

Kajian Ekspresi Gen α -amilase untuk Mendapatkan Isolat Bakteri Rekombinan Pembawa Gen α -amilase

Nur Richana dan Ahmad Thontowi

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi koloni positif pembawa gen α -amilase dan membentuk sistem *over expression*. Untuk mendeteksi adanya sel rekombinan dilakukan uji α -komplementasi pada koloni bakteri rekombinan. Sistem *over expression* dibuat dengan tahap isolasi DNA plasmid pUKC 815, pemo-tongan DNA plasmid pUKC 815 dengan *Bam*HI, elektroelusi fragmen 8.000 pb plasmid pUKC 815, reaksi ligasi fragmen 8.000 pb plasmid pUKC 815, dan transformasi plasmid pUKC 815 ke sel *Escherichia coli* DH5 α . Hasil penelitian diperoleh 2 isolat rekombinan pembawa gen α -amilase mesofilik. Sampai saat ini, sistem *over expression* dibuat hingga tahap penyiapan plasmid pUKC 815 sebagai vektor ekspresi untuk gen α -amilase.

Kata kunci: Ekspresi, gen α -amilase

ABSTRACT

The purpose of this research were to selected positive colonies that including α -amylase genes and to make over expression system. Detection of recombinant cells was α -complementation test. Steps of over expression system were isolated pUKC 815 plasmid DNA, restricted with *Bam*HI, electroeluted and ligated of 8000 pb pUKC 815 plasmid fragment, and transformed into *Escherichia coli* DH5 α . The results indicated were two recombinant colonies that including α -amylase genes. Until now, over expression system was prepared pUKC 815 plasmid as expression vector for α -amylase genes.

Key words: Expression, α -amylase gene

PENDAHULUAN

Gen penyandi α -amilase diperoleh melalui teknik *random (shotgun)* untuk membentuk pustaka genom. Pustaka genom merupakan kumpulan fragmen DNA yang disisipkan ke sebuah vektor (plasmid) (Kartiko, 1990). Pustaka genom dilakukan untuk mengambil gen pembawa sifat spesifik dari organisme dan mempelajari sifat-sifat dasar biologi molekuler, seperti struktur dan fungsi gen. Gen yang diperoleh dari pustaka genom dapat digunakan untuk memproduksi senyawa tertentu dalam jumlah besar (Shahib, 1990). Hasil penelitian Mielenz dan Susan (1983) diperoleh pustaka genom α -amilase dengan mentransformasikan α -amilase termostabil dari *Bacillus stearothermophilus* ke dalam *Escherichia coli*. Selain itu Kaneko *et al.* (1996)

melaporkan bahwa α -amilase telah diekspresikan di *Aspergillus kawachii* IFO 4308.

Saat ini telah dilakukan pembuatan pustaka genom α -amilase dari isolat bakteri lokal unggul koleksi Balitbio dalam *E. coli* DH5 α . Koloni yang terbentuk dalam pustaka genom ini perlu diseleksi untuk mengetahui tingkat keberhasilan transformasinya.

Ekspresi gen α -amilase perlu ditingkatkan dengan meletakkan gen tersebut di depan suatu promotor kuat yang mampu menginduksi proses transkripsi dan translasinya. Hasil penelitian Luo-J (1994) menunjukkan bahwa ekspresi amilase meningkat di bawah kontrol promotor PGK (phosphoglycerate kinase). Menurut Guthrie dan Fink (1991), gen PGK mampu merespon sumber karbon dan fosfat organik. Kemampuan ini meningkatkan fungsi α -amilase untuk mengubah pati sebagai sumber karbon menjadi oligosakarida dan maltosa.

Vektor plasmid yang mempunyai fragmen PGK ialah plasmid *pUKC 815* yang merupakan vektor ulang-alik (*shuttle vector*). Plasmid *pUKC 815* dapat digunakan sebagai vektor ekspresi dengan penghilangan gen *LacZ*, sehingga gen α -amilase dapat diinsersikan tepat di bawah kontrol gen PGK. Selain itu, *pUKC 815* mempunyai penanda genetik resistensi ampisilin sebagai seleksi rekombinan di *E. coli*.

