

Kloning Gen Pengkode Endo- β -1,3-1,4 Glukanase *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* W23 pada Plasmid *pMMB67EH* dalam *Escherichia coli Dh5 α* dan *Escherichia coli* Origami

Cloning of the gene encoding Endo- β -1,3-1,4 Glucanase from *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* W23 on Plasmid *pMMB67EH* into *Escherichia coli DH5 α* and *Escherichia coli* Origami

Lisa Gunawan

Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya
 Email: lisgunchan@yahoo.co.id

Abstract

One of the genes encoding cellulolytic enzymes, named BSUW23_10175, from *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* W23 was cloned in the plasmid *pMMB67EH* into *Escherichia coli DH5 α* and *Escherichia coli* Origami. Target gene was amplified using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers (For-BSUW23_10175 dan Rev-BSUW23_10175) that were used for BSUW23_10175 gene amplification. Based on the PCR and restriction analyses of the transformants plasmid, it was known that clones number 8 and 9 of the *Escherichia coli* Origami transformants contained the recombinant plasmid *pMMB_BSUW23_10175*. Cellulolytic activity assay showed that those transformants had cellulolytic activity by induction with IPTG (isopropyl- β -D-thio-galactosidase).

Key words: *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* W23, cloning, endo- β -1,3-1,4 glucanase, *Escherichia coli DH5 α* , *Escherichia coli* Origami

Abstrak

Salah satu gen pengkode enzim pengurai selulosa, bernama BSUW23_10175, dari *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* W23 dikloning ke dalam *Escherichia coli DH5 α* dan *Escherichia coli* Origami pada plasmid *pMMB67EH*. Gen target diamplifikasi dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dengan pasangan primer spesifik (For-BSUW23_10175 dan Rev-BSUW23_10175) yang digunakan untuk amplifikasi gen BSUW23_10175. Berdasarkan analisa transforman yang dilakukan dengan PCR dan analisis restriksi, diketahui bahwa transforman *Escherichia coli* Origami nomor 8 dan 9 membawa plasmid rekombinan *pMMB_BSUW23_10175*. Uji aktivitas selulolitik menunjukkan bahwa transforman memiliki aktivitas selulolitik dengan induksi oleh IPTG (*isopropyl- β -D-thio-galactosidase*).

Kata kunci: *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* W23, kloning, endo- β -1,3-1,4 glukanase, *Escherichia coli DH5 α* , *Escherichia coli* Origami

Pendahuluan

Indonesia adalah salah satu negara yang potensial di bidang peternakan. Dari segi lahan, beberapa kawasan di Indonesia telah menjadi sentra peternakan. Namun, peternakan-peternakan di Indonesia masih berkendalakan berbagai hal, salah satunya adalah pada kualitas pakan ternak yang secara langsung juga ikut menentukan kualitas hewan ternak di Indonesia. Selulosa merupakan salah satu penyusun pakan ternak jenis rumput-rumputan yang banyak digunakan pada peternakan. Selulosa merupakan sebuah polisakarida yang terdiri dari rantai linier dari beberapa ratus hingga lebih dari sepuluh ribu ikatan $\beta(1,4)$ unit D-glukosa. Glukosa inilah nantinya dimanfaatkan untuk pembuatan energi pada hewan, oleh karena itu pemberian *pre-treatment* pada pakan ternak yang memecah selulosa dapat meningkatkan daya cerna hewan ternak ruminansia dan hewan monogastrik yang sama. Namun penerapan hal ini masih jarang dilakukan di Indonesia karena proses pemecahan selulosa memerlukan tahap *pre-treatment* yang sulit dan panjang untuk memecah ikatan – ikatan glikosidik yang ada. (Khairil, 2009; Chander *et al.*, 2011).

Selama ini yang biasanya dilakukan adalah pemecahan ikatan-ikatan antara glukosa dalam selulosa dengan enzim – enzim selulase atau asam kuat pada substrat selulosa sehingga ikatan tersebut terputus menjadi monomer-monomer glukosa. Hal tersebut tidak praktis karena setiap pembuatan produk diperlukan banyak tahap hanya untuk preparasi substrat terlebih dahulu, karena itu keberadaan bakteri yang mampu menghasilkan enzim-enzim selulase dan menghasilkan produk sekaligus sangat berpotensi untuk ke depan

(Seotrisno, 2008; Pecinta lingkungan hidup siklus ITS, 2010).

Bacillus subtilis subsp. spizizenii W23 merupakan salah satu bakteri gram positif yang mampu memecah ikatan – ikatan yang ada pada selulosa. *B. subtilis subsp. spizizenii* diduga memiliki salah satu gen yang mengkode suatu enzim yang dapat memecah ikatan yang ada pada selulosa, yaitu enzim endo- β -1,3-1,4 glukanase. Bila terbukti memiliki aktivitas tersebut, kemampuan dari *B. subtilis subsp. spizizenii* dalam menghasilkan enzim endo- β -1,3-1,4 glukanase ini akan sangat berguna bila dimiliki oleh mikroorganisme produktif lain, misalnya mikroorganisme penghasil etanol, biogas, pemroses pakan ternak dan lain - lain yang biasanya tidak dapat menghasilkan produk dari substrat selulosa secara langsung (DIBY *et al.*, 2005; Modi, 2010).

Maka dari itu, dilakukan penelitian pendahuluan dengan cara kloning gen yang diduga mengkode enzim endo- β -1,3-1,4 glukanase dari *B. subtilis subsp. spizizenii*, memasukkannya dalam suatu plasmid, mentransformasikan dalam suatu sel inang yang umum digunakan. Disini diharapkan sel inang mampu menerima plasmid rekombinan yang mengandung gen yang mengkodekan enzim endo- β -1,3-1,4 glukanase *B. subtilis subsp. spizizenii*. Vektor plasmid yang digunakan adalah plasmid *pMMB67EH*. Plasmid *pMMB67EH* digunakan karena merupakan plasmid *broad host range* yang dapat ditransformasi pada host *Escherichia coli*. Sel inang yang digunakan adalah *Escherichia coli* DH5 α dan *Escherichia coli* Origami (Modi, 2010). Penelitian pendahuluan ini dilakukan untuk mengawali penelitian lebih lanjut tentang penguraian selulosa oleh organisme produktif dengan keberadaan plasmid

pMMB_BS UW23_10175.

Materi dan Metode

Pada penelitian ini digunakan beberapa bahan uji biologis sebagai berikut : *Bacillus subtilis subsp. spizizenii W23* (koleksi NRRL), *Escherichia coli DH5a*, *Escherichia coli* Origami (Novagen) dan plasmid *pMMB67EH* (Fruste *et al.*, 1986).

