dipermudah dengan ditemukannya metode PCR untuk mengamplifikasi DNA. Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA (Darmono dkk., 2006 dan Yuwono, 2006).

Analisis PCR merupakan metode deteksi secara cepat untuk mengetahui keberadaan gen yang diintroduksi ke dalam suatu plasmid untuk selanjutnya ke dalam sel kompeten. Pada analisis ini digunakan sepasang primer spesifik untuk mengamplifikasi daerah spesifik dari gen tersebut (Sisharmini dkk., 2004). Menurut Prijanto (1992), pada dasarnya PCR meliputi tiga perlakuan yaitu: denaturasi, hibridisasi dari primer sekuen DNA terhadap *DNA template*, diikuti dengan perbanyakan bagian tersebut oleh *taq polymerase*. Semua dikerjakan dengan mengadakan campuran reaksi dalam tabung mikro yang kemudian diletakkan pada blok pemanas yang telah diprogram pada seri temperatur yang diinginkan. Kelebihan teknik PCR adalah bahwa hal-hal seperti inokulum yang cukup dan persyaratan lain seperti halnya dalam sistem kultur tidak diperlukan lagi. Inokulum dari PCR antara lain adalah primer spesifik dari target sekuen dan tidak semua genom harus ada.

Ada beberapa faktor yang turut menentukan perkembangan teknologi DNA rekombinan adalah teknik memotong dan menyambung DNA secara *in*

*vitro*, sehingga memungkinkan untuk memasukkan DNA asing yang berasal dari organisme lain pada *host*. DNA asing ini dapat diwariskan sehingga didapatkan klon *E. coli* rekombinan. Teknologi ini menjadi dasar pembuatan jutaan klon *E. coli* yang berisi pecahan fragmen DNA untuk proyek genom manusia dan ribuan klon untuk proyek genom mikroba (Heliyanti, 2005). Selain itu, satu dari terobosan utama dalam genetika molekuler adalah perkembangan metode sekuensing potongan DNA secara cepat dan tepat. Pada dasarnya ada dua metode yang telah dikembangkan yaitu, metode Maxam-Gilbert yang didasarkan atas pemotongan DNA di daerah spesifik oleh zat-zat kimiawi selain enzim. Tidak seperti pada metode sebelumnya, metode Sanger menggunakan pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu (Stansfield *et al.*, 2002).

Eksresi gen merupakan proses transformasi informasi genetik melalui transkripsi dan translasi, untuk pembentukan protein atau enzim. Karena protein dan enzim sangat berperan dalam menjalankan metabolisme maka ekspresi gen sebenarnya merupakan proses pengendalian metabolisme oleh gen (Jusuf, 2003). Organisme menyesuaikan dirinya terhadap perubahan lingkungan dengan mengubah ekspresi gen. Proses perubahan ekspresi gen meliputi interaksi protein pengikat yang spesifik dengan berbagai *region* DNA di sekitar tempat awal transkripsi. Ekspresi informasi genetik harus diatur selama proses ontogenik dan diferensiasi organisme tersebut serta komponen-komponen selulernya. Lebih lanjut, agar organisme tersebut dapat beradaptasi dengan lingkungannya dan

menyimpan energi serta nutrien, ekspresi genetik harus responsif terhadap sinyal ekstrinsik (Granner, 1996).

Manifestasi ekspresi gen adalah fenotipe yang dapat kita amati dari suatu genotipe organisme. Menurun atau meningkatnya ekspresi suatu gen dari organisme akan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dimana organisme tersebut berada dan oleh perkembangan dari organisme tersebut. Faktor lingkungan yang berpengaruh pada ekspresi gen antara lain akibat adanya infeksi patogen atau berbagai faktor abiotik seperti: cahaya, suhu, keberadaan oksigen, kekeringan, kelebihan atau kekurangan nutrisi (Siregar, 2002).

Menurut Old dan Primrose (2003), persyaratan pertama untuk adanya ekspresi pada *E. coli* dari suatu gen struktural yang disisipkan secara *in vitro* ke dalam suatu molekul DNA adalah bahwa gen itu diletakkan di bawah kendali suatu promotor *E. coli*. Uji yang dapat digunakan untuk menunjukkan bahwa ekspresi dari suatu gen terklon di bawah kendali dari promotor *E. coli* adalah: (1) ekspresi dari gen asing harus diperoleh apabila diletakkan dalam orientasi yang benar relatif terhadap promotor tetapi tidak terekspresi apabila orientasinya salah, (2) ekspresi gen harus diperkuat oleh kondisi lingkungan yang secara normal menyebabkan aktivasi promotor, yaitu misalnya penambahan suatu penginduksi seperti IPTG untuk ekspresi vektor berdasarkan *lac* atau tidak diberikannya triptofan pada vektor-vektor berdasarkan *-trp*.

Protein merupakan makromolekul yang tersusun dari sejumlah asam amino dan dihubungkan oleh ikatan peptida. Protein terdapat dalam semua sel hidup yang berfungsi sebagai pembangun struktur, biokatalis, hormon, sumber

energi, penyangga racun, pengatur pH dan pembawa sifat turunan. Protein adalah pusat kegiatan dalam berbagai proses biologis, sehingga ketersediaan protein sangat diperlukan oleh seluruh organisme (Wijaya dan Rohman, 2001).

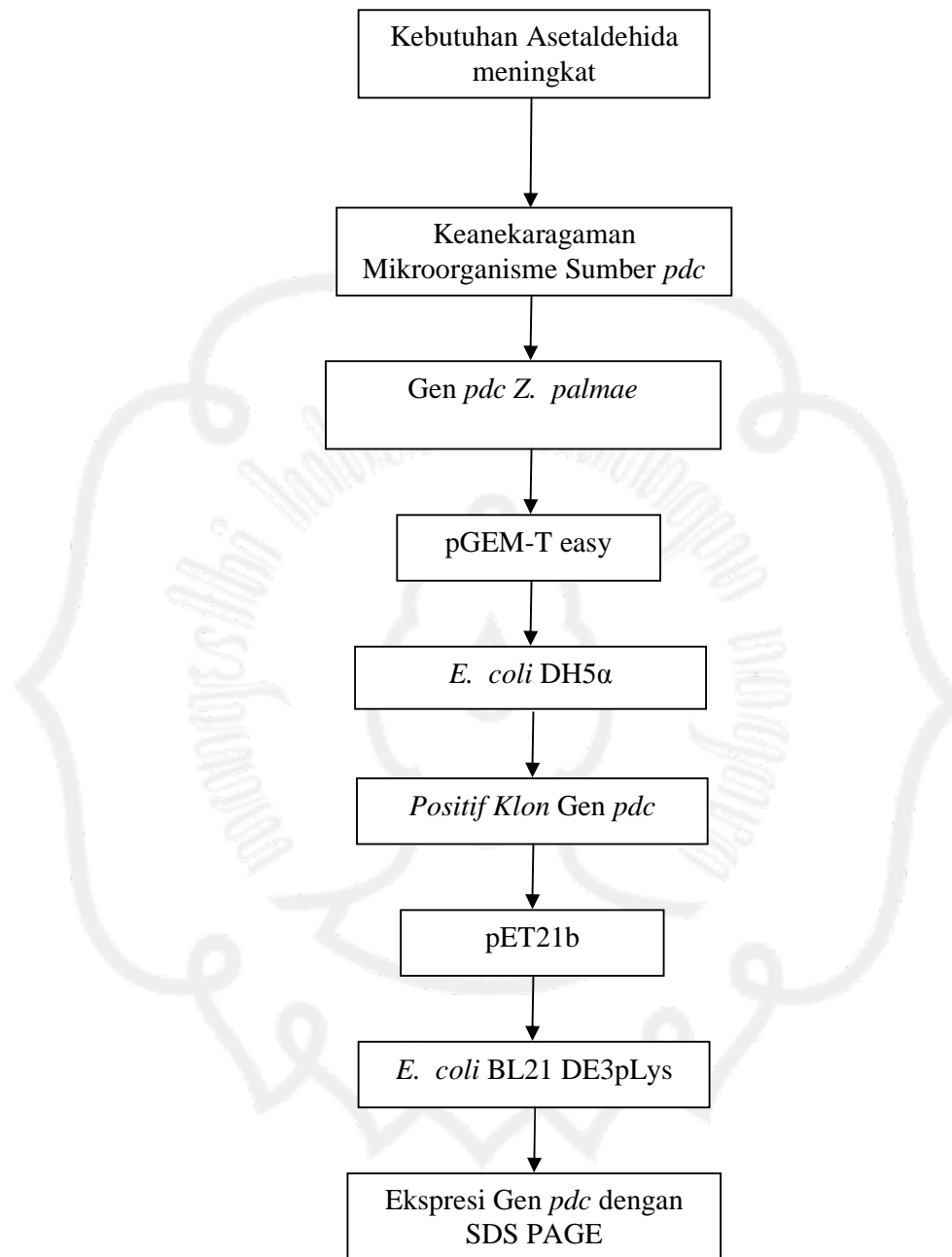
## B. Kerangka Pemikiran

Jumlah penduduk Indonesia yang terus mengalami peningkatan setiap tahun menyebabkan peningkatan kebutuhan asetaldehida sebagai bahan baku produksi untuk keperluan industri. Produksi asetaldehida dengan metode konvensional memerlukan biaya mahal dan secara kuantitas belum cukup untuk memenuhi kebutuhan di Indonesia. Teknik DNA rekombinan dengan insersi gen *pdc* ke dalam suatu vektor diharapkan dapat digunakan sebagai teknologi alternatif dalam produksi asetaldehida dengan memanfaatkan potensi limbah biomassa dan keanekaragaman mikroorganisme sumber gen *pdc* mengingat Indonesia adalah sebagai sumber plasma nutfah yang luas.

Gen *pdc* yang menyandikan enzim *pyruvate decarboxylase* diketahui mampu merubah glukosa menjadi asetaldehida dengan bantuan metabolisme mikroorganisme melalui proses fermentasi. Penelitian ini akan menggunakan *Z. palmae* sebagai bakteri sumber gen *pdc*. Teknik DNA rekombinan dilakukan dengan mengkloning gen *pdc* yang diinsersikan ke dalam vektor plasmid pGEM-T easy dan ditransformasikan ke dalam bakteri inang *E. coli* DH5 $\alpha$ . Selanjutnya proses ekspresi gen *pdc* dengan SDS PAGE akan dilakukan dengan menginsersikan gen *pdc* ke dalam vektor plasmid pET21b dan ditransformasikan ke dalam bakteri inang *E. coli* BL21 DE3pLys.



Kerangka pemikiran dari penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Kerangka Pemikiran Penelitian Kloning dan Ekspresi Gen *pdc*

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan dari bulan Desember 2007-Juli 2008 di Laboratorium CBRG (*Carbohydrate and Bioengineering Research Group*) Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Bogor, Jawa Barat.

##### B. Bahan dan Alat

###### 1. Bahan

Media MYE (*Maltose-Yeast Extract*) sebagai media tumbuh *Z. palmae*, Media LB (*Luria Bertani*) sebagai media tumbuh *E. coli* DH5 $\alpha$  dan *E. coli* XL-1Blue, Media 2XYT sebagai media tumbuh *E. coli* BL21 DE3pLys, *Z. palmae* sebagai bakteri sumber gen *pdv*, *E. coli* DH5 $\alpha$  sebagai bakteri *host* dalam kloning gen *pdv* dan *E. coli* BL21star sebagai bakteri *host* dalam ekspresi gen *pdv*, Bufer Tris EDTA, Bufer TAE (Tris Asetat EDTA), Bufer TBE (Tris Borat EDTA), *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas), EtOH 70% dan 96%, Enzim RNase (Fermentas), Kertas Parafilm, *Lambda DNA/HindIII Marker* (Fermentas), Akuades, *Loading Dye* (Fermentas), Gel Agarosa (SeaKem), EtBr (*Ethidium Bromide*), Film Polaroid (Fuji Film), Primer PCR (Research Biolabs), Enzim *Taq Polymerase* (Fermentas), Bufer *Taq Polymerase* (Fermentas), *dNTPmix* (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), *Gene Ruler 1kb DNA Ladder* (Fermentas), PCR

*Fragment Extraction Kit* (Geneaid), *T4 DNA ligase* (Fermentas), *Solution B* yang akan digunakan dalam proses preparasi sel kompeten, Ampisilin 100 µg/ml, IPTG (*Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) 1000 mM (Fermentas), *X-Gal Solution* 50 µg/µl (Fermentas), *Solution I*, *Solution II*, dan *Solution III* yang akan digunakan dalam proses isolasi DNA plasmid, Enzim Restriksi *NdeI* dan *BamHI* (Fermentas) yang akan digunakan dalam proses digesti, Vektor plasmid pGEM-T easy (Promega) yang akan digunakan dalam kloning gen *pdC*, Vektor plasmid pET21b (Novagen) yang akan digunakan dalam ekspresi gen *pdC*, Bufer Laemmli, *Marker* protein 200kDa (Fermentas), CBB (*Coomassie Brilliant Blue*).

