



UNIVERSITAS INDONESIA

**KLONING GEN PENYANDI *LYSOPHOSPHOLIPASE* dari
Bacillus halodurans CM1 ke *Escherichia coli* DH5 α**

SKRIPSI

**SHANNI FERNANDA
1306409993**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2017**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KLONING GEN PENYANDI *LYSOPHOSPHOLIPASE* dari
Bacillus halodurans CM1 ke *Escherichia coli* DH5 α**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

SHANNI FERNANDA

1306409993

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2017**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Shanni Fernanda

NPM : 1306409993

Tanda Tangan :



Tanggal : 14 Juni 2017

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Shanni Fernanda
NPM : 1306409993
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Kloning gen penyandi *lysophospholipase* dari
Bacillus halodurans CM1 ke *Escherichia coli*
DH5 α

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Drs. Abinawanto M. Si. (.....)

Pembimbing II : Dr. Is Helianti, M. Sc. (.....)

Penguji I : Dr. Ratna Yuniati, M.Si. (.....)

Penguji II : Astari Dwiranti, M. Eng., PhD. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 14 Juni 2017

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena hanya atas anugerah-Nya dan kasih-Nya, penulis dapat melalui proses penelitian dan penulisan naskah skripsi ini hingga selesai. Penulis sangat menyadari banyaknya pihak yang membantu penulis dari proses penelitian hingga penulisan naskah skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyelesaian skripsi ini, diantaranya :

1. Dr. Drs. Abinawanto M. Si., dan Dr. Is Helianti, M. Sc. selaku pembimbing I dan pembimbing II yang senantiasa memberikan ilmu, bimbingan, saran, nasihat serta motivasi kepada Penulis dari awal penelitian hingga penulisan skripsi ini.
2. Dr. Ratna Yuniati, M.Si., Astari Dwiranti, M. Eng., PhD, dan Dr. Retno Lestari, M. Si. sebagai dewan penguji yang telah memberikan saran, kritik dan nasihat yang membangun untuk kesempurnaan penulisan skripsi ini.
3. Semua dosen pengajar Departemen Biologi Universitas Indonesia dan guru yang telah memberikan pengetahuan kepada penulis dari TK sampai perguruan tinggi, sehingga penulis juga dapat memahami dan mengerjakan penelitian hingga penulisan skripsi ini.
4. Pusat Teknologi Bioindustri, Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LABTIAP), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek), Serpong sebagai tempat penelitian skripsi.
5. Dr. rer. nat. Yasman, S.Si., M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Dr. Dra. Andi Salamah selaku Ketua Program Studi S1 Departemen Biologi dan Dra. Sitaresmi, M. Sc. selaku Pembimbing Akademik atas ilmu, arahan, dan nasihat selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Biologi.
6. Mbak Asri Martini Wulani, S.Si. selaku Pegawai Administrasi Tugas Akhir Program Studi S1 Departemen Biologi yang telah memberikan kritik dan

saran yang membangun kepada penulis, serta staf dan karyawan Departemen Biologi Universitas Indonesia yang telah membantu penulis selama proses perkuliahan.

7. Mbak Lina Mulyawati, S.Si., Kak Haniyya, S.Si., Mbak Martha Eka M.Si, Mbak Milani Anggiani, M. Si, Kak Sari, dan Natasha Furgeva yang telah memberikan banyak bantuan teknis dan dukungan selama penelitian juga penulisan skripsi ini.
8. Orang tua ku tercinta, Marsinta Sihombing dan Martin Siringoringo atas dukungan moril, doa, dan materiil yang telah diberikan sejak penulis masih kecil hingga sekarang. Adik-adik tersayang, Clara Marito, Agnes Dameria, Mikha Nathalin, dan Maria Nathalin atas semangat yang selalu diberikan kepada penulis.
9. Sahabat seperjuangan penulis, Addin Fitri, Asri Mar'atus, Nisrina Ulayya, Nur Zakiyyah Elsalam, Mardia Azis dan Rizka Alawiyah yang selalu membantu dan mendukung penulis selama perkuliahan. Teman-teman Beetle Biologi Universitas Indonesia Angkatan 2013 untuk persahabatan dan dukungan yang diberikan selama penulis perkuliahan.
10. Sahabat di PO MIPA-Farmasi, Merry Flora, Juwita Simanjutak, Monica Angeline, Yehezkiel Willy, dan teman-teman pengurus, atas doa, dukungan, dan semangat juga mengajarkan tentang kasih selama penulis perkuliahan.
11. Kelompok Kecil Ku, Tomi E., Agrido W., Alexander T., Fernandos, Ezra, Angel T., Gresshia D., Elisha T., Yerisca A. D., Monica S., dan Lorita, atas doa, semangat dan telah dan akan terus menjadi tempat untuk bertumbuh.

Akhir kata, penulis memohon maaf atas segala kekurangan dan kesalahan yang dilakukan selama proses penyusunan skripsi. Terima kasih kepada pembaca atas segala kritik dan saran yang bermanfaat bagi penulis. Semoga skripsi ini dapat berkontribusi bagi ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi pembacanya. *Sebab segala sesuatu adalah dari Dia, dan Oleh Dia dan kepada Dia: Bagi Dialah kemuliaan sampai selama-lamanya.*

Depok, 14 Juni 2017

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Shanni Fernanda
NPM : 1306409993
Program Studi : S1 Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Kloning gen penyandi *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 ke *Escherichia coli* DH5a.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmediakan/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 14 Juni 2017

Yang menyatakan



(Shanni Fernanda)

ABSTRAK

Nama : Shanni Fernanda
Program Studi : Biologi
Judul : Kloning gen penyandi *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 ke *Escherichia coli* DH5 α

