

Subkloning gen lipase menggunakan teknik pcr dari sistem escherichia coli dh5alfa ke sistem bacillus subtilis db104 = Subcloning of lipase gene with pcr technique from escherichia coli dh5alfa system into bacillus subtilis db104 system

Septi Anggraini Sugiarti, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20477301&lokasi=lokal>

Abstrak

ABSTRAK

Enzim lipase EC 3.1.1.3, triasilgliserol asilhidrolase merupakan kelompok enzim yang menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Selain itu, enzim lipase berperan dalam berbagai reaksi, seperti reaksi esterifikasi, interesterifikasi, dan transesterifikasi. Penelitian ini bertujuan melakukan subkloning gen lipase Bacillus subtilis dari vektor pGEMlipA ke dalam vektor pSKE xyn AQ1 dengan metode Exponential Megapriming PCR EMP dan transformasi vektor pSKE xynlipA rekombinan ke Bacillus subtilis DB104. Megaprimers yang digunakan untuk EMP disintesa melalui reaksi PCR menggunakan primer spesifik gen lipase yang didesain berdasarkan deret nukleotida gen lipA dan xynAQ1 sedemikian rupa sehingga merupakan gabungan deret nukleotida kedua gen tersebut, dengan vektor pGEMlipA sebagai template DNA. Produk PCR yang dihasilkan berukuran 792 pb selanjutnya digunakan sebagai megaprimers untuk EMP dengan vektor pSKE xynAQ1 sebagai template DNA. Produk EMP yang dihasilkan pSKE xynlipA kemudian ditransformasikan ke dalam E. coli DH5 ? ?. Tahap selanjutnya vektor diekstraksi dari E. coli untuk ditransformasikan ke dalam B. subtilis DB104 dengan metode protoplasting dilanjutkan dengan tahap integrasi gen lipA ke dalam kromosom B. subtilis DB104. Kloning gen lipase ke dalam vektor pSKE xynAQ1 dengan metode EMP telah berhasil dengan diperolehnya pita berukuran sesuai harapan, yaitu 7849 pb. Produk EMP tersebut berhasil mentransformasi E. coli DH5 ? ? yang tumbuh pada media LB yang mengandung ampisilin. Seleksi kualitatif klon positif menggunakan media agar mengandung asam tributirat TBA, tri-butyric acid berhasil mendapatkan 1 klon yang menghasilkan zona bening. Plasmid rekombinan yang diisolasi dari klon tersebut berhasil ditransformasikan ke dalam B. subtilis DB104 pada media DM3 mengandung eritromisin. Analisis menggunakan enzim restriksi PstI terhadap plasmid pSKE xynlipA yang diekstraksi dari beberapa transforman B. subtilis diperoleh 1 koloni rekombinan positif yang mengandung DNA target. Eksperimen integrasi kromosom menghasilkan pertumbuhan koloni pada media LB dengan berbagai konsentrasi eritromisin yaitu LB tanpa eritromisin, LB eritromisin 0,5 g/ mL, dan LB eritromisin 5 g/ mL. Analisis terhadap klon integran positif dilakukan dengan PCR genom, namun hasil penelitian menunjukkan belum didapatkan klon positif dari 60 klon yang tumbuh pada media LB tanpa eritromisin.

<hr>

ABSTRACT

Enzyme lipase EC 3.1.1.3, triacylglycerol acylhydrolase is a group of enzymes that hydrolyzed fat into fatty acids and glycerol. In addition, the lipase enzyme plays a role in various reactions, such as esterification, interesterification, and transesterification reactions. The present study was conducted to subclone the Bacillus subtilis lipase gene lipA cloned in the pGEMlipA recombinant vector into pSKE xynAQ1 recombinant vector by EMP method and to transform the resulted pSKE xynlipA recombinant vector into Bacillus subtilis

DB104. Megaprimer used in the EMP was synthesized by PCR using a pair of gen specific primer designed based on lipA and xynAq1 nucleotide sequences so that the oligonucleotide is a combination of both nucleotide sequences, with pGEMlipA served as DNA template. The resulted PCR product was used as megaprimer for the EMP with the pSKExynAq1 recombinant vector served as DNA template. The resulted EMP product pSKExynlipA was used to transform E. coli DH5 . The recombinant vector was then extracted from E. coli to be transformed into B. subtilis DB104 by the method of protoplasting followed by integration of the lipase gen into the B. subtilis DB104 chromosome. EMP Cloning of the lipase gene into the pSKExynAQ1 vector has been successfully conducted that resulted in specific band of 7849 bp. The EMP product was successfully transformed E. coli colonies grew on LB media containing ampicillin. Qualitative selection of positive colonies using TBA tri butyric acid agar media resulted in 1 positive clone clone 1 that produced a clear zone. The recombinant plasmid has been successfully transformed into B. subtilis DB104 using protoplasting method. Analyzed recombinant with digestion using PstI restriction enzyme showed 1 colony as positive recombinant containing target DNA. The result of chromosome integration showed colonies growing on LB medium with various erythromycin concentrations, LB without erythromycin, LB erythromycin 0.5 g mL, and LB erythromycin 5 g mL. The isolat was analyzed with genomic PCR, and the results showed no positive isolates from 60 clones.