## 2. Alat

*Software* Bioinformatika (*BioEdit* versi 7.04, *CLC Free Workbench*, *DNA Calculator* dan *Genamics Expression* versi 1.1), *GenBank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Erlenmeyer 100 ml, 250 ml dan 500 ml (Pyrex), Gelas Ukur 50 ml dan 100 ml (Pyrex), Spatula, Timbangan Analitik (Precisa 310M), *Hot Plate* (Thermolyne), Cawan Petri, Tabung Reaksi (Pyrex), *Autoclave* (All American), Jarum Oose, *Spreader*, *Bunsen Burner*, *Laminar Air Flow* (ESCO), Mikropipet ukuran 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl dan 5000 µl (Gilson Pipetman), Tip Mikropipet ukuran 10 µl, 200 µl, 1000 µl dan 5000 µl (Axygen), Tube ukuran 200 µl dan 1500 µl (Axygen), *Waterbath* (Grant), *Sentrifugator* (Biofuge Fresco), *Vortex* (Fisons), *Timer* (Force), Oven 37°C dan 150°C (Heraeus Instrument), *Gene Amp PCR System* (Perkin Elmer), *Magnetic Stearer*, *Shaking Incubator* (New Brunswick Scientific), pH meter (Eutech), *Vacum Dry* (Savant),

Tusuk Gigi, Lemari Es 4°C (Hitachi) dan -20°C (Jouan), Perangkat Elektroforesis (Mupid eXu), *Gel Doc* 1000 (BIORAD), *SDS-PAGE System*.

### C. Cara Kerja

#### 1. Studi Bioinformatika

Studi Bioinformatika dimulai dengan pencarian sekuen basa nukleotida dan rangkaian asam amino dari bakteri sumber gen *pdc* *Z. palmae* melalui *GenBank Online* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Selain itu dengan menggunakan program BLAST (*Basic Local Allignment Search Tool*) pada *GenBank* tersebut, maka akan diketahui beberapa bakteri yang memiliki gen *pdc* (selain *Z. palmae*) lengkap dengan sekuen basa nukleotida dan rangkaian asam amino, sehingga dapat diketahui tingkat homologi antara bakteri-bakteri yang memiliki gen *pdc*.

#### 2. Desain Primer PCR

Desain primer akan dibuat dari sekuen gen *pdc* *Z. palmae* dengan menggunakan program *Genamics Expression 1.1 (Windows)* dan dikalkulasi dengan *DNA Calculator* untuk mengetahui spesifikasi primer. Program *FastPCR* digunakan untuk memprediksi produk PCR berdasarkan pasangan primer yang telah dibuat desainnya. Menurut Muladno (2002), ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam pembuatan pasangan primer PCR, antara lain: (1) *GC content* mendekati 50%, (2) *Tm (forward primer dan reverse primer)* relatif sama dengan toleransi  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ , (3) Basa G dan C letaknya menyebar, (4) Menghindari

pengulangan GG-CC di depan dan di belakang primer, (5) Panjang primer antara 22-25 basa. Pada penelitian ini akan didesain pasangan primer dengan menambahkan situs pemotongan dari enzim restriksi. Hal ini terkait dengan vektor plasmid yang akan dipakai dalam proses kloning dan ekspresi gen *pdc Z. palmae*, yaitu pGEM-T easy dan pET21b.

### 3. Persiapan

#### a. Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan terhadap bahan dan alat yang akan digunakan dalam penelitian. Metode sterilisasi yang digunakan adalah metode sterilisasi kering dengan menggunakan oven pada suhu 150°C selama 2 jam dan metode sterilisasi basah dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 30 menit.

#### b. Pembuatan Media

##### 1. Media MYE (*Maltosa-Yeast Extract*)

Komposisi media adalah: Maltosa 2% (b/v), Ekstrak yeast 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2% (b/v), NaCl 0,5% (b/v). Media tumbuh untuk *Z. palmae* dibuat pada kondisi pH 6.

##### 2. Media LB (*Luria Bertani*)

Komposisi media adalah: Tripton 1% (b/v), Ekstrak Yeast 0,5% (b/v), NaCl 1% (b/v).

### 3. Media 2XYT

Komposisi media adalah: Tripton 2% (b/v), Ekstrak Yeast 1% (b/v), NaCl 2% (b/v).

Langkah berikutnya adalah sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 30 menit.

#### c. Pemiakan Bakteri

Biakan *Z. palmae* dikultur dalam media MYE dan diinkubasi dalam inkubator shaker 150 rpm pada suhu 26°C selama 16 jam. Biakan *E. coli* dikultur dalam media LB (*Luria Bertani*) dan diinkubasi dalam inkubator shaker 200 rpm pada suhu 37°C selama 16 jam.

### 4. Isolasi Genom

Proses isolasi genom akan dilakukan dengan menggunakan *Genomic DNA Purification Kit* dari Fermentas. Kultur *Z. palmae* sebanyak 1,5 ml dalam media MYE dipindahkan ke dalam *tube* steril dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang. Pelet yang didapatkan dari perlakuan tersebut ditambahkan dengan 200 µl bufer TE, divortek dan *diinverting* hingga homogen. Larutan ditambah 400 µl *lysis solution* dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 600 µl kloroform, *diinverting* 3-5 kali dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.

Fase paling atas (*Upper Aqueous Layer*) diambil dengan menggunakan mikropipet, dipindahkan ke *tube* baru, ditambah 800 µl *presipitation solution*,

diinverting selama 2 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang. Larutan kemudian ditambahkan 100  $\mu$ l NaCl solution, divorteks dan ditambahkan 300  $\mu$ l EtOH 96%.

Larutan diinkubasi selama  $\pm$  2 jam pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang, supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dengan *vacuum dry*. Pelet ditambah 30  $\mu$ l larutan RNase dalam bufer TE (3  $\mu$ l RNase dalam 1 ml TE) dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam.

Hasil isolasi genom dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% dalam bufer TBE.

## 5. Kloning Gen *pdc*

### a. Amplifikasi Sekuen DNA target dengan metode PCR

Amplifikasi sekuen *pdc* akan dilakukan dengan metode PCR menggunakan *Taq DNA Polymerase* dan pasangan primer yang telah didesain melalui studi bioinformatika. Campuran reaksi PCR dibuat dalam volume 50  $\mu$ l dan disesuaikan dengan rekomendasi dari produsen (Fermentas) untuk tujuan optimasi. Komposisinya reaksi berdasarkan petunjuk manual dari Fermentas dan konsentrasi akhir yang akan digunakan adalah sebagai berikut:

<i>dNTPmix</i> 0,2 mM	5,0 $\mu$ l
Bufer <i>Taq DNA Polymerase</i> 1X	5,0 $\mu$ l
<i>Primer forward</i> 0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
<i>Primer reverse</i> 0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 3 mM	6,0 $\mu$ l
<i>Taq DNA Polymerase</i> 1,25 u/50 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
Cetakan DNA 1 ng/ $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	27,75 $\mu$ l

Semua komponen PCR tersebut dicampurkan dalam sebuah *tube* PCR ukuran 200  $\mu$ l dan dilakukan dalam *Laminar Air Flow* untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Proses PCR akan dilakukan dengan kondisi sebagai berikut:

<i>Initial denaturation</i>	94°C	2 menit	
<i>Denaturation</i>	94°C	30 detik	} 30 siklus
<i>Primer Annealing</i>	50-57°C	45 detik	
<i>Extending</i>	72°C	1 menit	
<i>Final extending</i>	72°C	7 menit	

Hasil PCR akan dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% dalam bufer TBE dan *Gene Ruler 1kb DNA Ladder*.

#### b. Purifikasi Produk PCR

Proses purifikasi akan dilakukan dengan menggunakan *PCR Fragment Extraction Kit* dari Geneaid. Produk PCR berupa ekstrak gel agarosa dalam bufer TAE ditambah dengan 500  $\mu$ l *DF buffer* dan dilarutkan dalam *waterbath* pada



suhu 55°C. Selanjutnya, larutan dimasukkan dalam *DF Column + Collection tube*. Proses sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan dari *Collection tube* dan ditambahkan 600 µl *Wash buffer* serta dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan dari *Collection tube* dan dilakukan sentrifugasi dengan kondisi yang sama. *DF Column* dipindahkan dari *Collection tube* ke tube steril dan ditambahkan dengan 30 µl *Elution buffer*. Larutan di dalam *tube* diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.

c. Ligasi Sekuen Gen *pdv* Hasil PCR ke dalam Plasmid pGEM-T easy

Proses ligasi akan dilakukan dengan menggunakan *T4 DNA Ligase* (Fermentas). Komposisi reaksi ligasi berdasarkan petunjuk Buku Manual dari Promega adalah sebagai berikut:

1). Produk PCR

DNA produk PCR	3 µl
pGEM-T easy	1 µl
<i>T4 DNA Ligase</i>	1 µl
<i>Rapid buffer ligase 2X</i>	5 µl

————— +

10 µl

## 2). Kontrol

Kontrol (dari pGEM-T Easy)	2 $\mu$ l
pGEM-T Easy	1 $\mu$ l
<i>T4 DNA Ligase</i>	1 $\mu$ l
<i>Rapid buffer ligase 2X</i>	5 $\mu$ l
Bufer TE	1 $\mu$ l

————— +  
10 $\mu$ l

Masing-masing reaksi (baik untuk produk PCR maupun kontrol) dimasukkan dalam *tube* 1500  $\mu$ l. Proses pencampuran dilakukan dalam *Laminar Air Flow*. Setelah semua larutan berada dalam kondisi homogen, maka akan dilakukan inkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam.

d. Transformasi Plasmid Rekombinan ke dalam Bakteri Inang *E. coli* DH5 $\alpha$

Langkah ini dimulai dengan preparasi sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$  dengan metode CaCl<sub>2</sub>. Rekulturasasi dilakukan terhadap 500  $\mu$ l isolat *E. coli* DH5 $\alpha$  ke dalam 50 ml media LB dan diinkubasi dalam *shaker* 200 rpm selama  $\pm$  4 jam pada suhu 37°C hingga OD mencapai 0,6-1,0. Kultur dipindahkan ke dalam tabung sorvall dan dilakukan sentrifugasi I berkecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan *Solution B* sebanyak 20 ml ke dalam tabung sorvall. Inkubasi di dalam es selama 30 menit dilakukan setelah pelet dan *Solution B* berada dalam keadaan homogen. Sentrifugasi II

dilakukan dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan *Solution B* sebanyak 2 ml. Sel kompeten diinkubasi dalam es selama 15 menit dan dapat digunakan dalam proses transformasi.

Transformasi akan dilakukan dengan metode *Heat Shock* menurut Sambrook *et al* (2001). Prosedur kerjanya sebagai berikut: *Ligation mix* (baik untuk produk PCR maupun kontrol) sebanyak 10 µl ditambah dengan sel kompeten *E. coli* DH5α sebanyak 150 µl dimasukkan dalam *tube* steril 1500 µl dan dilakukan proses inkubasi selama 30 menit dalam es. *Heat Shock* dilakukan pada suhu 42°C dalam *waterbath* selama 90 detik dan diinkubasi dalam es selama 2 menit. Media LB (*Luria Bertani*) sebanyak 840 µl ditambahkan ke dalam campuran dan dilakukan inkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam pada suhu 37°C. Transforman dipindah ke dalam media LB (*Luria Bertani*) padat yang telah diberi antibiotik ampisilin, IPTG dan *X-gal solution*. Proses inkubasi akan dilakukan selama 16 jam pada suhu 37°C.

e. Isolasi Plasmid dari Bakteri Rekombinan *E. coli* DH5α

Persiapan dilakukan dengan mengisolasi koloni tunggal yang berwarna putih dari bakteri rekombinan *E. coli* DH5α pada medium LB + ampisilin menggunakan metode *toothpick*. Koloni tunggal diambil dengan menggunakan tusuk gigi dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium LB (*Luria Bertani*) cair sebanyak 3 ml + ampisilin. Inkubasi akan dilakukan dengan menggunakan *shaker* kecepatan 200 rpm selama 16 jam pada suhu 37°C.