Enzim merupakan biokatalisator yang banyak digunakan di bidang industri, terutama deterjen, farmasi, makanan bahkan pemurnian minyak. Salah satu enzim yang banyak digunakan untuk pemurnian minyak ialah *lysophospholipase*. Sebanyak 50% kebutuhan enzim industri diperoleh dari mikroorganisme. Akan tetapi umumnya produk aktivitas enzim oleh mikroba galur liar kurang memadai untuk aplikasi di industri, sehingga perlu dilakukan rekayasa genetik. Pengklonaan gen penyandi *lysophospholipase* pernah dilakukan di *Aspergillus niger* dan *Cryptococcus neoformans*, tetapi belum pernah dilakukan dari bakteri alkalotermofilik. *Bacillus halodurans* CM1 merupakan bakteri alkalotermofilik isolat BPPT. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim lipase, tetapi belum diteliti lebih lanjut mengenai jenis dan lipase rekombinannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengklona gen penyandi *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 ke *Escherichia coli* DH5 α menggunakan vektor pGEM-T *easy*. Plasmid rekombinan tersebut disekuensing. Hasil penelitian diperoleh fragmen gen penyandi *lysophospholipase* yang berukuran 783 pasang basa serta tingkat homologi 100% dengan genom *Bacillus halodurans* C-125 yang menyandi gen *lysophospholipase* (No akses GenBank: BA000004.3).

Kata kunci: *Bacillus halodurans* CM1; kloning; *lysophospholipase*

xii+68 hlm : 14 gambar; 8 lampiran

Bibliografi : 60 (1963—2017)

ABSTRACT

Name : Shanni Fernanda
Study Program : Biology
Title : Cloning gene encoding lysophospholipase from *Bacillus halodurans* CM1 to *Escherichia coli* DH5 α

Enzyme is a biocatalyst widely used in industry, for example detergent, pharmaceutical, food or oil purification. One of the most widely used enzymes for oil purification is lysophospholipase. As much as 50% of industrial enzyme needs are obtained from microorganisms. However, enzyme productivity from wild type microbial strain is usually limited and not applicable in industry, so that genetic engineering is necessary. Cloning gene encoding for lysophospholipase was once performed in *Aspergillus niger* and *Cryptococcus neoformans*, but has never been done from alkalothermophilic bacteria, such as *Bacillus halodurans*. *Bacillus halodurans* CM1 is an isolate of BPPT. Previous research has shown that this bacteria have lipase enzymes, but the study about their properties have not been conducted. This study aims to clone the gene t lysophospholipase from *Bacillus halodurans* CM1 to *Escherichia coli* DH5 α using the pGEM-T easy vector. The recombinant plasmid is sequenced. The results is gene fragment encoding lysophospholipase obtained with size 783 base pairs and 100% similiraty with gene encoding lysophospholipase from *Bacillus halodurans* C-125 (No access GenBank: BA000004.3).

Keywords : cloning; *Bacillus halodurans* CM1; lysophospholipase
xii+68 hlm : 14 pictures; 8 appendices
Bibliography : 59 (1963—2017)

DAFTAR ISI

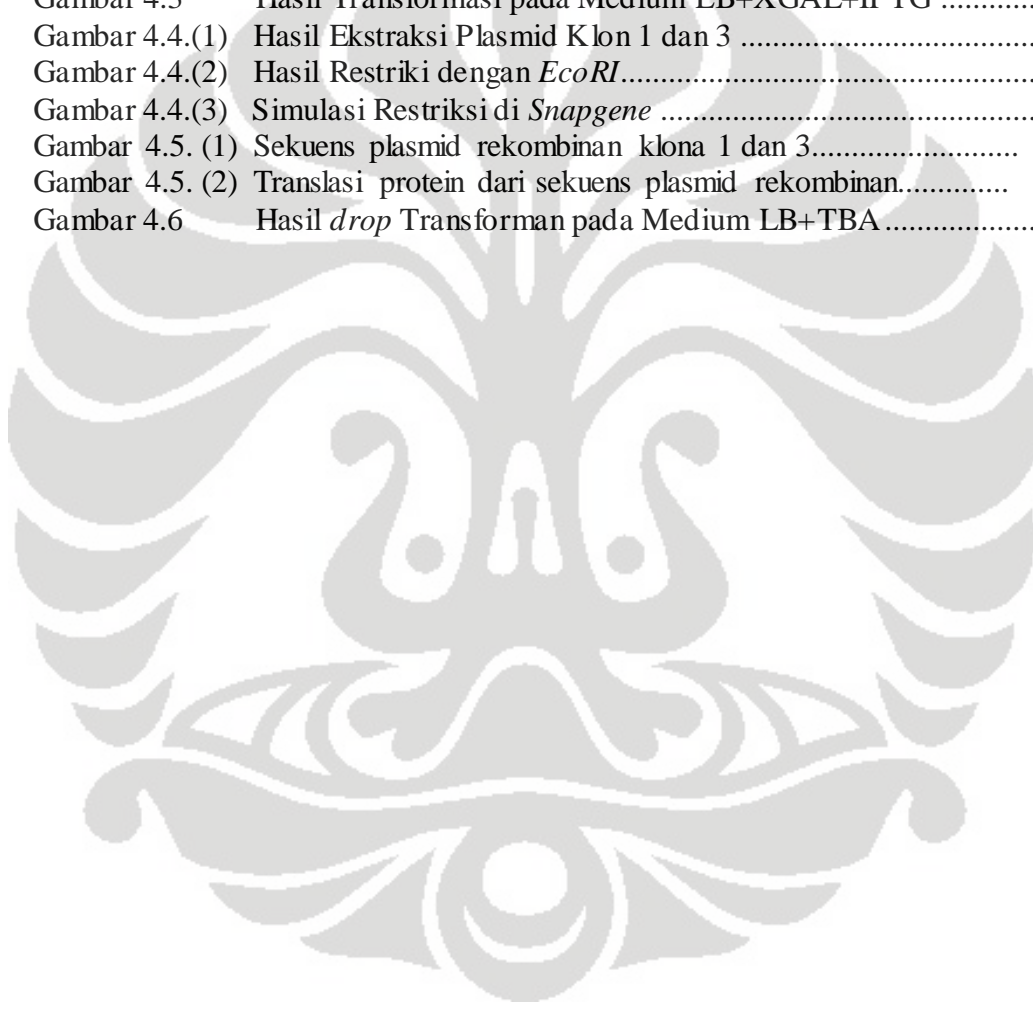
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Teknologi DNA Rekombinan.....	4
2.2 <i>Lysophospholipase</i>	9
2.3 <i>Bacillus halodurans</i> CM1	10
2.4 <i>Escherichia coli</i> DH5 α	12
2.5 Plasmid pGEM-T <i>easy</i>	13
2.6 Sekuensing	135
3. METODOLOGI PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2 Sampel	16
3.3 Alat	16
3.4 Bahan	17
3.5 Cara Kerja.....	17
3.5.1 Pembuatan Larutan, <i>Buffer</i> dan Media.....	18
3.5.2 Ekstraksi Genom <i>Bacillus halodurans</i> CM1	18
3.5.3 Amplifikasi Gen <i>Lysophospholipase</i> menggunakan PCR	19
3.5.4 Elektroferesis menggunakan Gel Agarosa	19
3.5.5 Purifikasi Gen <i>Lysophospholipase</i> Hasil Amplifikasi PCR.....	20
3.5.6 Ligasi Gen <i>Lysophospholipase</i> ke pGEM-T <i>Easy</i>	21
3.5.7 Pembuatan Sel Kompeten <i>Escherichia coli</i> DH5 α	21
3.5.8 Transformasi Plasmid Rekombinan ke <i>Escherichia coli</i> DH5 α	22
3.5.9 Konstruksi Plasmid Rekombinan menggunakan <i>SnapGene</i>	23
3.5.10 Ekstraksi Plasmid dari <i>Escherichia coli</i> DH5 α Rekombinan ...	24
3.5.11 Konfirmasi Plasmid Rekombinan dengan Enzim Restriksi.....	25
3.5.12 Sekuensing dan Analisis Sekuens DNA	25
3.5.14 Pengolahan dan Analisis Data	26
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Ekstraksi Genom <i>Bacillus halodurans</i> CM1	27
4.2 Amplifikasi Gen <i>Lysophospholipase</i> menggunakan PCR.....	28