Berdasarkan pertimbangan bahwa pustaka genom gen α -amilase telah diperoleh, maka untuk meningkatkan ekspresi gen α -amilase dilakukan seleksi positif koloni pembawa gen α -amilase dan pembentukan sistem *over expression*. Bakteri rekombinan pembawa gen α -amilase selanjutnya digunakan dalam produksi α -amilase, sehingga produksi dan aktivitas enzim menjadi tinggi.

BAHAN DAN METODE

Seleksi Klon Positif Pembawa Gen α -amilase

Untuk mendeteksi adanya sel rekombinan, dilakukan uji α -komplementasi yang memberikan warna biru dan putih pada koloni bakteri dengan penambahan IPTG dan X-Gal. Pengujian dilakukan dengan cara 1 ml sel transforman disentrifugasi pada 10.000 g selama 5 menit. Pelet yang terbentuk diresuspensi dengan 25 μ l IPTG dan 25 μ l X-Gal hingga homogen dan ditanam dengan metode pour plate pada permukaan media LB padat yang mengandung 100 μ g/ml ampisilin serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Transforman positif pembawa α -amilase merupakan isolat bakteri rekombinan.

Pembuatan Sistem *Over Expression* Gen α -amilase

Pembuatan Vektor Ekspresi

Suspensi biakan bakteri dimikrosentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit. Pelet dikeringkan dan ditambahkan 200 μ l *cell resuspension solution*. Kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml. *Cell lysis solution* sebanyak 200 μ l ditambahkan dan tabung dibalik-balikkan sehingga terbentuk suspensi jer-nih. Selanjutnya ditambahkan 400 μ l *neutralization solution* dan tabung dibalik-balikkan serta diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Sentrifugasi lisat pada 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh mengandung plasmid dan dimurnikan dengan *mini column* yang mengandung *resin*. Untuk menghilangkan gen *LacZ*, DNA plasmid *pUKC 815* dipotong dengan *Bam*HI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Reaksi enzim dihentikan dengan pemanasan pada suhu 70°C selama 15 menit.

Pemurnian fragmen 8.000 pb plasmid *pUKC 815* dilakukan dengan menggunakan prosedur *USBioclean*MP. Potongan agarosa yang mengandung fragmen 8.000 pb dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Agarosa dipotong kecil-kecil untuk memudahkan pelarutan. Larutan NaI 6 M sebanyak 3 kali volume agarosa di-tambahkan dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 3-5 menit. Selanjutnya ditam-bahkan 5 μ l *glass powder* untuk 0,1-2,5 μ g DNA. Campuran ini dihomogenkan dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Sentrifugasi pelan selama 1 menit, kemudian pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol 50% sebanyak 50 kali volume *glass powder* dan disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 1 menit. Pelet yang mengandung DNA disuspensikan dalam bufer TE dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan disimpan pada suhu -20°C.

Fragmen 8.000 pb DNA plasmid *pUKC 815* diligasi untuk menyambung ujung-ujung lengket dari fragmen tersebut, sehingga terbentuk DNA plasmid *closed covalently circulair* (ccc). Ligasi dilakukan dengan mencampur bufer ligasi 10 kali, 0,5 mM DTT, 10 mM ATP, fragmen 8.000 pb DNA plasmid *pUKC 815*, dan enzim T₄ DNA ligase kemudian diinkubasi pada suhu 16°C selama 16 jam.

Transformasi dilakukan dengan mencampurkan 5 μ l DNA plasmid *pUKC 815* (10% dalam bufer Tris HCl pH 7,0) dengan 200 μ l sel kompeten. Campuran disimpan dalam es selama 2 jam. Kemudian dilakukan kejutan panas pada suhu 42°C selama 2 menit. Selanjutnya campuran disimpan dalam es selama 5 menit dan di-tambahkan media LB cair hingga volume total 1 ml. Sel transforman diaktifkan de-ngan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan ditanam dalam media LB padat yang mengandung ampicilin 100 μ g/ml.