Proses isolasi plasmid dimulai dengan melakukan sentrifugasi kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit terhadap kultur bakteri yang telah dipindahkan ke dalam *tube* 1500 µl steril hingga didapatkan pelet pada dasar *tube*. Pelet ditambah dengan *Solution I* sebanyak 100 µl, *vortex* hingga homogen dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Larutan ditambah dengan *Solution II* sebanyak 200 µl, *inverting* hingga larutan jernih dan terbentuk fase gel. Larutan diinkubasi dalam es selama 5 menit dan ditambah dengan *Solution III* sebanyak 150 µl, *inverting* hingga terbentuk endapan putih dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke *tube* steril 1500 µl dan ditambah etanol 96% sebanyak 900 µl. Larutan divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dikeringkan dan ditambah dengan etanol 70% (dingin) sebanyak 1 ml. Larutan divortex hingga endapan lepas dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet yang diperoleh dikeringkan dengan *vacum dry* dan dilarutkan dengan 30 µl larutan RNase dalam bufer TE serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

- f. Digesti Ganda Enzim Restriksi terhadap isolat DNA plasmid pGEM-T easy.

Proses ini dilakukan dengan menggunakan enzim *NdeI* dan *BamHI* dari Fermentas. Komposisi reaksi yang direkomendasikan dari produsen adalah sebagai berikut:

Digesti I dengan *BamHI*

DNA plasmid	26,0 $\mu$ l
Enzim Restriksi <i>BamHI</i> 5 unit	0,5 $\mu$ l
Bufer <i>BamHI</i> 1X	3,0 $\mu$ l
TE	0,5 $\mu$ l
	————— +
	30,0 $\mu$ l

Digesti II dengan *NdeI*

DNA plasmid	30,0 $\mu$ l
Enzim Restriksi <i>NdeI</i> 5 unit	0,5 $\mu$ l
Bufer <i>NdeI</i> 1X	3,5 $\mu$ l
TE	1,0 $\mu$ l
	————— +
	35,0 $\mu$ l

Hasil digesti ganda dengan kedua enzim restriksi tersebut dianalisis dengan gel agarosa 0,8% dalam bufer TAE dan dipurifikasi dengan menggunakan *DNA Fragment Purification Kit*.

## 6. Uji Ekspresi Gen

### a. Isolasi DNA plasmid pET21b dari *E. coli* XL-1Blue

Persiapan dilakukan dengan menumbuhkan bakteri rekombinan *E. coli* XL-1Blue yang diketahui telah mengandung vektor plasmid pET21b ke dalam media LB + ampisilin. Kultur tersebut diinkubasi dalam *shaker* 200 rpm selama 16 jam pada suhu 37°C. Proses isolasi plasmid dimulai dengan melakukan sentrifugasi kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit terhadap kultur bakteri yang telah dipindahkan ke dalam *tube* 1500 µl steril hingga didapatkan pelet pada dasar *tube*. Pellet ditambah dengan *Solution I* sebanyak 100 µl, *vortex* hingga homogen dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Larutan ditambah dengan *Solution II* sebanyak 200 µl, *inverting* hingga larutan jernih dan terbentuk fase gel. Larutan diinkubasi dalam es selama 5 menit dan ditambah dengan *Solution III* sebanyak 150 µl, *inverting* hingga terbentuk endapan putih dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke *tube* steril 1500 µl dan ditambah etanol 96% sebanyak 900 µl. Larutan *divortex* hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dikeringkan dan ditambah dengan etanol 70% (dingin) sebanyak 1 ml. Larutan *divortex* hingga endapan lepas dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet yang diperoleh

dikeringkan dengan *vacum dry* dan dilarutkan dengan 30  $\mu$ l larutan RNase dalam bufer TE serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

b. Digesti Ganda Enzim Restriksi terhadap isolat DNA plasmid pET21b

Proses digesti ganda dilakukan dengan menggunakan enzim *NdeI* dan *BamHI* dengan komposisi reaksi sebagai berikut:

Digesti I dengan *BamHI*

DNA plasmid	26,0 $\mu$ l
Enzim Restriksi <i>BamHI</i> 5 unit	0,5 $\mu$ l
Bufer <i>BamHI</i> 1X	3,0 $\mu$ l
TE	0,5 $\mu$ l
	————— +
	30,0 $\mu$ l

Digesti II dengan *NdeI*

DNA plasmid	30,0 $\mu$ l
Enzim Restriksi <i>NdeI</i> 5 unit	0,5 $\mu$ l
Bufer <i>NdeI</i> 1X	3,5 $\mu$ l
TE	1,0 $\mu$ l
	————— +
	35,0 $\mu$ l

Hasil digesti ganda dengan kedua enzim restriksi tersebut dianalisis dengan gel agarosa 0,8% dalam bufer TAE dan dipurifikasi dengan menggunakan *DNA Fragment Purification Kit*.

c. Ligasi Sekuen Gen *pdv* ke dalam Plasmid pET21b

Proses ligasi akan dilakukan dengan menggunakan *T4 DNA Ligase* dari Fermentas. Komposisi reaksi ligasi untuk volume 20 $\mu$ l sebagai berikut:

DNA produk PCR	2,5 $\mu$ l
pET-21	7,0 $\mu$ l
T4 DNA Ligase 2 unit	2,0 $\mu$ l
<i>Rapid Buffer Ligase</i> 1X	2,0 $\mu$ l
TE	6,5 $\mu$ l

————— +  
20  $\mu$ l

Campuran dimasukkan dalam *tube* 1500  $\mu$ l. Proses pencampuran dilakukan dalam *Laminar Air Flow*. Setelah semua larutan berada dalam kondisi homogen, maka akan dilakukan inkubasi pada suhu 22°C selama 24 jam.

d. Transformasi Plasmid Rekombinan ke dalam Bakteri Inang *E. coli* BL21 DE3pLys.

Langkah ini dimulai dengan preparasi sel kompeten *E. coli* BL21 DE3pLys dengan metode CaCl<sub>2</sub>. Rekulturisasi dilakukan terhadap 500  $\mu$ l isolat *E. coli* BL21 DE3pLys ke dalam 50 ml media LB dan diinkubasi dalam *shaker* 200 rpm selama  $\pm$  4 jam pada suhu 37°C hingga OD mencapai 0,6-1,0. Kultur dipindahkan ke dalam tabung sorvall dan dilakukan sentrifugasi I berkecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan *Solution B* sebanyak 20 ml ke dalam tabung sorvall. Inkubasi di dalam es selama



30 menit dilakukan setelah pelet dan *Solution B* berada dalam keadaan homogen. Sentrifugasi II dilakukan dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan *Solution B* sebanyak 2 ml. Sel kompeten diinkubasi dalam es selama 15 menit dan dapat digunakan dalam proses transformasi.

Proses transformasi akan dilakukan dengan metode *Heat Shock* menurut Sambrook *et al* (2001). Prosedur kerjanya sebagai berikut: *Ligation mix* (baik untuk produk PCR maupun kontrol) sebanyak 20 µl ditambah dengan sel kompeten *E. coli* BL21 DE3pLys sebanyak 150 µl dimasukkan dalam *tube* steril 1500 µl dan dilakukan proses inkubasi selama 30 menit dalam es. *Heat Shock* dilakukan pada suhu 42°C dalam *waterbath* selama 90 detik dan secara cepat langsung diinkubasi dalam es selama 2 menit. Media LB (*Luria Bertani*) sebanyak 830 µl ditambahkan ke dalam campuran dan dilakukan inkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam pada suhu 37°C. Transforman dipindah ke dalam media LB (*Luria Bertani*) padat yang telah diberi antibiotik ampisilin, IPTG dan *X-gal solution*. Proses inkubasi terhadap transforman akan dilakukan selama 16 jam pada suhu 37°C.

e. Isolasi Plasmid dari Bakteri Rekombinan *E. coli* BL21 DE3pLys

Persiapan dilakukan dengan mengisolasi koloni tunggal dari bakteri rekombinan *E. coli* BL21 DE3pLys pada medium LB + ampisilin menggunakan metode *toothpick*. Koloni tunggal diambil dengan menggunakan tusuk gigi dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium LB (*Luria Bertani*) cair

sebanyak 3 ml + ampisilin. Inkubasi akan dilakukan dengan menggunakan *shaker* kecepatan 200 rpm selama 16 jam pada suhu 37°C.

Proses isolasi plasmid dimulai dengan melakukan sentrifugasi kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit terhadap kultur bakteri yang telah dipindahkan ke dalam *tube* 1500 µl steril hingga didapatkan pelet pada dasar *tube*. Pelet ditambah dengan *Solution I* sebanyak 100 µl, *vortex* hingga homogen dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Larutan ditambah dengan *Solution II* sebanyak 200 µl, *inverting* hingga larutan jernih dan terbentuk fase gel. Larutan diinkubasi dalam es selama 5 menit dan ditambah dengan *Solution III* sebanyak 150 µl, *inverting* hingga terbentuk endapan putih dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke *tube* steril 1500 µl dan ditambah etanol 96% sebanyak 900 µl. Larutan divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dikeringkan dan ditambah dengan etanol 70% (dingin) sebanyak 1 ml. Larutan divortex hingga endapan lepas dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet yang diperoleh dikeringkan dengan *vacum dry* dan dilarutkan dengan 30 µl larutan RNase dalam bufer TE serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

## f. Digesti Ganda pET21b rekombinan dengan Enzim Restriksi

Proses ini dilakukan dengan menggunakan *NdeI* dan *BamHI* dari Fermentas. Komposisi reaksi yang direkomendasikan dari produsen untuk volume 10  $\mu$ l adalah sebagai berikut:

1). Sampel yang dipotong dengan *BamHI*

DNA Sampel (Hasil Isolasi Plasmid)	4,0 $\mu$ l
Enzim Restriksi <i>BamHI</i> 5 unit	0,5 $\mu$ l
Bufer <i>BamHI</i> 1X	0,5 $\mu$ l
	————— +
	5,0 $\mu$ l

2). Sampel yang dipotong dengan *NdeI*

DNA Sampel (Hasil Isolasi Plasmid)	5,0 $\mu$ l
Enzim Restriksi <i>NdeI</i> 5 unit	0,5 $\mu$ l
Bufer <i>NdeI</i> 1X	1,0 $\mu$ l
Bufer TE	3,5 $\mu$ l
	————— +
	10,0 $\mu$ l

Campuran dimasukkan dalam *tube* steril 200  $\mu$ l dan diinkubasi pada *waterbath* 37°C. Analisis hasil isolasi plasmid akan dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% dalam bufer TBE dan *Gene Ruler 1kb DNA Ladder*.

g. Uji Ekspresi Protein dengan SDS-PAGE

Uji ekspresi protein dimulai dengan menumbuhkan kultur *over night* dari positif transforman *E. coli* BL21 DE3pLys pada media LB cair yang mengandung ampisilin (50 µg/ml) dalam inkubator shaker 150 rpm pada suhu 37°C. Setelah pertumbuhan mencapai  $A_{600}$  0,7-0,9 ditambahkan dengan IPTG (*Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) 2 mM untuk menginduksi sintesis protein dan kultur dilanjutkan selama 5 jam. Sel *E. coli* BL21 DE3pLys dipanen dengan melakukan sentrifugasi 4000 rpm, 4°C selama 10 menit.

Ekstraksi protein dilakukan dengan menambahkan bufer lisis 8 M urea, 0.1 M Na-fosfat, 0.01 M Tris-HCl (pH 8) pada sel *E. coli* BL21 DE3pLys. Suspensi diinverting dan dibiarkan selama 10 menit hingga sel mengalami lisis. Protein rekombinan diperoleh dengan melakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*) dilakukan menurut metoda Laemmli (1970). Protein sebanyak 10 µl dicampur dengan bufer Laemmli dan dipanaskan sampai 95°C selama 3 menit atau diinkubasi pada *waterbath* 37°C selama 10 menit. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *marker* berupa protein dengan berat molekul pada kisaran 14,5-200 kDa. Larutan dimasukkan ke dalam sumuran gel dan setelah proses elektroforesis selesai, protein diwarnai menggunakan cat pewarna CBB (*Coomassie Brilliant Blue*).

## 7. Sekuensing

Sampel hasil isolasi plasmid pGEM T-easy + *pdC* yang telah dipurifikasi akan dikirim ke Macrogen Korea untuk dilakukan proses *sequencing*. Data yang diperoleh akan dibandingkan dengan sekuen gen *pdC* *Z. palmae* yang tersimpan dalam *GenBank* NCBI untuk dianalisis tingkat homologinya, sehingga dapat dipastikan bahwa gen yang telah dikloning dan diekspresikan adalah *pdC* dari *Z. palmae*.