4.3	Transformasi Plasmid ke <i>Escherichia coli</i> DH5α	30
4.4	Ekstraksi Plasmid dari <i>Escherichia coli</i> DH5α Rekombinan.....	33
4.5	Sekuensing dan Analisis Sekuens DNA	36
4.6	Uji Kualitatif Produk Gen pada Substrat Lipase	38
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1	Kesimpulan.....	40
5.2	Saran	40
	DAFTAR ACUAN	41



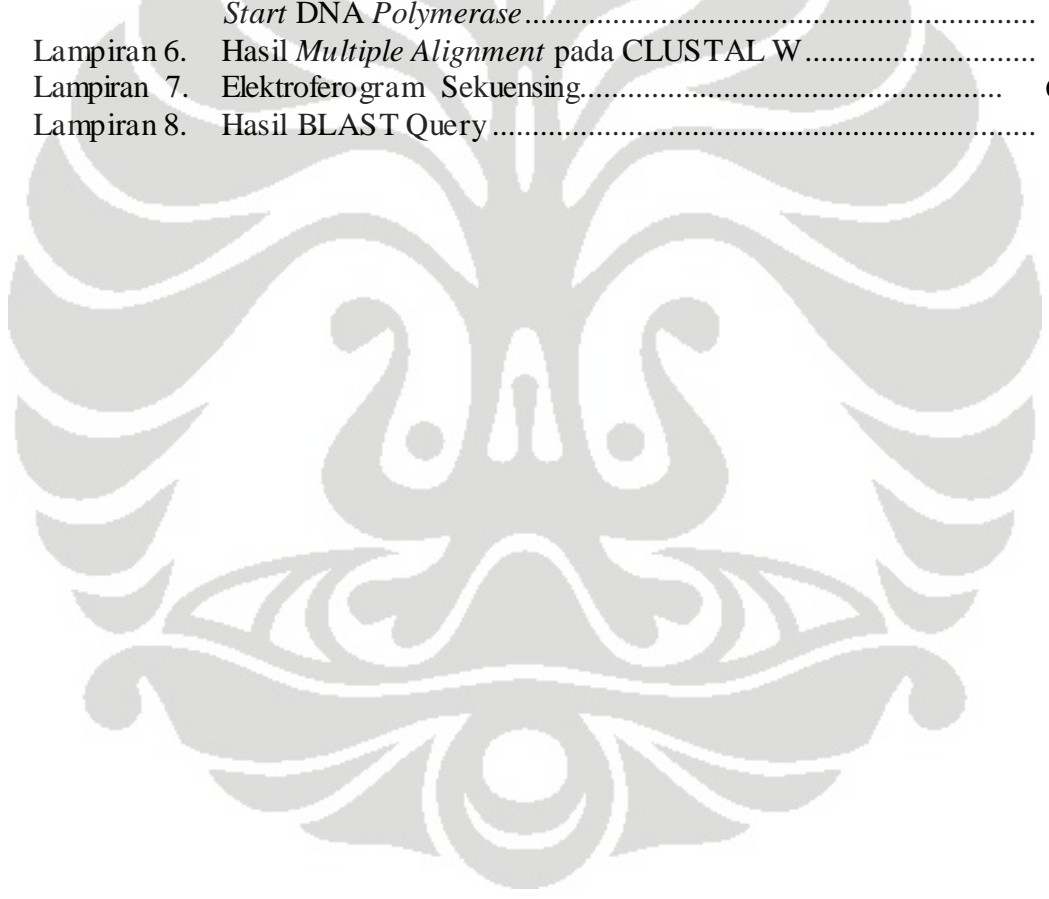
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.(1)	Sintesis DNA menggunakan PCR	5
Gambar 2.2.(2)	Rumus perhitungan suhu penempelan	6
Gambar 2.3	Struktur Sirkular Genomik <i>B. halodurans</i> C-125	11
Gambar 2.5	Plasmid pGEM T- <i>easy</i>	14
Gambar 3.5.9	Konstruksi Plasmid pGEM T- <i>easy</i> — <i>lysophospholipase</i>	23
Gambar 4.1	Hasil Ekstraksi DNA Genom <i>Bacillus halodurans</i> CM1	27
Gambar 4.2	Hasil Amplifikasi Gen <i>lysophospholipase</i>	29
Gambar 4.3	Hasil Transformasi pada Medium LB+XGAL+IPTG	31
Gambar 4.4.(1)	Hasil Ekstraksi Plasmid Klon 1 dan 3	33
Gambar 4.4.(2)	Hasil Restriksi dengan <i>EcoRI</i>	34
Gambar 4.4.(3)	Simulasi Restriksi di <i>Snapgene</i>	35
Gambar 4.5. (1)	Sekuens plasmid rekombinan klon 1 dan 3.....	36
Gambar 4.5. (2)	Translasi protein dari sekuens plasmid rekombinan.....	37
Gambar 4.6	Hasil <i>drop</i> Transforman pada Medium LB+TBA	38