Ekstraksi DNA kromosom dilakukan berdasarkan protokol dari Sambrook *et al.* (1989). Untuk mengekstraksi DNA kromosom *B. subtilis subsp. spizizenii W23* perlu dilakukan beberapa langkah yaitu pelisisan bakteri dengan *boiling lysis*, lisis dengan deterjen dan sonikasi kemudian dilakukan proses purifikasi pada campuran DNA kromosom yang didapat.

Gen target yang diamplifikasi adalah gen pengkode *endo-beta-1,3-1,4 glucanase* (gen BSUW23_10175). Campuran untuk proses PCR yang digunakan sesuai dengan prosedur *Green Taq Master Mix* dari *Promega*. Pasangan primer yang digunakan adalah *primer forward* For-BSUW23_10175 dan *primer reverse* Rev-BSUW23_10175. Kondisi PCR yang digunakan: 30 siklus dengan *pre denaturation* suhu 95°C, 2 menit, *denaturation* suhu 95°C, 30 detik, *annealing* suhu 60°C, 30 detik, *elongation* suhu 72°C, 1 menit dan *final extension* suhu 72°C, 10 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis dan dipurifikasi dengan *High Pure PCR Product Purification Kit* dari *Roche*. Selain dengan cara PCR dari DNA kromosom hasil isolasi, gen target juga bisa didapatkan dengan PCR dengan *template colony* sel *B. subtilis subsp. spizizenii W23*.

Gen *insert* merupakan gen target (produk PCR) hasil isolasi dan amplifikasi dengan metode PCR

yang dipreparasi dengan restriksi. Plasmid yang digunakan untuk vektor kloning dan ekspresi adalah plasmid *pMMB67EH* yang dipreparasi dengan restriksi. Enzim restriksi yang digunakan adalah *EcoRI* dan *HindIII* dari *Fermentas*. Hasil restriksi gen target dan vektor kemudian dielektroforesis dan band target dipurifikasi dengan *High Pure PCR Product Purification Kit* dari *Roche*.

Proses ligasi dilakukan dengan gen *insert* hasil restriksi pada vektor plasmid *pMMB67EH* hasil restriksi. Proses ligasi dilakukan sesuai dengan prosedur penggunaan *T4 DNA ligase* dari *Roche*. Kondisi ligasi yang digunakan adalah inkubasi pada suhu 4°C, 12 jam. Hasilnya kemudian ditransformasikan pada sel kompeten.

Pembuatan sel kompeten *Escherichia coli DH5a* dan *Escherichia coli* Origami dibuat sesuai dengan metode dari Sambrook *et al.* (1989). Pembuatan sel kompeten *E. coli DH5a* dilakukan dengan larutan 0,1 M CaCl₂. Hasilnya ditambah dengan ±75 µl gliserol hingga gliserol mencapai konsentrasi 10% dari total volume dan disimpan dalam suhu -80°C.

Proses transformasi hasil ligasi pada sel Kompeten (*Escherichia coli DH5a* dan *Escherichia coli* Origami) dengan Metode *Heat Shock* sesuai dengan metode Sambrook *et al.* (1989). Hasil transformasi ditumbuhkan pada media agar LB-ampisilin (Konsentrasi ampisilin 100 µg/ml media LB) dan diinkubasi selama 16 – 24 jam pada suhu 37°C.

Koloni transforman yang tumbuh pada media LB-Amp kemudian dianalisis dengan *colony PCR* dan analisis restriksi.

Campuran untuk proses PCR yang digunakan sesuai dengan prosedur *Green Taq Master Mix* dari *Promega* dengan *colony* sebagai *template*-nya.

Pasangan primer yang digunakan pada *colony PCR* ini adalah primer *forward* For-BSUW23_10175 dan *reverse* Rev-BSUW23_10175; serta primer *forward* seqFor-pMMB67 dan *reverse* seqRev-pMMB67.

Plasmid yang akan dianalisis restriksi awalnya diisolasi terlebih dahulu dari transforman dengan *High Pure Plasmid Isolation Kit* dari Roche. Enzim restriksi yang digunakan dalam analisis restriksi adalah *EcoRI*, *XbaI* dan *HindIII* dari Fermentas. Kontrol yang digunakan pada analisa transforman koloni adalah *E. coli DH5a* dan *E. coli Origami* yang ditransformasi dengan *empty* plasmid *pMMB67EH*.

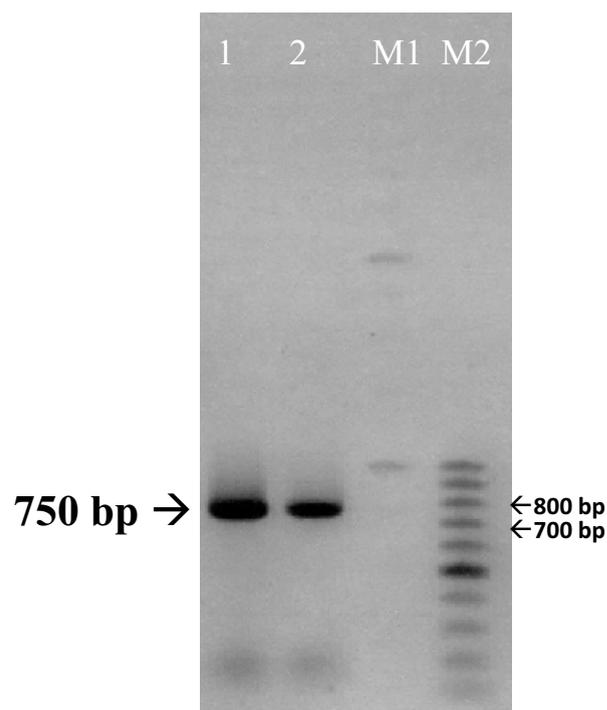
Uji aktivitas dilakukan dengan cara menginokulasikan sel *host E. coli Origami pMMB_BSUW10175* pada media LB-ampisilin *broth* yang mengandung CMC 1% dan IPTG 0,1 mM. Proses inkubasi dilakukan selama tiga hari, 37°C, 100 rpm. Sampling dilakukan sehari sekali secara aseptis. Kontrol positif yang digunakan adalah kultur *B. subtilis sp. spizizenii* yang ditanam pada media LB-IPTG-CMC *broth*. Kontrol negatif yang digunakan adalah kultur *E. coli Origami* yang tertransformasi plasmid kosong yang ditanam pada media LB-amp-IPTG-CMC *broth*. Setiap kali sampling, dilakukan pengukuran OD₆₀₀ dan pengukuran jumlah glukosa yang terbentuk. Metode deteksi yang digunakan adalah uji gula reduksi (DNS) dari Miller (1959).

Selain itu, dilakukan uji aktivitas sel *host E. coli Origami pMMB_BSUW10175* yang ditanam pada LB-amp-IPTG *broth*. Sampling dilakukan sehari sekali secara aseptis. Kontrol yang digunakan adalah kultur *B. subtilis sp. spizizenii* yang ditanam pada media LB-IPTG *broth* dan *E. coli Origami* yang tertransformasi dengan plasmid kosong yang

ditanam pada media LB-amp-IPTG *broth*. Setiap kali sampling, dilakukan pengukuran OD₆₀₀ dan pereaksian supernatan dengan CMC 1%. Metode deteksi yang digunakan adalah uji gula reduksi (DNS) dari Miller (1959).