### D. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif sehingga analisis data dilakukan secara deskriptif berdasarkan hasil elektroforesis dari proses isolasi genom, amplifikasi PCR, isolasi plasmid, uji ekspresi gen dengan SDS-PAGE dan hasil *sequencing* gen *pdC* *Z. palmae*.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Studi Bioinformatika

Studi bioinformatika diawali dengan pencarian sumber gen *pdC* dari beberapa mikroba menggunakan *GenBank Online* NCBI dengan alamat *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Dari Hasil penelusuran pada *GenBank* tersebut telah didapatkan 15 organisme bakteri penghasil *pdC* dan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sumber Mikroba Penghasil Gen *pdC* Penyandi *Pyruvate Decarboxylase*

No	Sumber Mikroba	Panjang (bp)	Kode Akses (NCBI)	% GC
1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1674	AF368435.1	60
2	<i>Azotobacter vinelandii</i>	1797	NZ_AAA03000001.1	67
3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	551	NJ_AAJM01000741.1	34
4	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1665	NC_001988.2	33
5	<i>Crocospaera watsonii</i>	489	NZ_AADV02000001.1	36
6	<i>Frankia</i> sp.	1705	NZ_AAII01000008.1	69
7	<i>Gluconobacter oxydans</i>	1692	NC_006677.1	62
8	<i>Legionella pneumophilla</i>	1680	NC_002942.5	39
9	<i>Mycobacterium avium</i>	1794	NC_002944.2	66
10	<i>Mycoplasma penetrans</i>	1635	NC_004432.1	26
11	<i>Planctomyces maris</i>	1692	NZ_ABCE01000037.1	52
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1791	NC_007492.1	60
13	<i>Sarcina ventriculi</i>	1659	AF354297.1	30
14	<i>Zymobacter palmae</i>	1671	AF474145	53
15	<i>Zymomonas mobilis</i>	1712	NC_006526.1	51

Sumber: *GenBank* NCBI

*A. pasteurianus*, *S. ventriculi*, *Z. palmae* dan *Z. mobilis* merupakan empat spesies bakteri yang paling sering dijadikan objek dalam penelitian tentang *pdC*. Ada beberapa alasan pemilihan *Z. palmae* sebagai bakteri penghasil gen *pdC*

pada penelitian ini, yaitu: (1) Kandungan GC dari *Z. palmae* (53%) memiliki homologi yang tinggi dengan *E. coli* (52%) mengingat bahwa gen *pdc* tersebut akan ditransformasikan ke dalam *E. coli*, (2) Secara fungsional, gen *pdc* *Z. palmae* mampu menghasilkan  $\frac{1}{3}$  protein di *E. coli*. Kondisi tersebut lebih menguntungkan dalam proses produksi enzim PDC jika dibandingkan dengan *Z. mobilis* dan *A. pasteurianus* tergolong rendah (7-9% protein) serta *S. Ventriculi* (< 0,3% protein), (3) PDC dari *Z. palmae* relatif termostabil karena aktivitasnya mencapai 60-100% pasca pemanasan pada suhu 60°C selama 30 menit, (4) PDC *Z. palmae* diketahui berperan penting dalam produksi etanol dengan memanfaatkan ADH (Raj *et al*, 2002).

## B. Desain Primer PCR

Desain primer dibuat dari data sekuen nukleotida gen *pdc* *Z. palmae* yang diperoleh dari GenBank NCBI (Lampiran 1). *Genamics expression*, *FastPCR*, *BioEdit* dan *Oligo Calculator Online* merupakan beberapa program yang digunakan dalam proses desain primer tersebut. Menurut Muladno (2002), desain primer dibuat dengan parameter sebagai berikut: (1) Panjang primer antara 17-28 basa nukleotida, (2) Komposisi basa nukleotida G dan C pada *forward* dan *reverse* berkisar antara 50-60%, (3) Untuk meningkatkan efisiensi primer, ujung 3' sebaiknya diakhiri dengan basa G atau C, atau CG atau GC, (4) Titik leleh ( $T_m$ ) kedua primer sebaiknya antara 55-80°C, (5) Untuk mencegah terjadinya *misspriming* pada daerah yang kaya akan basa G dan C, sebaiknya menghindari tiga atau lebih basa C atau G pada ujung 3' dari primer, (6) Sebaiknya

menghindari suatu primer yang dapat menyebabkan *hairpin*, *dimer* dan *crossdimer*.

Gen *pdv* dari *Z. palmae* memiliki kandungan G dan C yang cukup tinggi, yaitu  $\pm 53.5\%$ . Hal ini memberikan kemudahan dalam menentukan beberapa kandidat primer terkait dengan parameter tersebut. Untuk mendapatkan gen *pdv* secara utuh, maka akan diamplifikasi sekuen gen dengan menambahkan situs pemotongan dari enzim restriksi. Hal tersebut terkait dengan vektor plasmid yang akan dipakai dalam proses kloning dan ekspresi gen, yaitu pGEM-T easy dan pET21b. Desain *primer forward* ditambahkan dengan situs pemotongan dari *NdeI* (*CATATG*) dan *primer reverse* ditambahkan dengan situs pemotongan dari *BamHI* (*CCTAGG*), sedemikian hingga posisi *forward primer* dan *reverse primer* terletak pada daerah kodon awal (ATG) dan kodon akhir (TAA). Pasangan primer tersebut adalah sebagai berikut:

Primer forward : 5'-CCCCATATGTATAACCGTTGG-3'

Primer reverse : 3'-GTTTGGTGTTCGCACCTAGG-5'

Rangkaian basa nukleotida yang dicetak miring merupakan situs pemotongan dari enzim restriksi. Penambahan situs pemotongan enzim restriksi pada pasangan primer tersebut tidak menimbulkan permasalahan yang berarti ketika produk PCR hasil amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer tersebut diligasikan dengan vektor plasmid pGEM-T easy. Hal ini karena pGEM-T easy merupakan vektor yang didesain sedemikian rupa dengan penambahan basa timin pada gugus hidroksil ujung 3' dan akan digunakan dalam proses ligasi



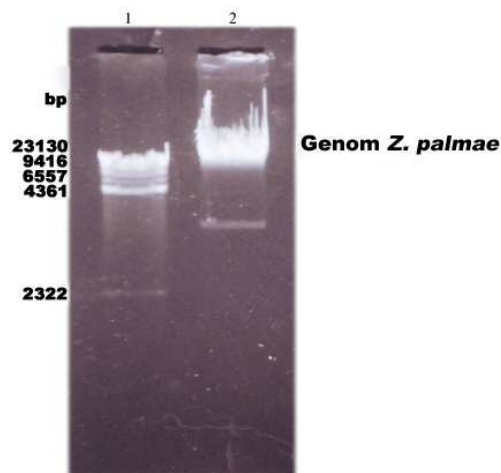
pada produk PCR yang proses amplifikasinya menghasilkan basa adenin pada gugus hidroksil ujung 3'.

Pertimbangan diperlukannya situs pemotongan dari enzim restriksi terhadap pasangan primer dikarenakan produk PCR hasil amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer tersebut akan diligasikan juga ke dalam vektor plasmid pET21b sebagai vektor ekspresi. pET21b merupakan vektor yang didesain sedemikian rupa dengan bentuk *linker*, sehingga antara *insert gene* dengan vektor harus dipotong terlebih dahulu dengan menggunakan enzim restriksi yang sama dengan tujuan agar proses ligasi dapat berlangsung dengan baik. Alasan pemakaian kedua enzim restriksi tersebut yaitu: (1) Kedua enzim tersebut memiliki hasil pemotongan berupa *sticky end*, sehingga diharapkan akan mempermudah proses ligasi ke vektor plasmid pET21b, (2) Kedua enzim restriksi tersebut dipilih karena tidak memotong sekuen gen *pdv* dari *Z. palmae*. Hasil uji *in silico* PCR dengan program *FastPCR* menunjukkan bahwa pasangan primer tersebut spesifik dan dapat digunakan untuk mengamplifikasi sekuen gen *pdv* *Z. palmae*. Prediksi produk PCR secara *in silico* dengan pasangan primer tersebut adalah sekuen nukleotida dengan panjang 1681 bp (Lampiran 2).

### C. Isolasi Genom

Genom merupakan molekul polinukleotida yang terdiri dari adenin, guanin, sitosin dan timin. Polinukleotida tersebut saling memiliki komplementernya yaitu C=G dan A=T (Muhammad dan Hartono, 1987 *dalam* Sumartono dkk, 2006). Proses isolasi genom meliputi penghancuran sel,

pemusnahan protein dan RNA serta pemurnian DNA. Isolasi genom *Z. palmae* dilakukan dengan menggunakan *Genomic Extraction Kit* (Fermentas) dan dilakukan tanpa penambahan lizozim. Hal tersebut karena *Z. palmae* merupakan bakteri gram negatif, sehingga proses lisis dinding selnya lebih mudah dan tidak memerlukan lizozim. Perangkat yang termasuk dalam *kit* tersebut adalah *lysis solution*, *precipitation solution* dan *NaCl solution*. Selain itu juga digunakan kloroform yang berfungsi untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan. Enzim RNase digunakan untuk membersihkan RNA dari larutan, sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Penambahan etanol dan NaCl dalam proses isolasi genom berfungsi untuk memekatkan, mengendapkan dan memisahkan DNA dari larutan. Hasil dari isolasi genom *Z. palmae* disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Isolasi Genom *Z. Palmae*  
Keterangan: 1. *Lambda DNA/HindIII Marker*, 2. Genom *Z. palmae*

Berdasarkan penelusuran pada *GenBank Online* NCBI, ukuran genom total dari *Z. palmae* masih belum ditemukan, sehingga untuk menentukan tingkat keberhasilan dari proses isolasi genom cukup dilihat bahwa telah terbentuk *single band* DNA pada gel agarosa. Selain itu dapat diketahui konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil isolasi genom dengan membandingkan intensitas warna pada pita DNA sampel terhadap intensitas warna pada pita DNA marker. Struktur genom memiliki bentuk supercoil, sehingga memiliki mobilitas yang tinggi pada gel agarosa. Pada gambar di atas juga terdapat pita tipis dan diduga sebagai plasmid yang memiliki ukuran kecil sehingga memiliki mobilitas yang lebih tinggi daripada DNA genom.

Konsentrasi DNA yang akan dijadikan *DNA template* dalam proses PCR diperkirakan dengan membandingkan intensitas pita DNA sampel dengan intensitas pita DNA Lambda *HindIII* Marker yang telah diketahui massanya pada gel elektroforesis. Dengan menghitung perbandingan tersebut, maka diketahui bahwa konsentrasi genom yang didapat adalah sebesar 50 ng.

#### **D. Amplifikasi Gen *pdc* dengan Metode PCR**

PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer yang telah didesain sebelumnya dan telah disintesis oleh *Research Biolabs*. Komponen beserta konsentrasi pereaksi yang digunakan dalam PCR disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 3. Komponen dan Konsentrasi Perekasi PCR

Komponen Perekasi PCR	Konsentrasi Akhir	Volume yang ditambahkan
Akuades deion	-	29,75 $\mu$ l
<i>10 X buffer Taq DNA Polymerase</i>	1 X	5 $\mu$ l
Larutan <i>dNTP mix</i> 2 mM	0,2 mM	5 $\mu$ l
Larutan $MgCl_2$ 25 mM	2,0 mM	4 $\mu$ l
<i>Primer Forward</i> 10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
<i>Primer Reverse</i> 10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
DNA Cetakan	1 ng	1 $\mu$ l
<i>Taq DNA Polymerase</i>	1,25 u/50 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l
Volume Total		50 $\mu$ l

Kondisi PCR yang diberlakukan pada tahap ini adalah sebagai berikut:

Denaturasi awal	94°C	2 menit
Denaturasi	94°C	30 detik
<i>Annealing</i>	47°C	45 detik
Ekstensi	72°C	1 menit
Ekstensi akhir	72°C	7 menit

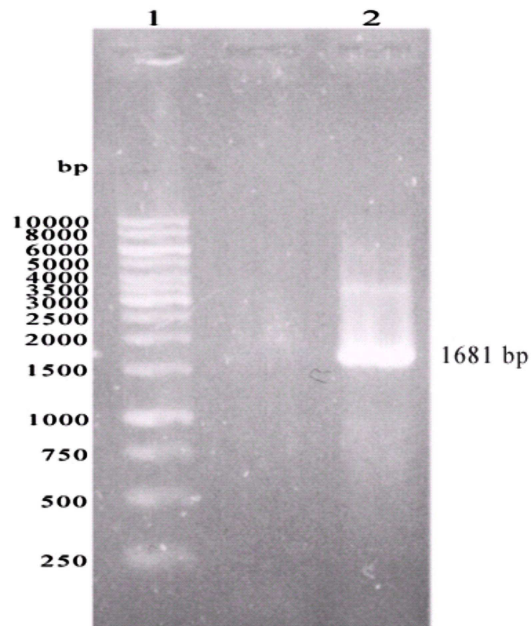
Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dan menggunakan *Taq DNA polymerase* sebagai enzim yang akan mengamplifikasi gen *pdc*. Keunikan yang dimiliki enzim tersebut adalah mampu menambahkan satu nukleotida, terutama dATP pada ujung 3' fragmen DNA hasil polimerisasi meskipun tanpa ada cetaknya. Dengan demikian, ujung fragmen DNA hasil polimerisasi dengan metode PCR pada umumnya akan membentuk ujung lancip (*sticky end*) karena ada tambahan satu nukleotida adenin pada kedua ujungnya. Hal ini mempunyai implikasi penting karena fragmen DNA hasil polimerisasi dengan metode PCR

akan diligasikan dengan vektor plasmid pGEM T-easy yang mempunyai nukleotida timin pada ujung 3' gugus hidroksilnya.