Isolasi Gen α -Amilase dari *E. Coli* DH5 α Rekombinan

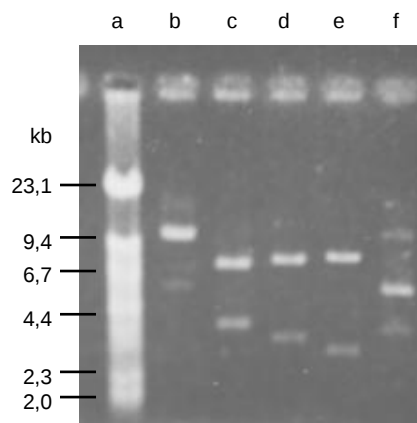
Plasmid *pUC19* rekombinan dipotong dengan enzim *Eco*RI kemudian frag-men DNA pembawa α -amilase dielektroelusi menggunakan *USBioclean kit*. Frag-men yang diperoleh diligasikan dengan plasmid *pUKC 815* yang telah dihilangkan segmen gen *LacZ*nya. Plasmid *pUKC 815* mempunyai promotor PGK. Kemudian plasmid *pUKC 815* rekombinan ditransformasikan ke dalam sel *E. coli* DH5 α . Transformasi dilakukan secara kimiawi menurut

metode Sambrook *et al.* (1989). Sebanyak 100 µl sel kompeten inang dicampurkan dengan 10 µl DNA hasil ligasi dalam tabung eppendorf dan diinkubasi dalam es selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan kejutan panas pada suhu 42°C selama 2 menit, kemudian ditambahkan media LB cair hingga volume 1 ml. Sel diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Untuk mendeteksi adanya sel rekombinan, dilakukan uji α -komplementasi yang akan memberikan warna biru dan putih pada koloni bakteri dengan adanya penambahan IPTG dan X-Gal. Pengujian dilakukan dengan cara 1 ml sel transforman disentrifugasi pada 10.000 g selama 5 menit. Pelet yang terbentuk diresuspensi dengan 25 µl IPTG dan 25 µl X-Gal hingga homogen dan ditanam dengan metode pour plate pada permukaan media LB padat yang mengandung 100 µg/ml ampicilin serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Transforman positif pembawa α -amilase merupakan isolat bakteri rekombinan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA plasmid yang diperoleh dari isolasi, dielektroforesis dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 1. Dari gambar tersebut diperoleh data yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan terbentuknya 3 fragmen dari hasil isolasi *miniprep kit Wizard*. Ketiga fragmen tersebut masing-masing mempunyai bentuk yang berbeda. Fragmen yang berukuran ± 15.000 dan ± 10.000 pb berbentuk linier atau *open circular*, sedangkan fragmen yang



a = DNA λ yang dipotong oleh enzim *HindIII*, b = plasmid pUKC 815 (utuh), c = plasmid pUKC 815 dipotong oleh enzim *EcoRI*, d = plasmid pUKC 815 dipotong oleh enzim *EcoRV*, e = plasmid pUKC 815 dipotong oleh enzim *BamHI*, f = plasmid pUKC 815 hasil isolasi dan pemurnian *miniprep kit Wizard*

Gambar 1. Hasil isolasi dan karakterisasi DNA plasmid pUKC 815

Tabel 1. Hasil isolasi *miniprep kit Wizard* DNA plasmid *pUKC 815*

Gambar	Jumlah pita	Ukuran fragmen (pb)
b	3	±15.000
		±10.000
		±5.000
f	3	±10.000
		±5.000
		±3.000

Tabel 2. Karakterisasi DNA plasmid *pUKC 815* hasil isolasi *miniprep kit Wizard*

Enzim restriksi	Jumlah pita	Fragamen (pb)
<i>EcoRI</i>	2	±7.300
		±3.900
<i>EcoRV</i>	2	±5.650
		±5.550
<i>BamHI</i>	2	±8.000
		±3.200

berukuran ±5.000 pb dan ±3.000 pb merupakan plasmid yang berbentuk superkoil. Plasmid ini bersifat kompak sehingga lebih mudah bergerak dibandingkan plasmid yang berbentuk linier terbuka (Old dan Primrose, 1989). Dari hasil tersebut, diperoleh suatu plasmid dari tahap isolasi DNA dengan *miniprep kit Wizard*.