Hasil dan Pembahasan

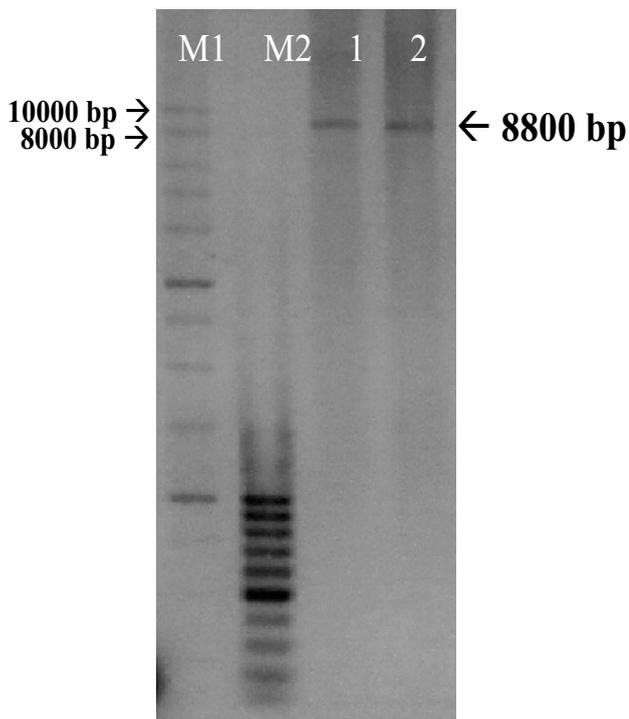
Hasil elektroforesis PCR dengan DNA *template* hasil ekstraksi DNA kromosomal *B. subtilis subsp. spizizenii W23* dan *colony PCR* menunjukkan adanya 1 band DNA berukuran 750 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil PCR DNA Kromosomal dan *Colony PCR* dari *B. Subtilis sp. spizizenii W23* pada agarose 1% dengan TAE 1X. (lane 1) Hasil PCR dari DNA kromosomal; (lane 2) Hasil *Colony PCR* *B. Subtilis sp. spizizenii W23*; (lane M1) Marker 1 kb; (lane M2) Marker 100 bp.

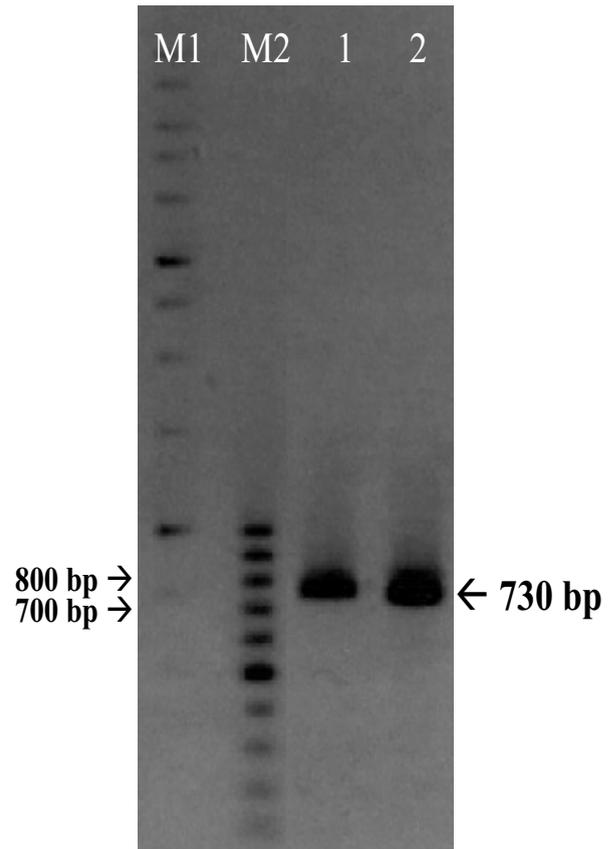
Hasil PCR yang telah dipastikan dengan elektroforesis kemudian dipurifikasi dengan kit purifikasi hasil PCR dari Roche yaitu *PCR Product Purification Kit*.

Hasil elektroforesis restriksi plasmid menunjukkan adanya 1 band DNA berukuran sekitar 8,8 kb (Gambar 2). Plasmid hasil restriksi pada gel agarose dipurifikasi kembali dengan *PCR Product Purification Kit*.



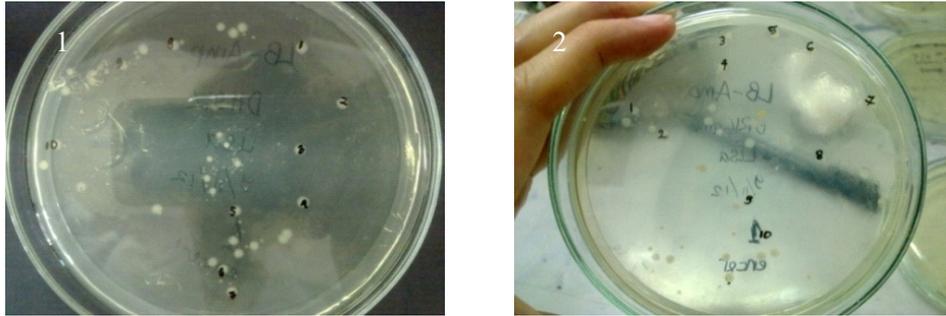
Gambar 2. Hasil Restriksi Plasmid *pMMB67EH* dengan Enzim Restriksi *HindIII* dan *EcoRI* pada Agarose 1% dengan TAE 1X. (*lane M1*) Marker 1 kb; (*lane M2*) Marker 100 bp; (*lane 1*) Plasmid *pMMB67EH*; (*lane 2*) Hasil rekstriksi plasmid *pMMB67EH* dengan enzim restriksi *HindIII* dan *EcoRI*.

Hasil elektroforesis restriksi gen target menunjukkan adanya 1 band DNA berukuran sekitar 730 bp (Gambar 3). Gen target hasil restriksi pada gel agarose dipurifikasi kembali dengan kit purifikasi *PCR Product Purification Kit*.