Beberapa karakteristik dari Taq DNA polymerase adalah: (1) berasal dari bakteri *Thermus aquaticus* BM yang merupakan suatu strain yang tidak mempunyai endonuklease restriksi *TaqI*, (2) tersusun atas satu rantai polipeptida dengan berat molekul kurang lebih 95 kD, (3) mempunyai kemampuan polimerisasi DNA yang sangat tinggi, tetapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease 3'→5', (4) aktif pada pH 9 (suhu 20°C) dan suhu aktivitas optimumnya adalah sekitar 75°C-80°C (Yuwono, 2006).

Konsentrasi primer yang dipakai adalah 0,5 µM karena konsentrasi primer yang terlalu tinggi dapat menyebabkan mispriming yang mengakibatkan meningkatnya jumlah produk non spesifik. Namun jika konsentrasi primer terlalu rendah, hasil dari produk PCR akan rendah (Abdullah dan Retnoningrum, 2003). Pemakaian MgCl<sub>2</sub> dengan konsentrasi 2,0 mM terkait dengan aktivitas Taq DNA Polymerase. Lawyer *et al* (1989) menyatakan bahwa aktivitas *Taq DNA Polymerase* dipengaruhi oleh ion magnesium dan akan mencapai maksimal pada konsentrasi 2,0 mM jika konsentrasi dNTP yang digunakan adalah 0,7-0,8 mM. Konsentrasi MgCl<sub>2</sub> yang lebih tinggi dari 2,0 mM akan menghambat aktivitas *Taq DNA Polymerase*.

Hasil amplifikasi gen *pdv* menggunakan *Taq DNA Polymerase* disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Amplifikasi gen *pdc* *Z. Palmae*  
Keterangan: 1. Gene Ruler 1kb DNA Ladder, 2. Gen *pdc* *Z. palmae*

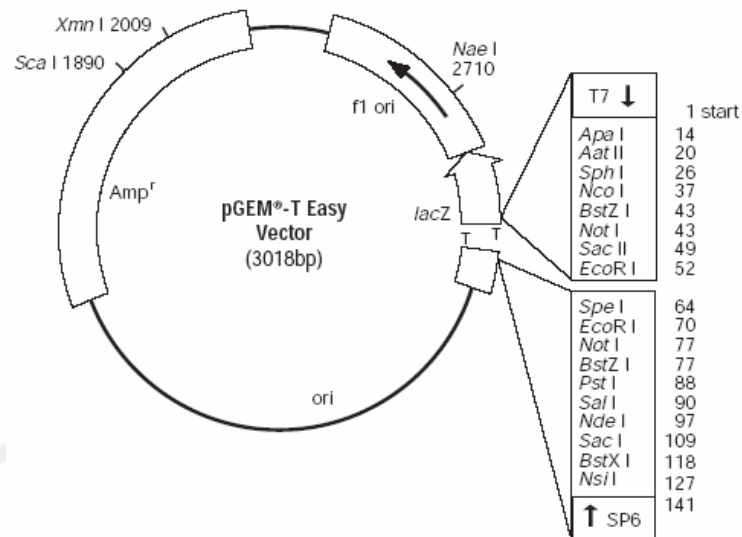
Elektroforesis dengan gel agarosa menunjukkan fragmen yang ukurannya sesuai dengan prediksi PCR *in silico* dengan menggunakan *software* fastPCR. Panjang sekuen hasil amplifikasi adalah 1681 bp. PCR dilakukan dengan menggunakan DNA cetakan hasil isolasi genom *Z. Palmae*. Hasil PCR kemudian dipurifikasi menggunakan *PCR Fragment Extraction Kit* dan dilakukan proses ligasi ke vektor plasmid pGEM-T easy untuk ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## E. Kloning Gen *pdc*

### 1. Ligasi dan Transformasi

Amplikon hasil PCR yang telah dipurifikasi akan diligasikan dengan vektor plasmid pGEM-T easy untuk membentuk plasmid rekombinan dan selanjutnya ditransformasikan ke dalam bakteri inang *E. coli* DH5 $\alpha$  sedemikian rupa sehingga replikasi dapat terjadi pada DNA rekombinan. Ligasi adalah proses penggabungan dua molekul DNA dengan perantara enzim. *T4 DNA ligase* merupakan enzim yang dipakai dalam proses ligasi karena enzim tersebut dapat mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara gugus 3'-hidroksil pada fragmen DNA gen asing dengan gugus 5'-fosfat pada DNA vektor (Purkan, 2003). Pemberian enzim tersebut mampu membentuk kompleks enzim AMP yang selanjutnya terikat pada daerah *nick* (daerah putus). Enzim *ligase* tersebut dihasilkan oleh bakteri *E. coli* yang telah terinfeksi virus T4 (Muladno, 2002). Ligasi dilakukan dengan mencampurkan gen *pdc* *Z. palmae* yang akan diinsersi dengan vektor plasmid pGEM-T easy melalui perbandingan molar 1:1. *Circle map* dari pGEM-T easy disajikan pada Gambar 5.

pGEM-T easy merupakan vektor plasmid yang berbentuk linier dan berukuran 3018 bp. Plasmid tersebut memiliki beberapa kelebihan, yaitu: (1) berukuran kecil, (2) memiliki *ori* yang akan berperan dalam replikasi di *E. coli*, (3) membawa gen *amp<sup>r</sup>* yang membawa sifat resisten terhadap antibiotik ampisilin, (4) memiliki 19 sisi MCS (*Multiple Cloning Site*) yang akan membantu dalam proses konfirmasi terbentuknya DNA rekombinan, (5) membawa gen *lacZ* yang berperan dalam proses seleksi biru putih (Promega, 2001).



Gambar 5. Circle Map pGEM-T easy (Promega, 2001)

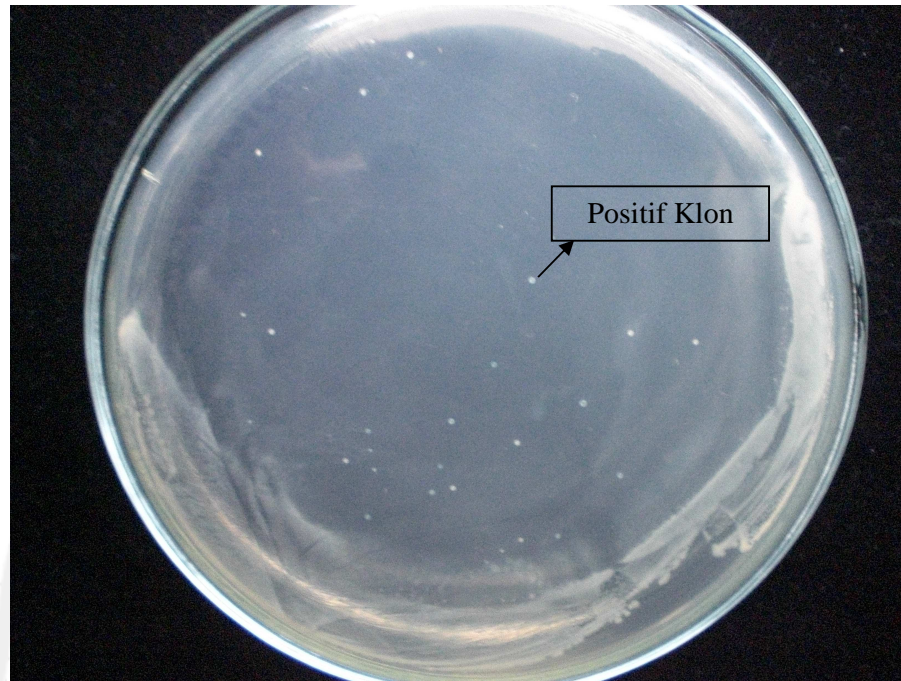
Untuk mengetahui efisiensi ligasi digunakan kontrol positif berupa kontrol DNA dari pGEM-T easy. Sedangkan untuk mengetahui efisiensi transformasi digunakan kontrol transforman berupa vektor plasmid sirkuler yang tidak dipotong dengan enzim restriksi endonuklease. Salah satu keuntungan penggunaan vektor plasmid pGEM-T easy adalah vektor tersebut dapat langsung diligasikan ke DNA target tanpa melalui proses digesti atau penambahan adaptor. pGEM-T easy didesain sedemikian rupa dengan penambahan basa timin pada ujung 3' gugus hidroksil dan akan diaplikasikan pada produk PCR yang menghasilkan basa adenin pada ujung 3' gugus hidroksil. Basa adenin dari produk PCR akan *overhang* dengan basa timin dari vektor plasmid pGEM-T easy. Produk PCR dengan hasil akhir penambahan basa adenin pada ujung 3' gugus hidroksil dapat diperoleh dengan memilih enzim *polymerase* yang tepat. Beberapa enzim



*polymerase* yang menghasilkan basa adenin pada daerah ujung 3' gugus hidroksil adalah *taq polymerase*, Tfl dan Tth (Promega, 2001).

Pemilihan *E. coli* DH5 $\alpha$  sebagai bakteri inang karena bakteri tersebut telah mengalami rekayasa genetika sehingga mampu mengenali gen *bla* yang menyandikan enzim  $\beta$ -laktamase sebagai penanda resistensi terhadap antibiotik ampisilin. Preparasi sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$  dilakukan dengan menggunakan metode CaCl<sub>2</sub>. Hasil penelitian Cohen *et al* (1972) dalam Old dan Primrose (1989) menyatakan bahwa sel *E. coli* yang diperlakukan dengan CaCl<sub>2</sub> merupakan penerima yang efektif bagi DNA plasmid. CaCl<sub>2</sub> akan mempengaruhi dinding sel dan mengikatkan DNA ke permukaan sel. Mandel dan Higa (1970) dalam Old dan Primrose (1989) menyatakan bahwa sel *E. coli* yang diperlakukan dengan CaCl<sub>2</sub> akan dapat mengambil DNA dari bakteriofag dan DNA plasmid. Kedua alasan inilah yang mendasari pemilihan *E. coli* DH5 $\alpha$  sebagai sel inang dalam penelitian. Transformasi dilakukan dengan metode *heat shock*, yaitu dengan melakukan perubahan suhu secara ekstrim. Hal ini karena kejutan panas dan perlakuan dengan CaCl<sub>2</sub> dapat membantu DNA dalam melewati dinding sel bakteri mengingat DNA adalah molekul yang sangat hidrofil, sehingga secara normal DNA tidak dapat melewati dinding sel bakteri. Bakteri hasil transformasi ditumbuhkan selama 16 jam pada suhu 37°C dalam media seleksi LB padat yang telah ditambahkan antibiotik ampisilin, IPTG dan *X-gal solution*.

Produk PCR diligasikan dengan plasmid pGEM-T easy membentuk plasmid rekombinan dan berhasil ditransformasikan ke dalam bakteri inang *E. coli* DH5 $\alpha$ . Hasil transformasinya adalah sebagai berikut:



Gambar 6. Hasil Transformasi Rekombinan *pdc Z. palmae* ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$

Koloni bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  yang mengandung transforman (plasmid rekombinan) diseleksi berdasarkan pembentukan koloni biru-putih. Koloni yang berwarna biru tidak mengandung transforman, sehingga gen *lacZ* yang menyandikan  $\beta$ -galaktosidase masih aktif terekspresi dan mengubah substrat X-gal menjadi biru. Koloni target adalah koloni putih yang mengandung transforman, dimana gen *lacZ* disisipi oleh fragmen *pyruvate decarboxylase* sehingga tidak terekspresi dan menyebabkan koloni tetap berwarna putih.