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Perbandingan Karakteristik <i>Bacillus halodurans</i> CM1 dengan <i>Bacillus halodurans</i> C-125.....	47
Lampiran 2.	Skema Alur Kerja Penelitian	48
Lampiran 3.	Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, <i>Buffer</i> , dan Media serta Cara Pembuatannya	49
Lampiran 4.	Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen	58
Lampiran 5.	Kondisi Reaksi PCR menggunakan <i>KAPA Taq Extra Hot Start DNA Polymerase</i>	59
Lampiran 6.	Hasil <i>Multiple Alignment</i> pada CLUSTAL W	60
Lampiran 7.	Elektroferogram Sekuensing.....	64
Lampiran 8.	Hasil BLAST Query	63



BAB 1

PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalisator yang berperan meningkatkan kecepatan suatu reaksi kimia (Jemli dkk. 2016: 246). Enzim banyak digunakan sebagai biokatalisator di bidang industri, seperti detergen, obat-obatan, dan makanan. Enzim yang banyak digunakan di industri ialah lipase dan *phospholipase*. Industri yang biasa menggunakan enzim tersebut ialah industri makanan, detergen, farmasi, kosmetik dan biodiesel. Kebutuhan enzim di bidang industri diperoleh dari tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Sebanyak 50% bahkan lebih kebutuhan tersebut berasal dari mikroorganisme, karena enzim yang berasal dari mikroorganisme dapat menjadi katalisator berbagai reaksi kimia dengan variasi pH dan suhu, sehingga enzim tersebut lebih stabil. Selain itu, alasan lain penggunaan enzim yang berasal dari mikroorganisme ialah karena pertumbuhan mikroorganisme tidak dipengaruhi oleh musim, bahkan dapat hidup di lingkungan yang ekstrim, seperti lingkungan dengan salinitas tinggi, suhu tinggi ataupun suhu rendah (Borrelli & Trono 2015: 20774—20775).

Lipase, *lysophospholipase* dan *phospholipase* merupakan enzim yang potensial digunakan dalam bidang industri, bahkan digunakan dalam industri biodiesel untuk pemurnian minyak (Borrelli & Trono 2015: 20774—20775). Minyak dimurnikan atau *degumming oil* umumnya banyak mengandung fosfat, sehingga lebih mudah dihidrolisis oleh enzim *phospholipase*, salah satunya *lysophospholipase* (Cesarini dkk. 2015: 7892—7893). Pemurnian minyak tersebut disebabkan oleh reaksi transesterifikasi yang menyebabkan minyak bebas dari kontaminan, dan apabila reaksi transesterifikasi terjadi pada kondisi basa dapat menghindari pembentukan sabun atau *foaming*. Selain itu, penggunaan enzim pada pemurnian minyak menyebabkan minyak tidak perlu dipurifikasi dari zat-zat kimia berbahaya. Namun, penggunaan enzim tersebut masih terbatas karena harga dari enzim tersebut masih mahal. Oleh karena itu, perlu dilakukan rekayasa genetik untuk memproduksi enzim dalam jumlah tinggi untuk memenuhi kebutuhan industri (Cesarini dkk. 2015: 7884—7885).

Rekayasa genetik yang umumnya dilakukan ialah pengklonaan atau introduksi DNA asing ke dalam sel inang, kemudian dilakukan propagasi DNA tersebut (Peacock 2010: 12). Eksperimen pengklonaan yang pertama dilakukan pada *Escherichia coli*, karena organisme ini memiliki berbagai macam mutasi dan regulasi gen. Selain itu, *Escherichia coli* juga dapat diintroduksi oleh berbagai plasmid. Oleh karena itu, organisme ini sering digunakan sebagai sel inang dalam pengklonaan. Apabila pengklonaan pada *Escherichia coli* telah berhasil dilakukan, maka pengklonaan dilakukan pada organisme lain atau organisme asal dari gen target (Primrose dkk. 2001: 6). Galur yang biasa digunakan dalam penelitian rekayasa genetika ialah DH5 α , TOP10, dan JM109 (Casali 2003: 27—36).

Enzim *lysophospholipase* sudah diaplikasikan dalam pemurnian minyak (Cesarini dkk. 2015: 7892—7893). Enzim *lysophospholipase* yang berasal dari *Aspergillus niger* juga sudah pernah diklonasi dan diekspresikan di *Pichia pastoris*, tetapi ekspresi yang dihasilkan cukup rendah (Zhu 2007: iii). Coe dkk. (2003: 67—68) juga mengklonasi gen penyandi *lysophospholipase* dari *Cryptococcus neoformans*. Namun, pengklonaan dari bakteri alkalotermofilik belum pernah dilakukan. Salah satu contoh bakteri alkalotermofilik ialah *Bacillus halodurans* CM1. Menurut Ulfah dkk. (2011: 139), *Bacillus halodurans* CM1 merupakan bakteri alkalotermofilik yang diisolasi oleh Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) dari sedimen pemandian air panas di Cimanggu, Jawa Barat. Bakteri tersebut memiliki kemiripan sebesar 99% dengan sekuens 16s rRNA *Bacillus halodurans* C-125.