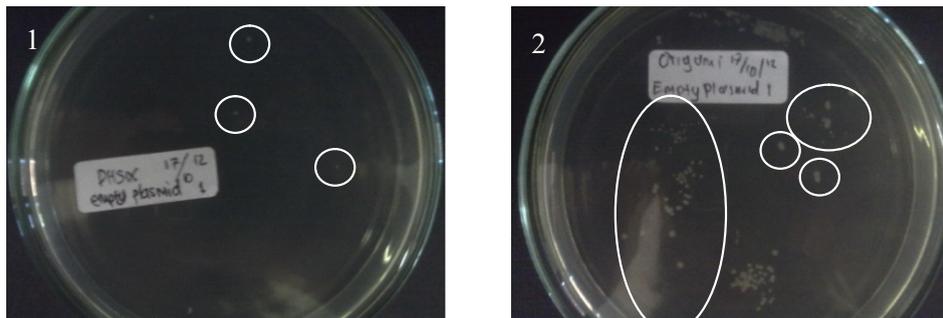


Gambar 3. Hasil Restriksi Plasmid *pMMB67EH* dengan Enzim Restriksi *HindIII* dan *EcoRI* pada Agarose 1% dengan TAE 1X. (*lane M1*) Marker 1 kb; (*lane M2*) Marker 100 bp; (*lane 1*) gen target; (*lane 2*) Hasil rekstriksi gen target dengan enzim restriksi *HindIII* dan *EcoRI*.

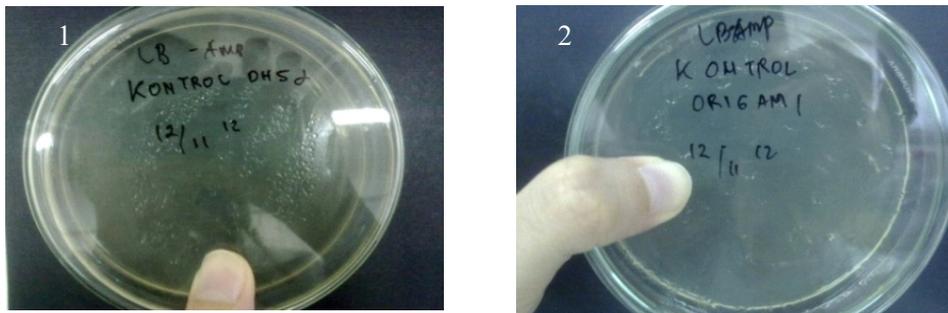
Hasil menunjukkan adanya pertumbuhan koloni pada media masing – masing hasil transformasi *E. coli DH5α* dan *E. coli Origami* (Gambar 4). Kontrol yang digunakan adalah kontrol *E. coli* tertransformasi plasmid kosong (Gambar 5), kontrol negatif (Gambar 6) dan kontrol ligasi (Gambar 7).



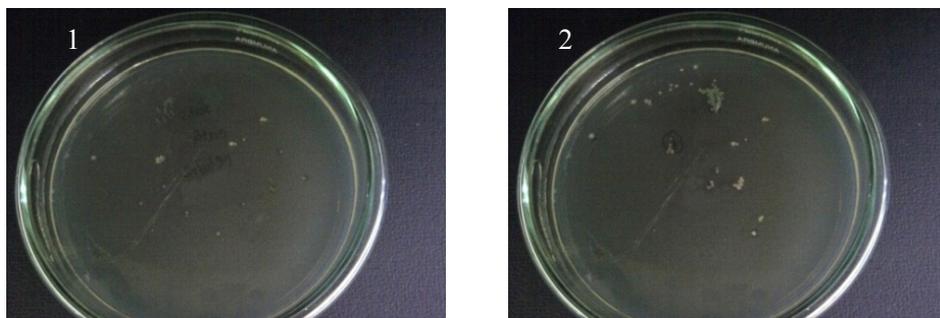
Gambar 4. Hasil Transformasi Sel Kompeten dengan Plasmid Rekombinan pada Media LB-Amp.
(1) *E. coli DH5α*; (2) *E. coli Origami*.



Gambar 5. Hasil Transformasi Sel Kompeten dengan Plasmid Kosong pMMB67EH.
(1) *E. coli DH5α*; (2) *E. coli Origami*.

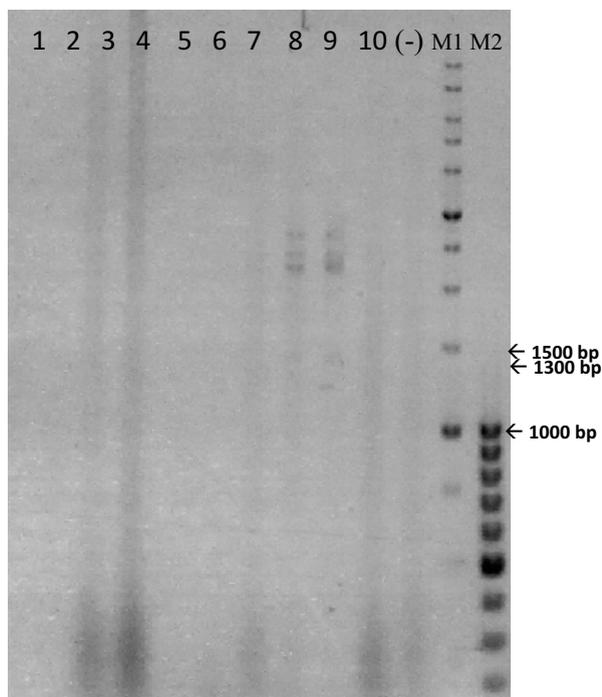


Gambar 6. Kontrol Negatif Sel Kompeten pada Media LB-Amp.
(1) *E. coli DH5α*; (2) *E. coli Origami*.



Gambar 7. Kontrol ligasi Sel Kompeten Tertransformasi Campuran Ligasi tanpa Enzim Ligase pada Media LB-Amp.
(1) *E. coli DH5α*; (2) *E. coli Origami*.

Pada *colony PCR* untuk transforman Origami dengan primer plasmid *pMMB67EH*, terlihat adanya band DNA berukuran $\pm 1,3$ kb pada koloni 8 dan 9 (Gambar 8). Pada hasil *colony PCR* dengan primer untuk isolasi gen BSUW23_10175, terlihat adanya

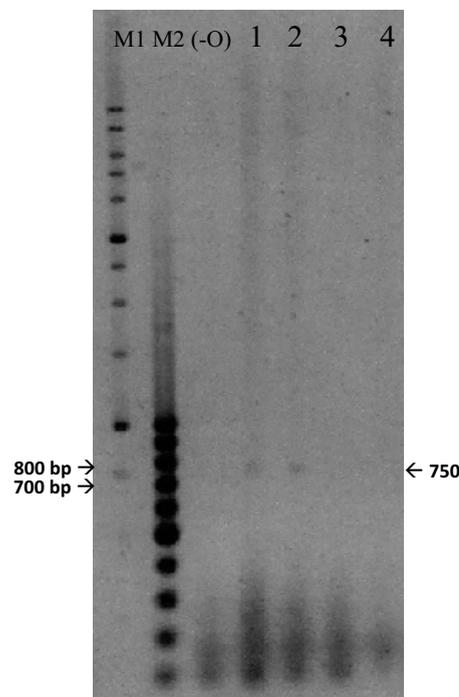


Gambar 8. Hasil Elektroforesis Analisis Klon Positif pada Sel *Host E. coli* Origami dengan *Colony PCR* menggunakan Primer Plasmid *pMMB67EH* (seqFor-pMMB67 dan seqRev-pMMB67) pada Agarose 1% dengan TAE 1X. Lane 1 – 10 berturut – turut adalah koloni transforman nomor 1 hingga 10; (lane-) kontrol negatif (*E. coli* Origami); (lane M1) Marker 1 kb; (lane M2) Marker 100 bp.