Koloni bakteri yang mengandung vektor plasmid pGEM-T easy akan berwarna biru karena ada gen *lacZ* yang menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase yang akan memecah X-gal menjadi galaktosa dan 5-bromo-4-chloroindigo yang berwarna biru. Sedangkan bakteri akan berwarna putih bila vektor plasmid pGEM-T easy

telah disisipi oleh DNA asing pada bagian *lacZ*. Dalam hal ini *lacZ* tidak berfungsi karena disisipi oleh DNA asing. Jadi koloni yang mengandung plasmid rekombinan adalah koloni yang berwarna putih.

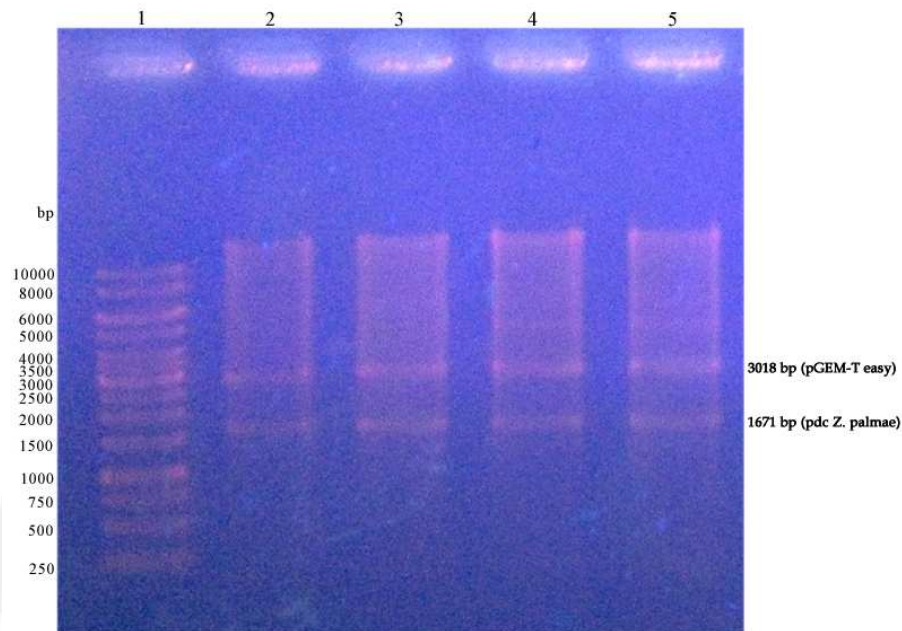
## 2. Isolasi Plasmid Rekombinan (pGEM-T easy + *pdcl*)

Isolasi adalah pemurnian (memisahkan sel bakteri dari cairannya). Seleksi positif klon merupakan suatu usaha yang dilakukan untuk memilih sel yang mengandung plasmid rekombinan dari keseluruhan koloni hasil transformasi. Untuk menyeleksi sel yang mengandung plasmid rekombinan maka dilakukan analisis DNA secara enzimatik (menggunakan enzim restriksi) dan PCR. Plasmid yang mengandung *insert* (sisipan) jika dipotong dengan enzim restriksi yang sesuai maka akan menghasilkan pita DNA pada gel agarosa dengan bobot molekul yang sesuai dengan ukuran *insert gen*. Teknik yang digunakan dalam penelitian ini untuk memecah sel adalah dengan cara kimia biasanya dilakukan dengan suatu senyawa yang merusak dinding sel dan senyawa lain yang merusak membran sel. Untuk pengrusakan dinding sel pada *E. coli* digunakan *Solution I* yang mengandung EDTA dan berfungsi menghilangkan ion magnesium yang penting untuk mempertahankan keseluruhan struktur selubung sel dan menghambat enzim-enzim seluler yang dapat merusak DNA. Selain penambahan EDTA juga perlu ditambahkan SDS (*Sodium Dodesil Sulfat*) untuk membantu proses lisis dengan cara menghilangkan molekul lipid sehingga menyebabkan kerusakan membran sel. Setelah mengalami lisis, langkah terakhir pada preparasi ekstrak adalah menambahkan *Solution III* (NaOAc) yang mampu mengendapkan protein

dan lemak sehingga membentuk gumpalan putih yang tidak larut dalam air. Hal ini memberikan kemudahan dalam proses isolasi DNA plasmid.

Proses lisis memegang peranan penting dalam isolasi plasmid rekombinan. Hal ini karena lisis yang tidak sempurna maupun pelarutan total sel-sel inang menyebabkan sangat berkurangnya jumlah DNA plasmid yang diperoleh sebagai hasil dari isolasi plasmid. Situasi yang ideal terjadi apabila setiap sel itu terpecah secukupnya sehingga memungkinkan DNA plasmid terlepas tanpa terlalu banyak mengkontaminasi DNA kromosom. Jika lisis dilaksanakan dengan hati-hati, sebagian besar DNA kromosom yang dilepaskan akan memiliki berat molekul yang tinggi dan dapat dipisahkan bersama dengan pecahan selnya dengan menggunakan sentrifugasi kecepatan tinggi untuk memperoleh lisat yang bening.

Larutan yang mengandung asam nukleat diambil dengan mikropipet dan diendapkan dengan etanol 96%. Pellet (DNA dan RNA) dibilas dengan etanol 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan tinggi. Endapan kemudian dikeringkan dan dilarutkan dengan larutan Tris EDTA 1X yang mengandung RNase yang bermanfaat untuk mendegradasi RNA dalam larutan sehingga didapatkan DNA plasmid murni. Hasil elektroforesis dari plasmid rekombinan yang dipotong dengan menggunakan *NdeI* dan *BamHI* telah disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Plasmid Rekombinan pGEM-T easy + *pdc* yang telah dipotong dengan menggunakan *NdeI* dan *BamHI*.

Keterangan: 1. *Marker 1 kb DNA Ladder*; 2, 3, 4, 5. Positif Klon

Pasangan primer yang didesain dengan menambahkan situs pemotongan dari enzim restriksi *NdeI* dan *BamHI* menyebabkan fragmen *pdc* yang diligasikan ke dalam vektor plasmid pGEM-T easy akan memiliki situs pemotongan dari kedua enzim tersebut. Hal ini tentu akan mempermudah pemisahan fragmen DNA *pyruvate decarboxylase Z. palmae* dari vektor plasmid pGEM-T easy. Restriksi fragmen *pyruvate decarboxylase* berhasil dilakukan dengan digesti ganda menggunakan enzim *NdeI* dan *BamHI* (Lane 2,3,4 dan 5 Gambar 7). Hal tersebut dapat dilihat dari terbentuknya dua pita spesifik, yaitu pada daerah 3015 bp yang spesifik untuk vektor plasmid pGEM-T easy dan pita pada daerah 1681 bp untuk fragmen *pyruvate decarboxylase*. Dengan hasil tersebut, dapat dikatakan bahwa

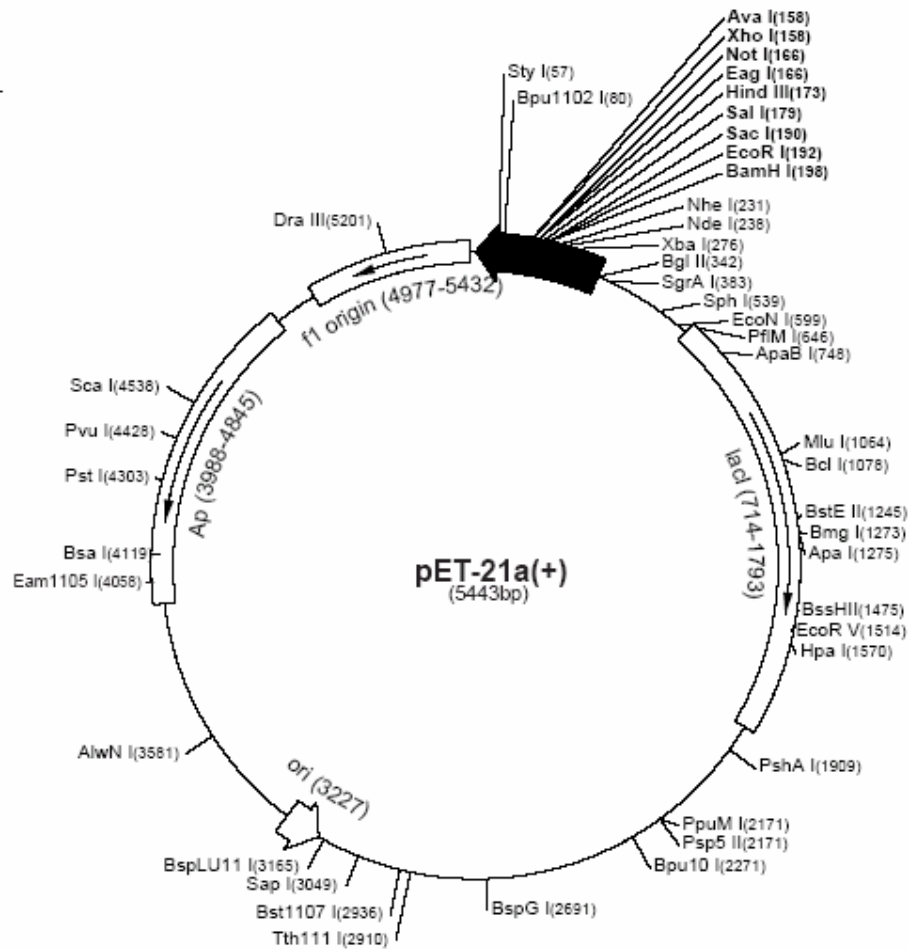
sekuen gen target, yaitu *pdc* berhasil diamplifikasi dan dikloning ke dalam bakteri inang *E. coli* DH5 $\alpha$  dengan menyisipkan gen tersebut ke dalam vektor plasmid pGEM-T easy.

Analisis peta situs pemotongan enzim restriksi pada fragmen *pyruvate decarboxylase* dibuat dengan bantuan program *BioEdit*. Hasil pemetaan enzim restriksi menunjukkan bahwa fragmen *pyruvate decarboxylase* tidak memiliki situs pemotongan yang sama dengan situs pemotongan seperti pada vektor plasmid pGEM-T easy. Perbedaan situs tersebut akan memudahkan pemisahan sisipan fragmen DNA *pyruvate decarboxylase* dari vektor plasmid pGEM-T easy. Peta restriksi sangat bermanfaat untuk menentukan enzim restriksi yang paling tepat untuk pembuatan kontruksi gen dan pustaka genom.

## F. Ekspresi Gen *pdc Z. palmae*

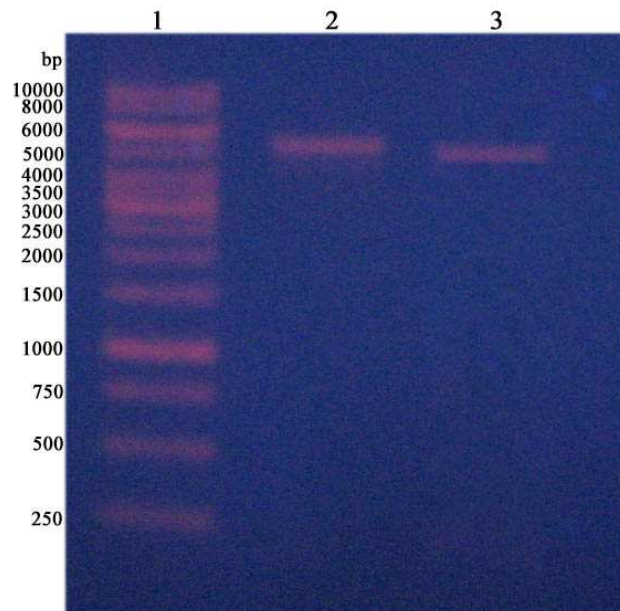
### 1. Ligasi dan Transformasi

Ekspresi gen *pdc Z. palmae* akan dilakukan dengan menggunakan vektor plasmid pET21b yang telah didesain sedemikian rupa sehingga memiliki beberapa situs pemotongan enzim restriksi yang dapat dimanfaatkan dalam menentukan strategi dalam proses ligasi antara gen target dengan plasmid tersebut. Penelitian ini memanfaatkan situs pemotongan dari *NdeI* dan *BamHI* yang ditambahkan dalam sekuen primer PCR untuk mengamplifikasi gen *pdc* sebagai strategi yang digunakan dalam ligasi ke pET21b. *Circle Map* dari vektor plasmid tersebut disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Circle Map pET21 (Novagen, 2006)

Persiapan yang dilakukan sebagai langkah awal dalam proses ligasi adalah menyiapkan vektor plasmid pET21b dari *E. coli* XL-1Blue yang telah dinyatakan sebagai bakteri recombinan yang membawa plasmid tersebut. Vektor plasmid pET21b merupakan vektor yang berbentuk sirkuler. Oleh karena itu, proses ligasi antara gen *pdC* sebagai produk yang akan diekspresikan dengan plasmid pET21b sebagai vektor ekspresi mengharuskan keduanya dipotong dengan menggunakan enzim restriksi yang sama, yaitu *NdeI* dan *BamHI*. Hasil pemotongan terhadap vektor plasmid pET21b disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Hasil Digesti Plasmid pET21b dengan menggunakan Enzim Restriksi *NdeI* dan *BamHI*

Keterangan: 1. *Marker 1 kb DNA Ladder*, 2. pET21b yang telah dipotong dengan *NdeI* dan *BamHI*, 3. pET21b *uncut*

Pada Gambar 9, proses *double digestion* pada vektor plasmid pET21b dengan menggunakan *NdeI* dan *BamHI* hanya menghasilkan satu buah pita yang berukuran  $\pm 5400$  bp. Hal ini karena jarak antara situs pemotongan *NdeI* dengan *BamHI* pada vektor plasmid tersebut hanya terpaut beberapa basa nukleotida, sehingga hasil potongannya tidak dapat terdeteksi pada gel agarosa ketika dianalisis dengan metode elektroforesis menggunakan *Gene Ruller 1kb DNA Ladder*.