Penelitian sebelumnya telah dilakukan pengklonaan enzim xilanase dari *Bacillus halodurans* CM1 ke *Escherichia coli* DH5 α (Safirah 2016: 30). Selain itu, penelitian mengenai karakterisasi enzim lipase yang berasal *Bacillus halodurans* CM1 pernah dilakukan, tetapi belum diketahui secara spesifik jenis lipase yang dihasilkan dan belum pernah dilakukan pengklonaan gen penyandi lipase dari *Bacillus halodurans* CM1 (Aisyah 2017: 24). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengklonaan gen penyandi *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 berdasarkan sekuens *Bacillus halodurans* C-125, dengan *Escherichia coli* DH5 α sebagai sel inang. Penelitian ini diharapkan dapat menyediakan informasi

mengenai gen penyandi *lysophospholipase* pada *Bacillus halodurans* CM1. Tujuan penelitian ini ialah untuk mengklona gen penyandi *lysophospholipase* yang berasal dari *Bacillus halodurans* CM1 pada *Escherichia coli* DH5 α .



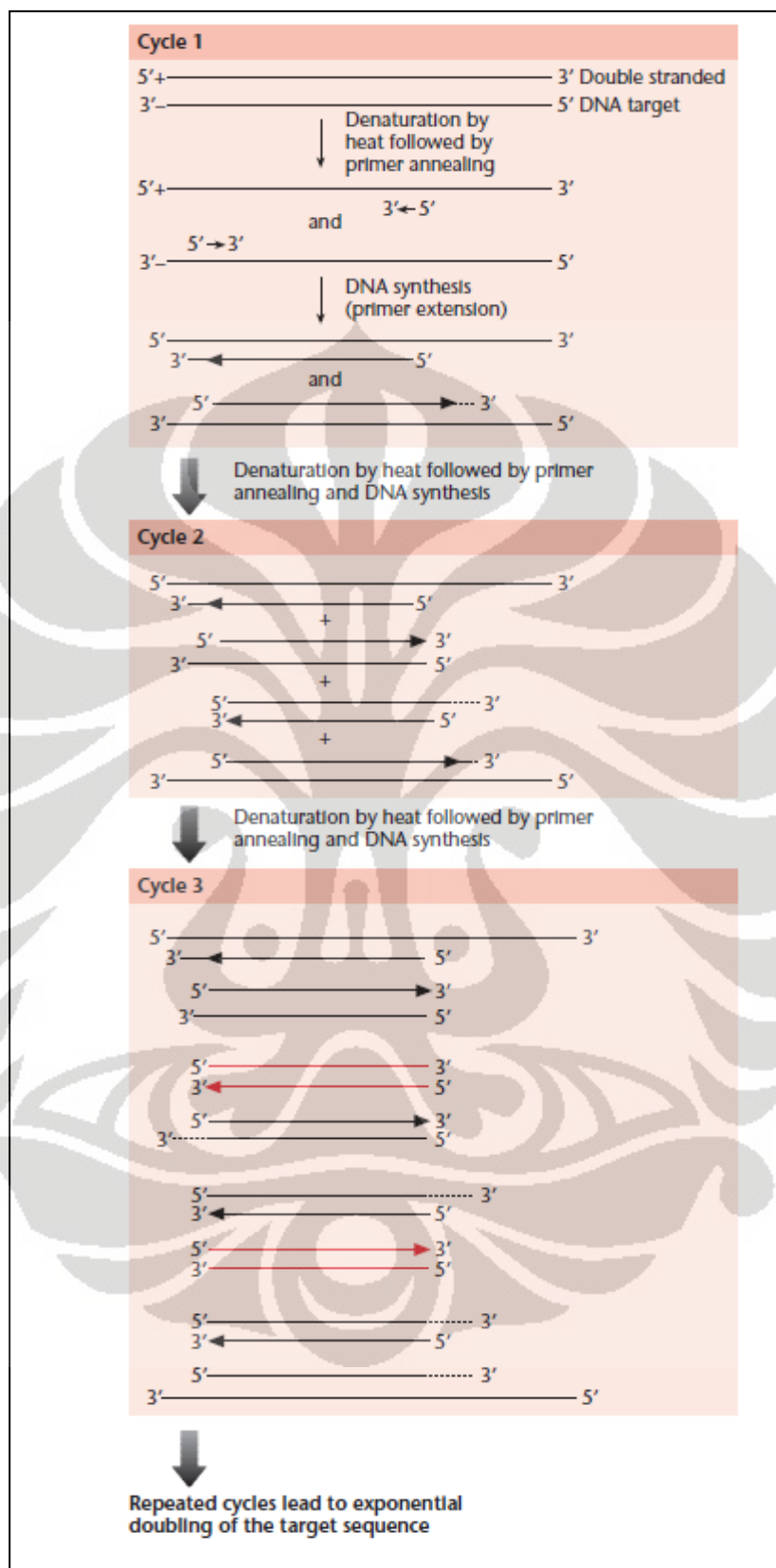
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teknologi DNA Rekombinan

Teknologi DNA rekombinan merupakan teknologi mendasar yang dilakukan dalam penelitian bioteknologi modern. Teknologi ini mulai berkembang sekitar tahun 1970an. Prinsip dasar dari teknologi ini ialah mengisolasi DNA dari organisme target, lalu disisipkan ke sel inang, dengan cara transformasi. Tahapan dari rekayasa genetik ini ialah propagasi gen target, digesti dan introduksi gen target ke sel inang. Tahapan tersebut sering dikenal sebagai pengklonaan. Pengklonaan merupakan proses pembuatan suatu cetakan yang identik dari suatu organisme, organ, sel tunggal, maupun makromolekul DNA. Pengklonaan dapat dilakukan jika terdapat 5 (lima) komponen berikut, yaitu fragmen DNA target, vektor, enzim restriksi, enzim ligase dan bakteri inang yang kompeten (Primrose dkk. 2001: 8).