Untuk memastikan bahwa DNA plasmid yang diperoleh adalah *pUKC 815* maka dilakukan karakterisasi dengan enzim *EcoRI*, *EcoRV*, dan *BamHI* (Tabel 2). Plasmid yang dipotong dengan enzim *EcoRI* menghasilkan 2 fragmen dengan ukuran ±7.300 dan ±3.900 pb (Tabel 2). Pemotongan dengan enzim *EcoRV* menghasilkan 2 fragmen berukuran ±8.000 dan ±3.200 pb. Peta restriksi plasmid *pUKC 815* menunjukkan bahwa enzim *EcoRI*, *EcoRV*, dan *BamHI* masing-masing mempunyai 2 sisi pemotongan (Gambar 2). Sehingga hasil pemotongan dengan enzim tersebut masing-masing menghasilkan 2 fragmen. Berdasarkan hal tersebut dapat dipastikan bahwa DNA plasmid hasil isolasi *miniprep kit Wizard* adalah DNA plasmid *pUKC 815*.

Penyiapan plasmid *pUKC 815* sebagai vektor ekspresi dilakukan dengan penghilangan gen *LacZ* melalui pemotongan DNA plasmid *pUKC 815* menggunakan enzim restriksi *BamHI*.

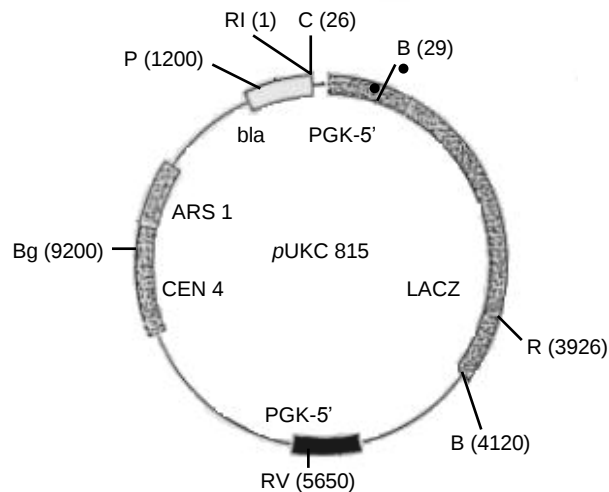
Pemilihan enzim *BamHI* disebabkan karena enzim ini mengenal 2 sisi potong terhadap DNA plasmid *pUKC 815*. Sisi pemotongan ini terletak pada gen *LacZ*, sehingga DNA plasmid *pUKC 815* yang dipotong dengan *BamHI* menghasilkan fragmen berukuran ±3.200 (berisi gen *LacZ*) dan ±8.000 pb yang disiapkan sebagai vektor ekspresi. Selain itu, hasil pemotongan oleh enzim ini bersifat *compatible* dengan fragmen DNA kromosom yang telah dipotong oleh

enzim *Sau3AI*, karena tiap fragmennya mempunyai ujung lengket yang komplementer (Brown, 1991). Sisi pemotongan *BamHI* dan *Sau3AI* ialah

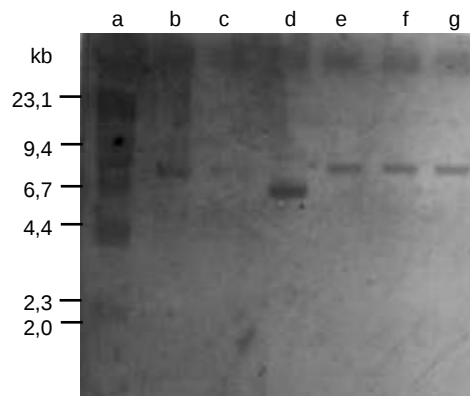
<i>BamHI</i>	<i>Sau3AI</i>
(5') NN G GATCC NN (3')	(5') NNN GATC NNN
(3') NN CCTAG G NN (5')	(3')
	(3') NNN CTAG NNN
	(5')

Hasil elektroelusi fragmen ± 8.000 pb dari pemotongan plasmid *pUKC 815* menggunakan *BamHI* ialah satu pita berukuran ± 8.000 pb (Gambar 3). Fragmen inilah yang mengandung promotor PGK dan dipersiapkan sebagai vektor ekspresi.