Dari hasil analisis transforman dengan metode *colony PCR* dapat disimpulkan bahwa koloni transforman 8 dan 9 pada sel *host E. coli* Origami merupakan klon positif.

Selain dengan *colony PCR*, juga dilakukan analisis transforman dengan analisis restriksi. Klon positif yang telah dianalisis dengan metode *colony PCR* kemudian diisolasi plasmidnya dengan kit isolasi plasmid dari Roche. Hasil isolasi plasmid

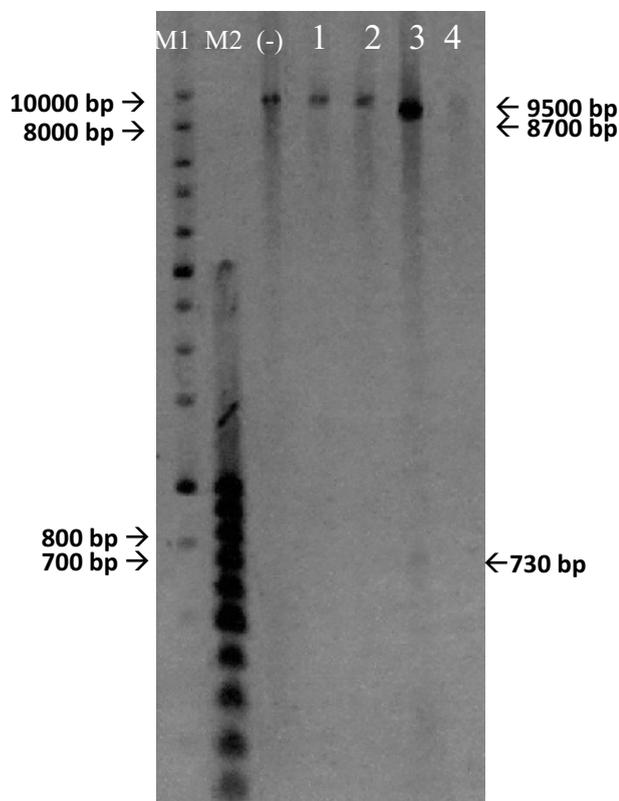
band DNA berukuran ± 750 bp pada koloni 8 dan 9 (Gambar 9). Pada transforman *E. coli DH5 α* menunjukkan hasil yang negatif (tidak ada band) (Gambar tidak disertakan).



Gambar 9. Hasil *Screening* Klon Positif dengan *Colony PCR* menggunakan Primer yang Digunakan untuk Isolasi Gen BSUW23_10175 (For-BSUW23_10175 dan Rev-BSUW23_10175) pada Agarose 1% dengan TAE 1X. (lane M1) Marker 1 kbp; (lane M2) Marker 100 bp; (lane -O) kontrol negatif (Origami dengan empty plasmid); (lane 1) Koloni transforman Origami koloni 8; (lane 2) Koloni transforman Origami koloni 9; (lane 3) Transforman Origami koloni 1 – 4; (lane 4) Transforman Origami koloni 5 – 7 dan 10.

kemudian direstriksi dengan berbagai enzim restriksi antara lain *HindIII*, *EcoRI* dan *XbaI* dari *Fermentas*. Semua hasil analisis restriksi divisualisasikan dengan elektroforesis. Pada hasil restriksi dengan enzim restriksi tunggal *HindIII*, *EcoRI* dan *XbaI* terdapat 1 band berukuran sekitar 9,5 kb. Pada hasil restriksi dengan enzim restriksi

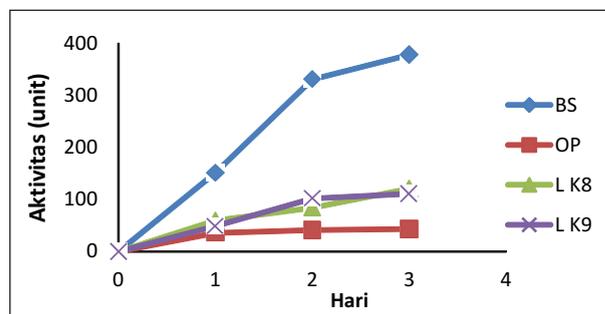
ganda (*double digest*) *HindIII* dan *EcoRI* terdapat band berukuran sekitar 8,7 kb dan 730 bp (Gambar 10).



Gambar 4.10. Hasil Analisis Restriksi Plasmid Rekombinan pada Transforman *E. coli* Koloni 8 dengan Pemotongan dari Enzim Restriksi *HindIII*, *EcoRI* dan *XbaI* pada Agarose 1% dengan TAE 1X. (*lane M1*) Marker 1 kb; (*lane M2*) Marker 100 bp; (*lane -*) Kontrol negatif (plasmid rekombinan tanpa pemotongan); (*lane 1*) Pemotongan dengan *HindIII*; (*lane 2*) Pemotongan dengan *EcoRI*; (*lane 3*) Pemotongan dengan *HindIII* dan *EcoRI*; (*lane 4*) Pemotongan dengan *XbaI*.

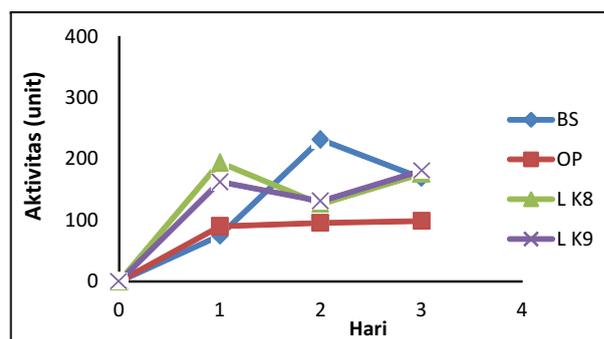
Pada uji aktivitas pada supernatan, *B. subtilis subsp. spizizenii W23* (BS), terlihat ada aktivitas yang sangat besar yang terus meningkat dari hari ke hari. Pada koloni uji (klon positif koloni Origami 8 (L K8) dan koloni Origami 9 (L K9)), terlihat pula adanya aktivitas yang cukup besar yang terus meningkat dari hari ke hari. Pada *E. coli* Origami

berisi plasmid kosong (OP) terlihat terdapat aktivitas yang konstan pada hari ke hari (Gambar 11).