DNA target dilipatgandakan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang merupakan pelipatgandaan suatu sekuens nukleotida secara eksponensial dan *in vitro* dengan reaksi enzimatis. Proses sintesis DNA ketika PCR dapat dilihat pada gambar 2.1.(1). Komponen PCR ialah DNA *template*, primer, dNTP, enzim DNA polimerase, senyawa *buffer*. Primer merupakan sekuens dari DNA target yang telah diketahui. Syarat dari primer yang baik ialah spesifik, memiliki panjang 17—30 panjang basa, komposisi basa Guanin (G) dan Sitosin (C) sebesar 50% , dan tidak membentuk struktur sekunder. Apabila melakukan PCR, sebaiknya menggunakan primer yang komplemen supayas lebih spesifik. Selain itu, sekuens DNA yang akan dilipatgandakan tidak terlalu panjang. Proses pemanjangan tersebut dapat terjadi karena enzim DNA polimerase yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim polimerase yang digunakan berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim polimerase yang biasa digunakan ialah *hot start* untuk mengurangi ketidak cocokan, karena suhu penempelan primer yang umumnya tinggi (Primrose dkk. 2001: 19—25). Penentuan suhu penempelan primer dapat dilihat pada gambar 2.1.(2).



Gambar 2.1.(1) Sintesis DNA ketika PCR

[sumber: Primrose dkk. 2001: 20]

$T_m = [4 (G + C) + 2 (A + T)] \text{ } ^\circ\text{C}$	
Keterangan:	
T_m	: <i>Melting temperature</i>
A	: Adenin
G	: Guanin
T	: Timin
C	: Sitosin

Gambar 2.1.(2). Rumus penentuan suhu penempelan

[sumber: Primrose dkk. 2001: 13]

Vektor merupakan molekul DNA yang dapat membawa DNA asing (target) ke dalam sel inang, bereplikasi di dalam sel, juga mereplikasi gen asing yang telah disisipkan. Karakter substansial yang harus dimiliki oleh sebuah vektor DNA diantaranya dapat melakukan propagasi di dalam sel inang, mempunyai situs *multiple cloning* untuk menyisipkan DNA asing ke dalamnya, dan mempunyai gen *marker* dapat berupa resistensi antibiotik sehingga dapat diseleksi bakteri rekombinan yang mengandung plasmid dengan DNA asing (Brown 2010: 73—76). Vektor yang biasa digunakan dalam rekayasa genetika ialah plasmid, faga, kosmid, *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC) dan *Yeast Artificial Chromosomes* (YAC). Faga merupakan turunan dari virus yang menginfeksi bakteri, umumnya dapat berasal dari faga lamda ataupun faga M13. Faga biasanya mempunyai molekul DNA linear sehingga dapat disisipkan DNA asing. DNA diisolasi setelah faga berkembang lewat siklus lisisnya dan menghasilkan partikel faga yang matang serta infeksi. Vektor faga dapat disisipkan fragmen DNA dengan panjang 10—20 kb, sementara plasmid hanya 6—10 kb (Brown 2010: 13—24).

Plasmid merupakan ekstra kromosomal DNA yang umumnya berbentuk sirkular, dengan ukuran yang lebih kecil dari kromosom. Plasmid dapat diklasifikasikan menjadi plasmid konjugatif dan non-konjugatif. Plasmid konjugatif dapat melakukan transfer materi genetik antar bakteri *tra* (transfer) dan *mob* (*mobilizing*) melalui proses konjugasi; sedangkan plasmid non-konjugatif

tidak dapat melakukan transfer materi genetik. Plasmid juga dapat diklasifikasikan berdasarkan *copy number*, yaitu regulasi replikasi plasmid dalam sel inang (Nicholl 2002: 61). Berdasarkan *copy number*, plasmid diklasifikasikan menjadi *high copy number* dan *low copy number*. Plasmid dengan *high copy number* disebut sebagai *relaxed plasmid*, karena replikasi plasmid tidak bergantung pada replikasi sel inang, sehingga dapat menghasilkan > 100 kopi plasmid; sedangkan plasmid dengan *low copy number* disebut sebagai *stringent plasmid* karena replikasi plasmid bergantung pada replikasi sel inang, sehingga dapat menghasilkan < 100 kopi plasmid. Replikasi ini diatur oleh regulasi antara *antisense RNA* dan ikatan antara protein esensial dengan interon (Primrose dkk. 2001: 45—46).

Plasmid sangat berperan dalam ekspresi beberapa fenotipe bakteri, seperti resistensi terhadap antibiotik tertentu, ekspresi protein tertentu, sehingga keberadaan plasmid dapat dideteksi dengan medium selektif. Oleh karena itu, plasmid banyak digunakan dalam rekayasa genetik sebagai vektor dalam pengklonan. Selain berukuran kecil, plasmid juga harus memiliki *open reading frame* (ORF), dan situs tunggal untuk retriksi endonuklease spesifik yang dapat dipotong oleh enzim restriksi sehingga dapat disisipi DNA. Namun, plasmid yang akan digunakan untuk rekayasa genetik perlu diisolasi. Prinsip dari isolasi ini ialah melisiskan protein dan sel-sel debris dengan gaya sentrifugasi yang cepat, sehingga molekul DNA yang memiliki berat molekul lebih ringan akan berada di bagian atas (pelet) (Primrose, dkk. 2001: 48—50). Isolasi plasmid dapat dilakukan dengan berbagai cara, bergantung pada ukuran plasmid. Metode isolasi plasmid yang dapat dilakukan ialah *alkaline lysis*, *rapid boiling*, dan *lysozyme method*. Metode isolasi plasmid yang paling umum digunakan adalah *alkaline lysis*, karena metode ini dapat mengisolasi plasmid dalam ukuran beragam dan berasal dari bakteri gram positif atau negatif. Bakteri yang mengandung plasmid dimasukkan ke dalam larutan yang mengandung *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dan NaOH yang berfungsi untuk melisiskan sel. Larutan kalium asetat asetat dan etanol digunakan untuk mempresipitasi kromosomal DNA dan protein, serta membersihkan plasmid (Ausubel dkk. 2003: 75).