Reaksi ligasi dilakukan untuk menyambung kembali ujung-ujung lengket fragmen 8.000 pb DNA plasmid *pUKC 815*. Hasil proses ligasi, selanjutnya ditrans-formasikan ke sel *E. coli* DH5 α .



Gambar 2. Peta restriksi plasmid *pUKC 815*



a = DNA λ yang dipotong oleh enzim *HindIII*, b = Plasmid *pUKC 815* (utuh), c = plasmid *pUKC 815* dipotong oleh enzim *BamHI*, d = plasmid *pUKC 815* tanpa gen *LacZ* (*pUKC 814*), e = plasmid *pUKC 815* dipotong oleh enzim *BamHI*, f = plasmid *pUKC 815* dipotong oleh enzim *ClaI*, g = plasmid *pUKC 815* dipotong oleh enzim *EcoRI*

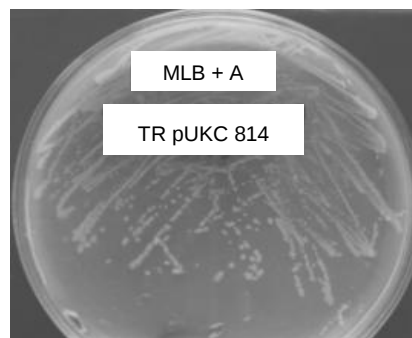
Gambar 3. Hasil isolasi *miniprep kit Wizard* DNA plasmid *pUKC 815* 8.000 pb

Enzim T_4 DNA ligase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara ujung 5' fosfat dan 3' hidroksil dari nukleotida yang berdekatan. Pemberian enzim ini mampu membentuk kompleks enzim AMP yang selanjutnya terikat pada *nick* (daerah putus). Hal ini berakibat ujung 5' fosfat dengan 3' hidroksil dari fragmen 8.000 pb DNA plasmid *pUKC 815* bersatu membentuk ikatan kovalen fosfodiester.

Transformasi DNA plasmid *pUKC 815* 8.000 pb ke dalam sel *E. coli* DH5 α . *E. coli* DH5 α merupakan salah satu jenis *E. coli* yang telah mengalami rekayasa sehingga mampu mengenali gen *bla* (β -laktamase) sebagai penanda resistensi ampisilin. Hasil penelitian Cohen *et al.* (1972) dalam Old dan Primrose (1989) menyatakan bahwa sel *E. coli* yang diperlakukan dengan CaCl₂ merupakan penerima-ma efektif bagi DNA plasmid. CaCl₂ mempengaruhi dinding sel dan mengikatkan DNA ke permukaan sel. Hasil penelitian Mandel dan Higa (1970) dalam Old dan Primrose (1989) menyatakan, bahwa bila diperlakukan dengan CaCl₂, sel *E. coli* dapat mengambil DNA dari bakteriofag dan DNA plasmid. Kedua alasan inilah yang mendasari pemilihan *E. coli* DH5 α sebagai sel inang dalam penelitian. Perbanyakkan koloni tersebut menghasilkan sel transforman dalam jumlah banyak, sebagaimana disajikan pada Gambar 4.