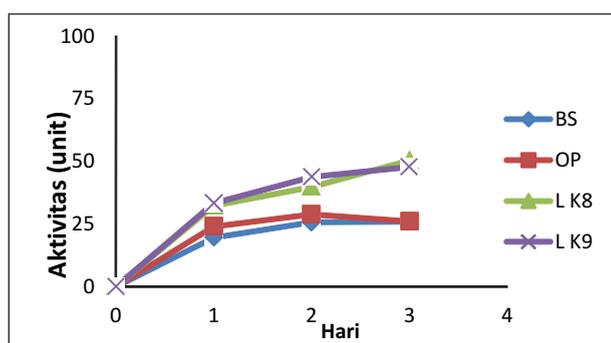
Gambar 11. Pola Aktivitas Enzim Selulase pada Supernatan Kultur Sel yang Inkubasi pada 37°C, 120 rpm. 1 unit didefinisikan sebagai perubahan absorbansi 0,001 Å yang disebabkan oleh aktivitas selulolitik sel per hari. (BS) *B. subtilis subsp. spizizenii W23*; (OP) *E. coli* Origami tertransformasi plasmid kosong; (L K8) Klon positif koloni 8; (L K9) Klon positif koloni 9.

Pada uji aktivitas enzim pada supernatan sel setelah sonikasi, *B. subtilis subsp. spizizenii W23* (BS), terlihat ada aktivitas yang tinggi pada hari ke dua. Pada koloni uji, terlihat adanya aktivitas yang cukup besar pada hari ke satu dan tiga. Pada *E. coli* Origami tertransformasi plasmid kosong (OP) terlihat terdapat aktivitas yang hampir tidak berubah pada hari ke hari (Gambar 12).



Gambar 12. Pola Aktivitas Enzim Selulase dari Badan Sel yang telah Disonikasi dan Diinkubasi pada 37°C, 120 rpm; Reaksi pada 40°C, 30 menit. (BS) *B. subtilis subsp. spizizenii W23*; (OP) Origami tertransformasi plasmid kosong; (L K8) Klon positif koloni 8; (L K9) Klon positif koloni 9.

Selanjutnya pada uji aktivitas enzim pada supernatan sel yang ditanam di media tanpa CMC dan diinkubasi 37°C, 120 rpm, dimana supernatan sel kemudian direaksikan dengan substrat CMC. Pada koloni uji terlihat adanya aktivitas yang cukup besar yang terus meningkat dari hari ke hari. Pada *E. coli* Origami tertransformasi plasmid kosong (OP) dan *B. subtilis subsp. spizizenii* W23 (BS) terlihat terdapat aktivitas yang konstan pada hari ke hari (Gambar 13).



Gambar 13. Pola Aktivitas Enzim Selulase pada Supernatan Kultur Sel yang Ditumbuhkan Media tanpa CMC dan Diinkubasi pada 37°C, 120 rpm; reaksi pada 40°C, 30 menit. (BS) *B. subtilis subsp. spizizenii* W23; (OP) *E. coli* Origami tertransformasi plasmid kosong; (L K8) Klon positif koloni 8; (L K9) Klon positif koloni 9.

Sebelum penelitian ini, telah terdapat penelitian oleh Zleiger *et al.* (2008) yang berhasil melakukan DNA sequencing pada DNA genom *Bacillus Subtilis sp. spizizenii* W23. Dari hasil sequencing dapat diprediksi bahwa *Bacillus Subtilis sp. spizizenii* W23 memiliki gen pengkode protein yang diduga adalah gen pengkode endo β -1,3-1,4 glukonase. Pada penelitian ini digunakan primer spesifik (For-BSUW23_10175 dan Rev-BSUW23_10175) yang telah dirancang berdasarkan prediksi urutan gen dari DNA genom yang telah diketahui. Dari hasil percobaan, terdapat band DNA berukuran sekitar 750 bp pada elektroforesis hasil

PCR (Gambar 1). Menurut perhitungan, hasil yang benar ditunjukkan dengan adanya band DNA berukuran 758 bp pada elektroforesis hasil PCR dengan primer For-BSUW23_10175 dan Rev-BSUW23_10175. Hasil ini telah sesuai dengan perhitungan, jadi dapat disimpulkan bahwa isolasi gen target dari *B. Subtilis sp. spizizenii* W23 telah berhasil.

Preparasi gen *insert* dan vektor dilakukan dengan merestriksi plasmid dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *HindIII*. Enzim restriksi tersebut dipilih karena plasmid *pMMB67EH* memiliki sisi pemotongan yang dikenali kedua enzim tersebut. Gen *insert* sendiri dipotong dengan *EcoRI* dan *HindIII* agar dapat disisipkan ke dalam vektor. Pada hasil elektroforesis restriksi terlihat 1 band DNA berukuran sekitar 8,8 kb (Gambar 2). Menurut perhitungan, hasil yang benar ditunjukkan dengan adanya 2 band DNA berukuran 8777 bp dan 51 bp pada elektroforesis hasil restriksi plasmid *pMMB67EH* dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *HindIII*. Hasil ini telah sesuai dengan perhitungan, namun dalam hal ini belum dapat ditarik kesimpulan bahwa restriksi plasmid berhasil karena ukuran band DNA antara plasmid yang terestriksi dan tidak direstriksi hampir sama karena pemotongan hanya mengurangi 51 bp. Tidak terlihatnya band DNA berukuran 51 bp kemungkinan karena band telah keluar dari gel saat proses *running* elektroforesis karena ukurannya yang terlalu kecil.

Pada hasil elektroforesis restriksi gen target terlihat 1 band DNA berukuran sekitar 730 bp (Gambar 3). Menurut perhitungan, hasil yang benar pada elektroforesis hasil restriksi gen target dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *HindIII* ditunjukkan dengan adanya 3 band DNA berukuran 8 bp, 738 bp dan 12 bp. Hasil ini telah sesuai dengan perhitungan,

namun dalam hal ini belum dapat ditarik kesimpulan bahwa restriksi gen target berhasil karena ukuran band DNA antara gen target yang terestriksi dan tidak direstriksi hampir sama karena pemotongan hanya mengurangi 20 bp. Tidak terlihatnya band DNA berukuran 8 bp dan 12 bp kemungkinan karena band DNA tersebut telah keluar dari gel saat proses *running* elektroforesis karena ukurannya yang terlalu kecil.

Tujuan dari elektroforesis pada hasil restriksi plasmid dan gen target sendiri adalah memisahkan fragmen besar (8777 bp dan 738 bp) dari fragmen kecil (51 bp, 12 bp dan 8 bp), dimana fragmen besar kemudian dipurifikasi dan diligasikan menjadi satu. Fragmen kecil harus dipisahkan dari fragmen besar karena dapat mengganggu proses ligasi. Bila tidak dipisahkan, dapat terjadi banyak pembentukan kembali plasmid kosong (penggabungan kembali plasmid hasil restriksi dengan fragmen kecil dari hasil pemotongan plasmid) atau DNA linear (penggabungan antara plasmid hasil restriksi atau gen target hasil restriksi dengan fragmen kecil dari hasil pemotongan gen target) pada hasil ligasi sehingga akan kecil kemungkinan terdapatnya plasmid rekombinan *pMMB_BS UW32_10175*.