Proses ligasi antara vektor plasmid pET21b dan gen *pdc* dilakukan setelah keduanya dipurifikasi menggunakan *PCR Fragment Extraction Kit*. Selanjutnya, ligasi dilakukan dengan perbandingan molar sekuen *insert* gen dengan vektor



plasmid 3:1. Seperti halnya ketika melakukan proses kloning, hasil dari plasmid rekombinan tersebut ditransformasikan ke dalam bakteri inang *E. coli* BL21 DE3pLys yang disiapkan dengan metode  $\text{CaCl}_2$ . Transformasi dilakukan dengan metode *Heat shock*. Setelah masa inkubasi, ternyata tidak terdapat koloni transforman yang tumbuh. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa proses tersebut belum berhasil dengan baik. Analisis yang dilakukan terhadap penyebab kegagalan pada proses transformasi adalah sebagai berikut: (1) proses ligasi sekuen gen *pdv* dengan vektor plasmid pET21b gagal, sehingga tidak terbentuk plasmid rekombinan. Vektor plasmid pET21b didapatkan dari hasil isolasi bakteri rekombinan, sehingga tidak dilengkapi dengan kontrol ligasi seperti halnya dengan vektor plasmid pGEM-T easy. Kondisi tersebut menimbulkan kesulitan dalam menganalisis tingkat keberhasilan proses ligasi; (2) proses transformasi yang dilakukan dengan metode heat shock mengalami kegagalan. Indikasinya adalah tidak terdapat koloni transforman yang tumbuh baik pada transforman target maupun kontrol transformasi. Dengan melihat kondisi tersebut, dapat disimpulkan secara umum bahwa ligasi dan transformasi plasmid rekombinan pET21b + *pdv* ke dalam *E. coli* BL21 DE3pLys dinyatakan belum berhasil dengan baik. Karena belum didapatkan bakteri yang mengandung positif klon gen *pdv*, maka uji ekspresi gen tersebut belum dapat dilakukan dan memerlukan kajian yang lebih mendalam agar penelitian dapat berhasil dengan baik.

### G. Sekuensing

Urutan basa nukleotida fragmen pyruvate decarboxylase dianalisis dan dibandingkan dengan *database* gen penyandi pyruvate decarboxylase dari *GenBank* DNA menggunakan program BLAST (*Basic Local Alligment Search Tool*) untuk mengetahui identitas dan tingkat homologinya dengan fragmen gen yang telah diketahui sebelumnya. BLAST adalah program penyejajaran urutan basa nukleotida atau asam amino berdasarkan skor tertinggi (Mount, 2001). Hasil sekuensing gen *pdc* *Z. palmae* disajikan pada Lampiran 3.

Analisis tingkat homologi hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan program *Bioedit*. Dari hasil sekuensing dapat diketahui bahwa gen *pdc* yang telah ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  dalam bentuk plasmid rekombinan pGEM-T easy+*pdc* identik terhadap data nukleotida dari *GenBank* NCBI dengan catatan masih terdapat beberapa region yang belum terbaca, sehingga perlu didesain pasangan primer PCR yang dapat mengamplifikasi region tersebut dan proses sekuensing dapat diselesaikan untuk mendapatkan sekuen utuh gen *pdc* *Z. palmae*. Secara umum dapat disimpulkan bahwa sekuen gen target *pdc* *Z. palmae* telah berhasil diamplifikasi dan dikloning ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

1. Gen *pdc* telah berhasil diisolasi dari genom *Z. palmae*.
2. Gen *pdc* telah berhasil dikloning ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  dalam bentuk plasmid rekombinan pGEM-T easy + *pdc*.
3. Uji ekspresi gen *pdc* *Z. palmae* belum dapat dilakukan karena proses ligasi dan transformasi ke dalam vektor plasmid pET21b dan *E. coli* BL21 DE3pLys belum optimal.

#### B. Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan mengoptimalkan proses ligasi dan transformasi ke dalam vektor plasmid pET21b dan *E. coli* BL21 DE3pLys. Terkait dengan hal tersebut, beberapa hal yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut: (1) mendapatkan isolat vektor plasmid pET21b dengan konsentrasi tinggi, sehingga proses ligasi akan dapat dilakukan dengan optimal; (2) melakukan preparasi sel kompeten *E. coli* BL21 DE3pLys dengan menggunakan gliserol dan mencoba melakukan transformasi dengan metode elektroporasi yang dapat menghasilkan transforman dengan efisiensi cukup tinggi.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abdullah, C dan D. S. Retnoningrum. 2003. Deteksi Bakteri Patogen *Streptococcus pyogenes* dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung.
- Altschul, F. S., dan L. T. Madden. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : A New Generation of Protein Database Search Programs. National Centre for Biotechnology Information.
- Aprijani, D.A; M. Abdushshomad Elfaizi. 2004. BIOINFORMATIKA: *Perkembangan, Disiplin Ilmu dan Penerapannya di Indonesia*. <http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>. [28 Juni 2007].
- BPS. 2003. *Statistik Kebutuhan Import Asetaldehida*. <http://www.google.co.id> [30 Juni 2007].
- Celanese. 2006. *Lembaran Data Keselamatan Bahan: Acetaldehyde*. <http://www.google.com> [10 September 2007].
- Darmono, T. W; I. Jamil; D. A. Santosa. 2006. Pengembangan Penanda Molekuler untuk Deteksi *Phytophthora palmivora* pada Tanaman Kakao. *Menara Perkebunan* 74 (2), 87-96.
- Dobritzsch, D; Stephan Ko, Gunter Schneider, and Guoguang Lu. 1998. High Resolution Crystal Structure of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis* Implications For Substrate Activation In Pyruvate Decarboxylases. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 273, No. 32, Issue of August 7, pp. 20196–20204.
- EPA. 1994. *Chemical Summary for Acetaldehyde*. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pollution Prevention and Toxics.
- Granner, D. K. 1996. *Biokimia Harper: Regulasi Ekspresi Gen*. Jakarta: Buku Kedokteran.
- Gosselin, R. E., R. P. Smith, H. C. Hodge and J. E. Braddock. 1984. *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 5th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Heliyanti, I. 2005. Inovasi Teknologi di Balik Proyek Pembacaan Genom. *Inovasi* 4 (17). Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri.
- Kaczowka, S. J; Reuter, C. J; Talarico, L. A; and Maupin-furlow, J. A. 2004. Recombinant Production of *Zymomonas mobilis* Pyruvate Decarboxylase

In The Haloarchaeon *haloferax volcanii*. *Archaea* 1, 327–334 Heron Publishing-Victoria, Canada.

Manglayang Farm. 2006. Yogurt Bagian 2: Mikrobiologi Susu dan Kultur Starter. <http://www.google.com> [08 Oktober 2007].

Merck. 1989. *The Merck Index*, 11th ed. Rahway, NJ: Merck & Company, Inc.

Mizawarti. 2003. *Penerapan Teknik-Teknik Kloning Gen dalam Kehidupan Manusia*. Perpustakaan Digital Universitas Sumatra Utara.

Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirra Usaha Muda.

*National Toxicology Program*. 2002. *11th ROC: Profile of Acetaldehyde*. <http://www.google.com> [30 Juli 2007].

Novagen. 2006. *The Gold Standard for Protein Expression*. USA: Merck Bioscience

Nugraha, S dan J. Setiawati. 2004. *Peluang Agribisnis Arang Sekam*. Jakarta : Balai Penelitian Pascapanen.

Nugroho, A. S. 2003. *Bioinformatika dan Pattern Recognition (Laporan Kenyukai Pattern Recognition & Media Understanding)*. Artikel Populer IlmuKomputer.com. <http://www.ilmucomputer.com> [28 Juni 2007].

Nugroho, A. S; Dwi Handoko dan Witarto, A. B. 2005. Analisa Informasi Dimensi Tinggi pada Bioinformatika Memakai Support Vector Machine. *National Conference on Information & Communication Technology (ICT) for Indonesia* pp.427-435.

Nurfadzilla, R. I. 2007. *Perancangan Produk Asetaldehida dari Oksigen dan Etilen Kapasitas 40000 ton per tahun*. Skripsi. Surakarta: F. Teknik UMS.

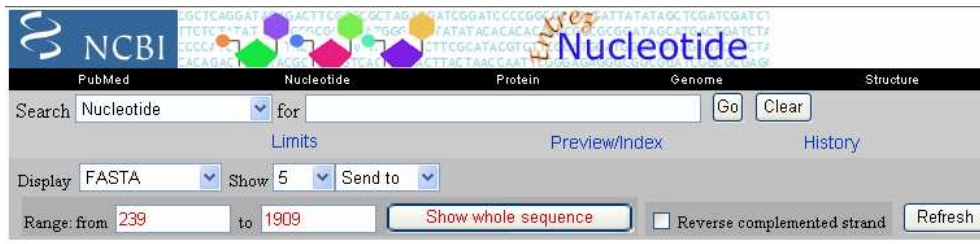
Okamoto, T; Taguchi, H; Nakamura, K; Ikenaga, H; Kuraishi, H; and Yamasato, K. 1993 *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., A New Ethanol-Fermenting Peritrichous Bacterium Isolated from Palm Sap. *Arch. Microbiol.* 160:333-337.

Old, R. W; S. B. Primrose. 2003. *Prinsip Manipulasi Gen: Pengantar Rekayasa Genetik*. Edisi keempat. Jakarta: UI Press.

Pelczar, M. J; E. C. S. Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta:Penerbit UI Press.

- Prijanto, M. 1992. Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Diagnosis Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Cermin Dunia Kedokteran* (75).
- Promega. 2006. *Life Science Catalog*. Promega Corporation. USA: Woods Hollow Road Madison.
- Purkan. 2003. Amplifikasi dan Kloning Gen Protein Disulfida Isomerase Ragi menggunakan Vektor T. *Jurnal Peneliti Med. Eksakta* Vol. 4 No. 3: 231-236.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikrobia*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Putra, E. D. L. 2003. Keracunan Bahan Organi dan Gas di Lingkungan Kerja dan Cara Penanggulangannya. *USU Digital Library*.
- Rahmat, R. 2006. Sekam untuk Bahan Bakar Alternatif. *Warta Bogor*. Vol 28 II
- Salmah. 2004. *Analisa Pertumbuhan Mikroba pada Fermentasi*. USU Digital Library.
- Sambrook, J. Russel, David W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Vol. 1,2,3. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Santoso, D. 2001. Pengembangan Pelacak DNA Spesifik Gen Melalui Bioinformatika: Identifikasi Gen Penyandi Protein Biji 21 kDa pada Kakao UAH Indonesia. *Menara Perkebunan* 69 (1) 10-17.
- Sasmito, A. 2007. *Perancangan Produk Asetaldehida dari Oksigen dan Etilen Kapasitas 15.000 ton per tahun*. Skripsi. Surakarta: F. Teknik UMS.
- Schenk, G; F. J. Leeper; R. England; P. F. Nixon; R. G. Duggleby. 1997. The Role of His113 and His114 in Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem* 258, 63-71.
- Sianipar, J; L. P. Batubara; A. Tarigan. 2003. Analisis Potensi Ekonomi Limbah dan Hasil Ikutan Perkebunan Kelapa Sawit sebagai Pakan Kambing Potong. *Lokakarya Nasional Kambing Potong*. Galang: Sumatra Utara.
- Siregar, E. B. M. 2005. Kontruksi Gen Cp Cmv pada *Agrobacterium*. *E-USU Repository* Universitas Sumatra Utara.
- Sisharmini, A; A. Dinar Ambarwati, Tri J. Santoso, Dwinita W. Utami, dan M. Herman. 2004. Teknik Isolasi DNA dan Analisis PCR Gen pinII pada Genom Ubi Jalar. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.