Untuk memastikan bahwa sel yang tumbuh adalah sel transforman *E. coli* DH5 α (berisi DNA plasmid *pUKC 815* 8.000 pb) maka dilakukan isolasi terhadap DNA plasmid dari sel *E. coli* DH5 α . Dari koloni yang tumbuh, hasil transformasi di-tumbuhkan dalam media LB cair yang mengandung ampisilin (100 μ g/l). Penambahan ampisilin ini bertujuan untuk mencegah tumbuhnya *E. coli* DH5 α yang bukan transforman. Sel transforman *E. coli* DH5 α mampu tumbuh pada media LB cair berampisilin karena mengandung plasmid *pUKC 815* yang membawa sifat resistensi terhadap ampisilin. Isolasi dilakukan dengan *miniprep kit Wizard*. Hasil isolasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel sebagaimana terlihat pada Gambar 3. Dari Gambar tersebut diperoleh data yang disajikan pada Tabel 3.

Karakterisasi dengan enzim *Bam*HI, *Cla*I, dan *Eco*RI masing-masing menghasilkan satu fragmen berukuran $\pm$ 8.000 pb. Hasil ini diperoleh karena DNA plasmid *pUKC 815* 8.000 pb dikenal hanya pada satu sisi potong oleh ketiga enzim restriksi tersebut. Hal ini berbeda dengan hasil pemotongan oleh enzim *Eco*RI pada plasmid *pUKC 815* yang menghasilkan 2 fragmen. Hal ini disebabkan terdapat 2 sisi potong untuk enzim *Eco*RI pada *pUKC 815*. Satu sisi potong enzim *Eco*RI ini hilang, karena sisi tersebut terdapat pada gen



Gambar 4. Hasil transformasi DNA plasmid *pUKC 814* (*pUKC 815* tanpa gen *LacZ*) ke sel *E. coli* DH5 α .

Tabel 3. Hasil isolasi *miniprep kit Wizard* dan karakterisasi DNA plasmid *pUKC 815* 8.000 pb

Gambar	Jumlah pita	Ukuran fragmen (pb)
b	2	±8.000 ±7.900
c	2	±8.000 ±3.200
d	3	±8.200 ±8.000 ±6.000
e	1	±8.000
f	1	±8.000
g	1	±8.000

LacZ yang telah dihilangkan pada langkah elektro-elusi fragmen 8.000 pb plasmid *pUKC 815*. Dari data tersebut, dapat dinyatakan bahwa DNA plasmid yang diperoleh dari hasil isolasi *miniprep kit Wizard* adalah DNA plasmid *pUKC 815* 8.000 pb. DNA plasmid *pUKC 815* 8.000 pb inilah yang di-siapkan sebagai vektor ekspresi untuk α -amilase.

KESIMPULAN

1. Diperoleh 2 isolat rekombinan pembawa gen α -amilase mesofilik.
2. Telah disiapkan plasmid *pUKC 815* yang telah dihilangkan fragmen *LacZ* sebagai vektor ekspresi.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.A. 1991.** Pengantar kloning gen. Yayasan Essentia Medica. Yogyakarta. Cetakan ke-1. hlm. 11-16.
- Guthrie, C. and R.G. Fink. 1991.** Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press. New York. 327 p.
- Kaneko, A.S., T.S. Shigetoshi, T. Yuko, I. Gakuzo, Takeaki, and O. Toshiteru. 1996.** Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of a gene encoding and acid stable α -amylase from *Aspergillus kawachii*. J. Ferment. Bioeng. 81:292-298.
- Kartiko, H. 1990.** Teknik rekombinasi DNA. PAU-Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 388-389.
- Luo-J. 1994.** Expression and secretion α -amilase in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature. Vol. 64

- Mielenz, J.R. and M. Susan. 1983.** Process for cloning the gene coding for a thermostable α -amylase into *E. coli* and *B. subtilis*. United States Patent. CPC International Inc. Englewood Cliffs.
- Old, R.W. dan Primrose. 1989.** Prinsip-prinsip manipulasi gen. Pengantar Rekayasa Genetik Edisi ke-4. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta.
- Sambrook, J., E.F. Fritsh, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning. A Laboratory Manual 1:134.
- Shahib, N.M. 1990.** Dasar-dasar rekombinasi DNA. PAU-Bioteknologi ITB. Bandung.