Proses transformasi dilakukan dengan metode *Heat Shock* karena metode ini merupakan metode yang paling umum, mudah digunakan dan memiliki tingkat keberhasilan yang cukup tinggi. Melalui kontrol negatif (sel kompeten *E. coli* Origami dan *DH5 α*) dapat disimpulkan bahwa sel yang tidak ditransformasi tidak dapat tumbuh pada media LB-Amp (Gambar 6), oleh karena itu keberhasilan transformasi dapat dipastikan dengan adanya pertumbuhan pada media agar LB-Amp yang digunakan. Dari hasil percobaan, terdapat pertumbuhan koloni pada *E. coli* Origami dan *DH5 α*

yang ditransformasi dengan plasmid rekombinan (Gambar 4), kontrol *E. coli* Origami dan *DH5 α* yang ditransformasi dengan plasmid kosong (Gambar 5) dan kontrol ligasi (Gambar 7). Dalam hal ini, dapat dinyatakan bahwa proses transformasi berhasil. Adanya pertumbuhan pada kontrol *E. coli* Origami dan *DH5 α* yang ditransformasi dengan plasmid kosong menandakan bahwa keberadaan plasmid kosong memang memberikan resistensi terhadap antibiotik ampisilin, sehingga sel kompeten yang tertransformasi dapat tumbuh. Adanya pertumbuhan pada kontrol ligasi menunjukkan bahwa masih terdapat plasmid kosong pada campuran ligasi yang digunakan.

Keberadaan klon positif (sel yang tertransformasi oleh plasmid rekombinan *pMMB_BS UW32_10175*) dapat dideteksi dengan analisis transforman. Semua koloni hasil transformasi yang tumbuh pada media perlu dipastikan karena koloni – koloni tersebut belum tentu tumbuh karena tertransformasi oleh plasmid rekombinan (karena dapat juga tumbuh karena plasmid kosong), karena itu perlu dilakukan analisis transforman untuk memastikan adanya klon positif. Secara perhitungan, keberadaan klon positif ditandai dengan munculnya band DNA berukuran 758 bp pada hasil elektroforesis untuk *colony PCR* dengan primer untuk isolasi gen BSUW23_10175 dan 1258 bp pada hasil elektroforesis untuk *colony PCR* dengan primer plasmid *pMMB67EH*. Hasil penelitian menunjukkan adanya band DNA berukuran ± 750 bp untuk *colony PCR* dengan primer yang digunakan untuk isolasi gen BSUW23_10175 (Gambar 9) dan band berukuran $\pm 1,3$ kb pada *colony PCR* dengan primer plasmid *pMMB67EH* (Gambar 8) menandakan bahwa hasil percobaan ini telah sesuai dengan perhitungan, karena itu dapat

disimpulkan bahwa transforman *E. coli* Origami koloni 8 dan 9 merupakan klon transforman positif. Tidak terdapat klon positif pada transforman *E. coli* *DH5a* (Gambar tidak disertakan). Kegagalan proses transformasi plasmid rekombinan pada *E. coli* *DH5a* kemungkinan disebabkan karena sifat sel *E. coli* *DH5a* yang sulit menerima plasmid dari luar.

Setelah dianalisis dengan PCR dengan pasangan primer spesifik, selanjutnya plasmid rekombinan pada klon positif diisolasi untuk dipastikan lebih lanjut dengan analisis restriksi. Menurut perhitungan, hasil yang benar ditandai dengan munculnya band 9515 bp untuk hasil pemotongan dengan Enzim restriksi *HindIII*, *EcoRI* dan *XbaI*. Pada hasil pemotongan plasmid rekombinan dengan *HindIII* dan *EcoRI* sekaligus, menurut perhitungan hasil yang benar ditandai dengan munculnya 2 band dengan ukuran 738 bp dan 8777 bp. Hasil percobaan yang didapat telah sesuai dengan perhitungan dimana terdapat band dengan ukuran sekitar 9,5 kb untuk hasil pemotongan dengan Enzim restriksi *HindIII*, *EcoRI* dan *XbaI* (Gambar 10) dan 2 band berukuran sekitar 730 bp dan 8,7 kb pada hasil pemotongan dengan kedua enzim restriksi sekaligus (*HindIII* dan *EcoRI*). Karena itu dapat disimpulkan bahwa plasmid rekombinan dalam sel *E. coli* Origami transforman telah sesuai perhitungan.

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas penguraian enzim selulosa pada *E. coli* Origami *pMMB_BS UW23_10175* dengan kontrol *B. subtilis* *sp. spizizenii* *W23* (kontrol positif) dan *E. coli* Origami yang membawa plasmid kosong (kontrol negatif). Hal ini ditujukan untuk mengetahui apakah gen *insert* yang disisipkan pada vektor dan ditransformasikan dalam *E. coli* Origami berpengaruh pada aktivitas selulolitik sel

transforman. Metode deteksi yang digunakan adalah metode gula reduksi, karena produk yang dideteksi adalah glukosa hasil penguraian substrat selulosa (CMC).

Berdasarkan hasil percobaan, diketahui transforman *E. coli* Origami koloni 8 dan 9 memiliki nilai uji gula reduksi yang lebih tinggi dari pada kontrol negatif (Gambar 11). Kontrol negatif pada uji ini memperlihatkan hasil yang konstan (hampir stationer). Dari hal ini dapat disimpulkan sel yang tertransformasi oleh plasmid rekombinan *pMMB_BS UW23_10175* (*E. coli* Origami koloni 8 dan 9) memiliki aktivitas penguraian selulosa yang lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif. Berdasarkan hasil uji gula reduksi juga dapat disimpulkan bahwa kemampuan aktivitas enzim endo-beta-1,3-1,4 glukonase pada transforman koloni Origami 8 dan 9 hampir sama, ditandai dengan tidak ada beda yang cukup signifikan pada kedua hasil uji (Gambar 11). Perbedaan aktivitas yang besar antara kontrol positif dengan transforman *E. coli* Origami koloni 8 dan 9 kemungkinan disebabkan karena perbedaan jumlah gen selulase yang dimiliki oleh *B. subtilis* *sp. spizizenii* dan transforman *E. coli* Origami koloni 8 dan 9. Menurut perhitungan, *B. subtilis* *sp. spizizenii* *W23* memiliki banyak gen yang dapat mengkodekan enzim selulase sehingga mampu mendegradasi berbagai campuran substrat selulosa dan hemiselulosa dengan baik (Amore *et al.*, 2012), sedangkan transforman koloni Origami 8 dan 9 memiliki gen yang mengkodekan enzim selulase yang berasal dari plasmid rekombinan. Terdapat juga kemungkinan dimana enzim selulolitik yang diekspresikan koloni positif belum optimal sehingga aktivitasnya rendah.