- Sitepoe, M. 2001. *Rekayasa Genetika*. Penerbit: PT. Gramedia Widiasana Indonesia.
- Sittig, M. 1985. *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 2nd ed. Park Ridge, NJ: Noyes Publications. 950 pp.
- SNI. 2005. Nilai Ambang Batas Zat Kimia di Udara Tempat Kerja. *Badan Standardisasi Nasional*.
- Sumartono; D. P. Widodo; W. Nurcahyo. 2006. *Kandidat Probe Parsial Genom Eimeria tenella Untuk Optimalisasi Diagnosis Koksidiosis*. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
- Utama, A. 2003. *Aplikasi Bioinformatika dalam Virologi*. Artikel Populer IlmuKomputer.com. <http://www.ilmucomputer.com> [28 Juni 2007].
- Wibowo, M. E. 2003. *Algoritma dalam Kaitannya dengan Komputer*. <http://www.ilmucomputer.com> [28 Juni 2007].
- Wijaya, S. K. S; L. Rohman. 2001. Fraksinasi dan Karakterisasi Protein Utama Biji Kedelai. *Jurnal ILMU DASAR* 2 (1): 49-54.
- Wikipedia Indonesia. 2007. *Escherichia coli*. <http://www.google.com> [22 September 2007].
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: ANDI.

LAMPIRAN 1. Sekuen Nukleotida Gen *pdc* *Z. palmae*


NCBI Nucleotide

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure

Search Nucleotide for [ ] Go Clear

Limits Preview/Index History

Display FASTA Show 5 Send to [ ]

Range: from 239 to 1909 Show whole sequence  Reverse complemented strand Refresh

**I: AF474145. Reports Zymobacter palmae...[gi:21359679]**

```
>gi|21359679:239-1909 Zymobacter palmae pyruvate decarboxylase (pdc) gene, complete cds
ATGTATACCGTTGGTATGTACTTGGCAGAACGCCTAGCCCAGATCGGCCTGAAACACCACTTTGCCGTGG
CCGGTGACTACAACCTGGTGTGCTGATCAGCTCCTGCTGAACAAAGACATGGAGCAGGTCTACTGCTG
TAACGAACTTAACTGCGGCTTTAGCGCCGAAAGGTTACGCTCGTGACGTGGTGCCCGCGCTGCCATCGTC
ACGTTACAGCGTAGGTGCTATCTCTGCAATGAACGCCATCGGTGGCGCCTATGCAGAAAACCTGCCGGTCA
TCCTGATCTCTGGCTCACCGAACCAATGACTACGGCACAGGCCACATCCTGCACCACACCATTGGTAC
TACTGACTATAACTATCAGCTGGAATGGTAAAAACAGTTACCTGCGCACGTGAAAGCATCGTTTCTGCC
GAAGAAGCACCCGGCAAAAATCGACCACGTCATCCGTACGGCTCTACGTGAACGCAAAACCGGCTTATCTGG
AAATCGCATGCAACCTGCTGGCGCTGAAATGTGTTGCTCCGGGCCGATCAATAGCCTGCTGCGTGAAT
CGAAGTTGACCAGACAGTGTCACTGCCGCTGTAGATGCCCGCGTAGAATGGCTGCAGGACCGCCAGAAC
GTCGTCATGCTGGTCCGTAGCAAACTGCGTGCCGCTGCCGCTGAAAAACAGGCTGTTGCCCTAGCGGACC
GCCTGGGCTGCGCTGTACAGATCATGGCTGCCGAAAAGGCTTCTTCCGGAAAGATCATCCGAACCTCCG
CGCCCTGTACTGGGGTGAAGTCAAGTCCGAAAGTGCACAGGAAGTGGTTGAAAACCGCCGATGCCATCCTG
TGCTGGCACCGGTTATCAACGACTATGCTACCGTTGGCTGGAATCCTGGCCGAAAAGCGGACAAATGTCA
TGGTCAATGGACACCGACCCGCTCACTTTCCGACGACAGTCCCTCGAAGGTCTGTCATTGAGCACCTTCCG
CGCAGCACTGGCTGAGAAAACCTTCTCGCCCGGCACGACTCAAGGCACCTCAAGCACCGGTACTGGGT
ATTGAGGCCGACAGCCCAATGCACCGCTGACCAATGACGAAATGACGCGTCAGATCCAGTCCGCTGATCA
CTTCCGACACTACTCTGACAGCAGAAAACAGGTGACTCTTGGTTCAACGCTTCTCGCATGCCGATTCCCTGG
CGGTGCTCGTGTCAACTGGAATGCAATGGGGTCATATCGGTTGGTCCGTACCTTCTGCATTCCGGTAAC
GCCGTTGGTTCTCCGGAGCGTCCGCCACATCATGATGGTCCGGTATGGCTCTTCCAGCTGACTGCTCAAG
AAGTTGCTCAGATGATCCGCTATGAAATCCCGGTCATCATCTTCCGTATCAACAACCGCGGTTACGTCAT
CGAAATCGCTATCCATGACGGCCCTTACAACCTACATCAAAAACCTGGAACCTACGCTGGCCTGATCGACGTC
TTCAATGACGAAGATGGTCAATGGCTGGGCTGAAAAGCTTCTACTGGTGCAGAACTAGAAGGCGCTATCA
AGAAAACACTCGACAATCGTCCGGTCCGACGCTGATCGAATGTAACATCGCTCAGGACGACTGCACCTGA
AACCCCTGATTGCTGGGGTAAACGCTGTAGCAGCTACCAACTCTCGCAACACCAAGCGTAA
```



## LAMPIRAN 2. Uji *In Silico* Fast PCR

In silico PCR (PCR product prediction) for: >ekspresi pdc zymobacter palmae

```
>primer forward
5'-ccccatagtataccggttg
Position: 105 -> 124 20bp 88 %
5'-ccccatagtataccggttg->
  ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
...cccctgatgtataccggttg...
>primer reverse
5'-ggatccacgcttggtggttg
Position: 1766 <- 1785 20bp 82 %
<-gtttggtgttcgcacctagg-5'
  ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
...caaaccacaagcgtaagttg...
```

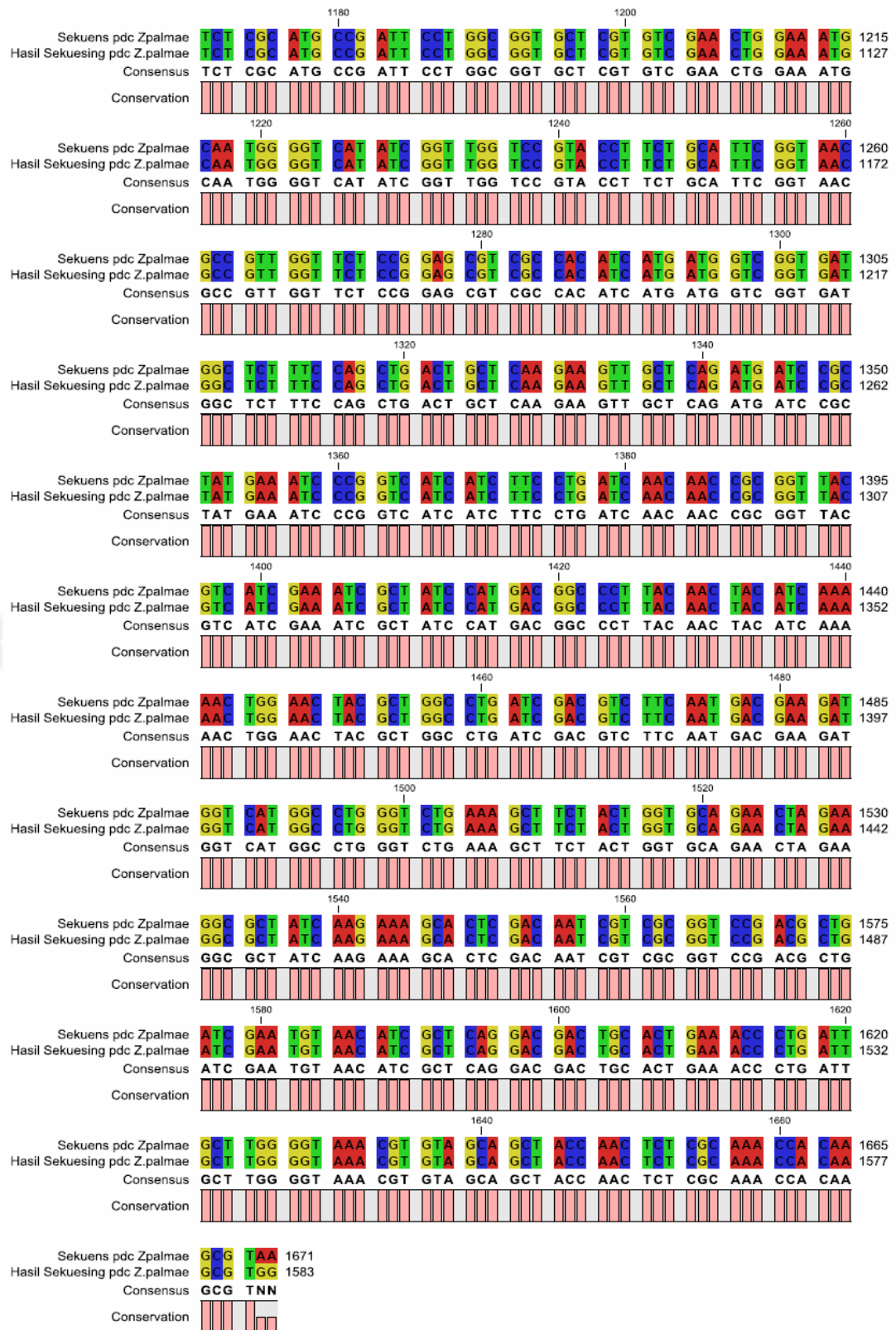
PCR product size: 1681bp  
>primer forward  
5'-ccccatagtataccggttg  
>primer reverse  
5'-ggatccacgcttggtggttg











## LAMPIRAN 4. Daftar Riwayat Hidup Penulis

**RIWAYAT HIDUP PENULIS**

Nama Lengkap : Agitya Putra Kusuma  
 Tempat Tanggal Lahir : Sukoharjo, 20 Oktober 1985  
 Jenis Kelamin : Laki-laki  
 Agama : Islam  
 Status Pernikahan : Belum Menikah  
 Alamat : Wonorejo Rt 2/Rw 6 Polokarto Sukoharjo  
 No HP : +6285658151750  
 Alamat Email : agitya@yahoo.com

**Pendidikan Formal**

Tahun	Institusi Pendidikan	Jurusan
2004-2008	Universitas Sebelas Maret	Biologi
2001-2004	SMA N I Karanganyar	IPA
1998-2001	SLTP N I Mojolaban	
1992-1998	SD Muhammadiyah Wonorejo	

**Pendidikan Non Formal**

Nama Pelatihan/Program	Institusi Penyelenggara	Tahun
1. Kursus Perakitan Komputer	SMA N I Karanganyar	2004
2. Workshop dan Pelatihan Program SPSS	Biologi F MIPA UNS	2005

**Beasiswa yang pernah diperoleh**

Nama Beasiswa	Institusi Pemberi	Tahun
Beasiswa Supersemar	Yayasan Supersemar	2006, 2007 dan 2008

**Karya Tulis**

Judul	Program	Tahun
Studi Pengendalian Penyakit Layu Fusarium pada Tanaman Pisang ( <i>Musa</i> sp) dengan Aplikasi <i>Trichoderma</i> sp.	PKMI DIKTI	2007
Aplikasi <i>Genamics Expression</i> 1.1 Sebagai Program Bioinformatika yang Dapat Menunjang Penelitian dalam Bidang Biomolekuler.	PKM DIKTI	2008

**Pengalaman Organisasi**

Organisasi	Jabatan	Tahun
SKI MIPA UNS	Staf Departemen Usaha	2005-2006
HIMABIO UNS	Staf HUMAS Eksternal	2006

**Pengalaman Bekerja**

Pekerjaan	Tahun
Asisten Praktikum Struktur Perkembangan Hewan I	2005 dan 2006
Asisten Praktikum Mikrobiologi	2006
Asisten Praktikum Struktur Perkembangan Tumbuhan II	2007
Magang Kerja di Balai Pengolahan Sumber Daya Air Minum Surakarta	2007
Riset Tugas Akhir di Puslit Bilteknologi LIPI	2007-2008

Surakarta, Juli 2008

Agitya Putra Kusuma