Berdasarkan hasil percobaan pereaksian

setelah pelet sel disonikasi, terdapat kenaikan aktivitas pada hari ke satu dan tiga, namun terjadi penurunan pada hari ke dua. Kenaikan maupun penurunan di hari ke satu sampai tiga ini ternyata tidak signifikan menurut perhitungan. Dalam hal ini kemungkinan, enzim tidak berada pada kondisi optimum sehingga tidak mencapai aktivitas yang diinginkan (tidak signifikan). Selain itu, terdapat kemungkinan bahwa penambahan IPTG yang hanya di hari ke-0 saja mempengaruhi ekspresi enzim selulolitik pada plasmid.

Berdasarkan uji aktivitas supernatan yang direaksikan dengan substrat selulosa (CMC), kontrol positif dan kontrol negatif pada uji ini memperlihatkan hasil yang konstan. Kontrol positif diduga tidak menghasilkan enzim selulase karena media tanamnya tidak mengandung substrat selulosa. Pada transforman *E. coli* Origami koloni 8 dan 9 terdapat aktivitas yang sedikit lebih tinggi pada pengujian supernatan. Dalam hal ini diduga transforman *E. coli* Origami koloni 8 dan 9 yang merupakan klon positif mengekspresikan suatu enzim selulolitik dari plasmid rekombinan karena penambahan IPTG. Hal ini diperkuat dengan perhitungan yang menyatakan bahwa kenaikan dari hari ke satu sampai tiga tidak signifikan dimana penambahan IPTG hanya dilakukan pada hari ke-0.

Untuk lebih memastikan bahwa aktivitas penguraian selulosa pada klon positif memang merupakan hasil ekspresi dari plasmid rekombinan *pMMB_BS UW23_10175* perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan cara melakukan SDS-PAGE pada protein yang dihasilkan oleh klon positif. Selain itu karakterisasi sifat – sifat enzim yang diekspresikan juga perlu dilakukan. Metode yang digunakan dapat dengan uji yang telah dilakukan pada penelitian ini yaitu uji aktivitas penguraian

selulosa. Parameter yang diuji pada uji aktivitas penguraian selulosa lebih lanjut adalah pH optimum, suhu optimum dan waktu ekspresi optimum. Untuk penelitian yang lebih jauh, sebaiknya dicoba dilakukan transformasi plasmid rekombinan pada bakteri lain yang lebih produktif. Metode transformasi yang digunakan adalah *heat shock* atau elektroporasi.

Gen pengkode enzim endo- β -1,3-1,4 glukanase dari *B. subtilis subsp. spizizenii W23* dapat diklon pada plasmid *pMMB67EH* pada sel inang *Escherichia coli* Origami. Diperoleh dua klon transforman *E. coli* Origami yang telah berhasil ditransformasi dengan plasmid rekombinan (*pMMB_BS UW23_10175*). Berdasarkan uji aktivitas penguraian selulosa, transforman *E. coli* Origami *pMMB_BS UW23_10175* nomor 8 dan 9 mempunyai aktivitas penguraian selulosa setelah diinduksi dengan IPTG (*isopropyl- β -D-thiogalactosidase*).

Perlu dilakukan permurnian enzim dan karakterisasi sifat – sifat katalitik enzim yang diekspresikan, seperti waktu ekspresi optimum, suhu optimum, pH optimum dan lain - lain. Untuk penelitian yang lebih jauh, perlu dilakukan penelitian mengenai pemanfaatan plasmid rekombinan, seperti mencoba melakukan transformasi plasmid rekombinan *pMMB_BS UW23_10175* pada bakteri lain yang lebih produktif.

Daftar Pustaka

Amore, Antonella, Olimpia Pepe, Valeria Ventrino, Leila Birolo, Chiara Giangrande and Vincenza Faraco FEMS Microbiol Lett. 2012. Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. Diakses dari http://pubget.com/paper/23181595/Industrial_

- waste_based_compost_as_a_source_of_novel_cellulolytic_strains_and_enzymes. Diakses pada 11 Januari 2013.
- DIBY, Paul, Kanamparambil Augusthy SAJU, Pulikottil John JISHA, Yammanuru Ramalinga SARMA, Aundy KUMAR and Muthuswamy ANANDARAJ. 2005. Mycolytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* dan *Trichoderma* spp. Against *Phytophthora capsici*, the foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.). Diakses dari http://www.annmicro.unimi.it/full/55/diby_55_129-133.pdf. Diakses pada 6 Mei 2012.
- Chander, Ramesh Kuhad, Rishi Gupta, and Ajay Singh. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research Volume 2011* (2011), Article ID 280696.
- Fruste, J. P., W. Pansegrau, R. Frank, H. Blöcker, P. Scholz, M. Bagdasarian and E. Lanka 1986. Molecular Cloning of the Plasmid RP4 Primase Region in a Multi-host range tacP Expression Vector. *Gene* 48, 119–131.
- Gram, Hans Christian. 1884. The Differential Staining of Schizomycetes in Tissue Sections and in Dried Preparations. *Fortschritte der Medicin*. 2:185-189.
- Khairil. 2009. Lignoselulosa. Diakses dari <http://khairilfuture.multiply.com/journal/item/7>. Diunduh pada 6 Mei 2012.
- Modi, HA. 2010. Regulation of Exoglucanase and Endoglucanase Biosynthesis in *Streptomyces* Species. Diakses dari : <http://journal-advances-developmental-research.com/wp-content/uploads/2010/06/Regulation-of-Exoglucanase-and-Endoglucanase-Biosynthesis-in-Streptomyces-Species-Modi-HA.pdf>. Diunduh pada 6 Mei 2012.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning I: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Soetrisno. 2008. Sumber bahan bakar hayati langsung dari selulosa. Diakses dari : http://www.chem-is-try.org/artikel_kimia/kimia_material/sumber-bahan-bakar-hayati-langsung-dari-selulosa/. Diakses pada : 6 Mei 2012.
- Pecinta lingkungan hidup siklus ITS. 2010. Mengembangkan bioetanol dari selulosa. Diakses dari : <http://siklus.lmb.its.ac.id/?p=71>. Diakses pada : 6 Mei 2012.
- Daniel R. Zeigler, Zoltán Prágai, Sabrina Rodriguez, Bastien Chevreux, Andrea Muffler, Thomas Albert, Renyuan Bai, Markus Wyss and John B. Perkins. 2008. The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. Diakses dari : http://jb.asm.org/content/190/21/6983.abstract?ijkey=05bef429089ec10c2d0a49d1d7956b3c3f106bfc&keytype2=tf_ipsecsha. Diakses pada : 10 Januari 2013.