Plasmid yang telah diisolasi diverifikasi dengan cara digesti, yaitu pemotongan fragmen DNA menggunakan enzim restriksi. Digesti dimulai dengan penentuan situs pengenalan, yang berupa beberapa basa nukleotida menjadi titik awal pemotongan oleh enzim restriksi. Situs pengenalan enzim restriksi terdiri atas beberapa basa serta memiliki basa komplemen yang sama, disebut palindrom. Berdasarkan situs pengenalannya, enzim restriksi dibagi menjadi 3 (tiga), yaitu *neoschizimer*, *isoschizimer* dan *isocaudomer*. *Neoschizimer* merupakan enzim restriksi yang memiliki situs pengenalan sama, tetapi situs pemotongannya berbeda. *Isoschizimer* merupakan enzim restriksi yang memiliki situs pengenalan dan pemotongan yang sama. *Isocaudomer* merupakan enzim restriksi yang memiliki situs pengenalan yang berbeda, tetapi hasil pemotongannya menghasilkan ujung terminasi yang identik. Pemotongan tersebut dapat menghasilkan ujung yang rata dan tidak rata. Hasil pemotongan enzim restriksi yang menghasilkan ujung yang rata disebut *sticky end*, sedangkan ujung yang tidak rata disebut *blunt end*. Hasil pemotongan enzim restriksi umumnya menghasilkan ujung *blunt end*, karena lebih memudahkan proses penempelan dengan sekuens DNA lain (Passarge 2006: 66).

Enzim restriksi diberi nama berdasarkan nama genus dan spesies bakteri yang menghasilkan enzim restriksi, nama strain bakteri, serta urutan enzim yang ditemukan pada bakteri tersebut. Penamaan enzim restriksi EcoRI berarti, E mengindikasikan genus dari *Escherichia*, co mengindikasikan spesies dari *E.coli*, R mengindikasikan galur bakteri yang menghasilkan enzim, dan I merupakan urutan pertama ditemukannya enzim pada *E.coli* (Roberts 2005: 1806). Enzim restriksi dapat diklasifikasikan menjadi 2 (dua) berdasarkan daerah pemotongan fragmen DNA, yaitu endonuklease dan eksonuklease. Enzim restriksi endonuklease memotong fragmen DNA yang berada di tengah, sedangkan enzim restriksi eksonuklease memotong fragmen DNA yang berada di ujung (Ahluwalia 2009: 160). Enzim endonuklease dibagi menjadi 3 (tiga), yaitu endonuklease tipe I, endonuklease tipe II, endonuklease tipe III. Enzim endonuklease I memiliki struktur enzim yang kompleks dan dapat memotong 100-1000 basa nukleotida setelah situs pengenalan, dengan kofaktor berupa ATP dan Mg^{2+} . Enzim endonuklease II memiliki struktur monomerik dan memerlukan kofaktor berupa

Mg²⁺. Enzim endonuklease II memiliki situs pengenalan yang sama dengan situs pemotongannya. Enzim endonuklease III memiliki struktur enzim yang kompleks multimerik, sehingga tidak memerlukan kofaktor. Enzim endonuklease tipe II dapat memotong 25 sampai 27 basa nukleotida setelah situs pengenalan (Dale & Park 2004: 126—128).

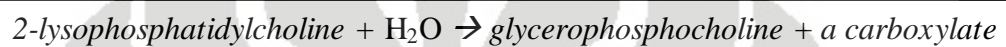
Plasmid yang telah diisolasi dan digesti divisualisasi dengan cara elektroforesis yang merupakan teknik pemisahan molekul berdasarkan ukuran dan muatan listrik. Prinsip dari elektroforesis ialah pemisahan molekul yang bersifat anion atau bermuatan negatif, sehingga molekul akan migrasi dari kutub negatif (anoda) ke kutub positif (katoda) ketika diberikan muatan listrik (Nicholl 2002: 33—34). Molekul juga akan bermigrasi dari ukuran yang kecil hingga besar. Molekul yang dapat bermigrasi umumnya molekul yang mengandung asam nukleat, seperti DNA. DNA bermuatan negatif karena terdapat ikatan fosfat pada nukleotida. Migrasi tersebut terjadi melalui pori-pori matriks, sehingga jenis matriks akan bergantung pada ukuran molekul yang akan dipisahkan (Ahluwalia 2009: 370—371). Kecepatan migrasi molekul dipengaruhi oleh voltase listrik, komposisi matriks gel, komposisi larutan *buffer*, serta ukuran, bentuk, dan komposisi molekul yang dipisahkan (Robinson 2003: 45—46). Matriks yang dapat digunakan untuk elektroforesis ialah gel agarosa, poliakrilamid, pati dan selulosa (Hartl & Elizabeth 1998: 52).

Aparatus elektroforesis terdiri atas *tray*, *comb*, dan *chamber*. *Tray* merupakan tempat mencetak gel. *Comb* merupakan alat yang digunakan untuk membuat sumur (*well*) sebagai tempat untuk memasukkan sampel. *Chamber* merupakan tempat berlangsungnya elektroforesis yang berisi gel dan *running buffer*. Hasil dari elektroforesis akan divisualisasi dengan cara diwarnai (*staining*) menggunakan *ethidium bromida* (EtBr). Senyawa tersebut berikatan dengan DNA dan dapat berpendar ketika terkena lampur sinar UV (Pierce 2005: 513).

2.2 *Lysophospholipase*

Lysophospholipase banyak digunakan dalam bidang industri farmasi, makanan, perminyakan (Borrelli & Trono 2015: 20774—20775). Berdasarkan

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB 2007: 1) enzim *lysophospholipase* termasuk ke dalam golongan E.C.3.1.1.5. Angka 3 di depan kode tersebut menunjukkan bahwa *lysophospholipase* termasuk ke dalam golongan hidrolase, yang berarti bahwa enzim ini memerlukan air untuk memecah ikatan C-O, C-N, O-P dan C-S. Angka 3.1 menunjukkan bahwa enzim ini termasuk ke dalam enzim yang menghidrolisis reaksi ester. Angka 3.1.1 menunjukkan bahwa enzim ini memecah gugus karboksilat pada ester. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada skema sebagai berikut:



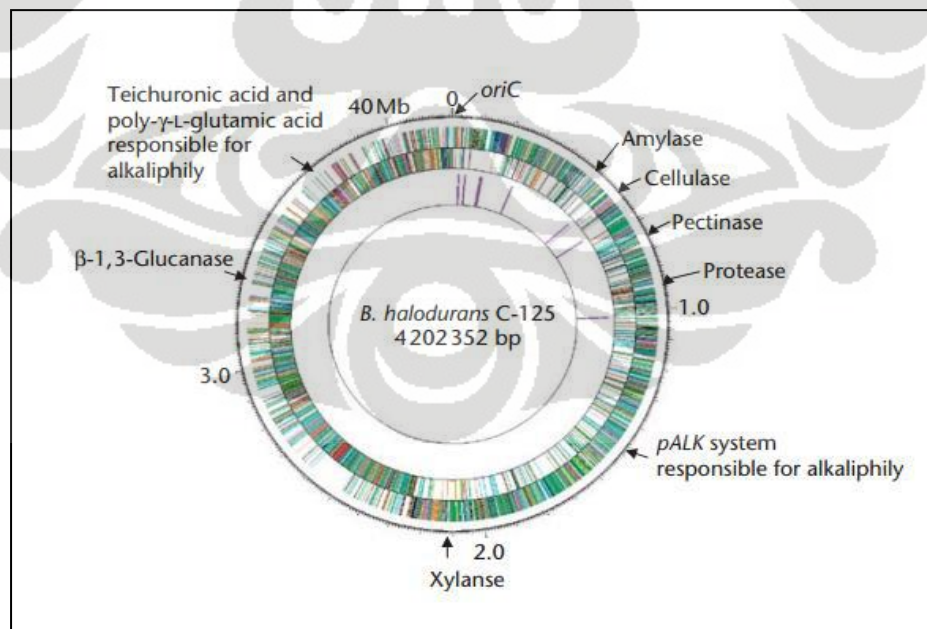
Lysophosphatidylcholine banyak ditemukan di dalam minyak yang belum murni, sehingga *lysophospholipase* banyak diaplikasikan dalam bidang perminyakan, khususnya pemurnian minyak. Pemurnian minyak menggunakan enzim akan mengurangi biaya produksi serta dapat menggunakan minyak dengan yang kondisi tidak terlalu bagus. Selain itu, tidak membentuk sabun atau *foaming* (Cesarini dkk. 2015: 7897—7898).

2.3 *Bacillus halodurans* CM1

Bacillus halodurans merupakan bakteri Gram positif alkalotermofilik yang pertama kali diisolasi tahun 1977, lalu diidentifikasi sebagai produsen β -galaktosidase dan xilanase. Bakteri tersebut diidentifikasi ulang oleh Takami dan Horikoshi (1999: 943) sebagai *Bacillus halodurans* C-125 berdasarkan karakter morfologi, fisiologis, biokimia serta sekuens 16S rRNA juga analisis dari hibridisasi DNA. Bakteri tersebut telah diteliti keseluruhan genomnya yang memiliki ukuran 4.202.353 pasang basa dan diperkirakan memiliki 4066 sekuens penyandi protein, tetapi hanya 2141 sekuens penyandi protein fungsional (Takami dkk. 2000: 4317). Enzim-enzim yang biasa dikode oleh bakteri alkalotermofilik ialah enzim protease, selulase, lipase dan xilanase (Horikoshi 1999: 741—745). Selain *Bacillus halodurans* juga terdapat bakteri alkalotermofilik lain yang telah diisolasi, tetapi belum diidentifikasi sampai ke tingkat spesies. Salah satu bakteri

yang berhasil diidentifikasi oleh Ulfah dkk. (2011: 142) ialah *Bacillus halodurans* CM1, tetapi bakteri tersebut belum pernah diteliti keseluruhan genomnya dan masih sedikit penelitian mengenai bakteri tersebut.

Bacillus halodurans CM1 diisolasi oleh BPPT dari sedimen di pemandian air panas Cimanggu, Jawa Barat. Bakteri ini diidentifikasi sebagai galur baru, karena memiliki perbedaan karakter morfologi dan fisiologi dengan *Bacillus halodurans* C-125. Morfologi dari bakteri ini ialah batang dengan ukuran 2,7—5,5 μm dan koloni berwarna putih kecokelatan; sedangkan *Bacillus halodurans* C-125 memiliki bentuk batang dengan ukuran 0,6—0,7 \times 2,5—4,0 μm dan koloni berwarna putih kekuningan. Kedua galur ini dapat hidup pada lingkungan dengan pH 7 hingga 11, dan suhu 40°C hingga 55°C. Namun, kedua galur ini juga memiliki perbedaan kondisi fisiologis untuk tumbuh, galur CM1 hanya dapat hidup dalam lingkungan dengan kadar salinitas 5—7%; sedangkan galur C-125 dapat hidup hingga kadar salinitas mencapai 12%. Perbandingan karakteristik antara kedua galur tersebut dapat dilihat pada Lampiran 1. Selain beberapa perbedaan morfologi dan fisiologis, perbedaan juga terdapat pada sekuens 16S rRNA yang memiliki kemiripan 99% dengan *Bacillus halodurans* C-125 (Ulfah dkk. 2011: 139—142).



Gambar 2.3 Struktur sirkular genomik *Bacillus halodurans* C-125

[sumber: Horikoshi 2008: 6]

Bacillus halodurans CM1 memiliki kemampuan sintesis enzim alkalifilik secara ekstraselular. Sintesis enzim xilanase dari ekspresi gen alkalofilik xilanase (alkxyn) telah diteliti oleh Noer (2011: 58) dan karakterisasi enzim lipase juga pernah diteliti oleh Aisyah (2017: 24). Menurut Ulfah dkk. (2011: 142) *B. halodurans* CM1 ternyata juga memiliki kemampuan untuk menyintesis enzim protease, lipase, amilase, dan gelatinase sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi tersebut.

2.4 *Escherichia coli* DH5 α

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki bentuk batang. *Escherichia coli* sering digunakan sebagai sel inang dalam penelitian pengklonaan gen, karena dapat dikultur di laboratorium, memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat bahkan dapat berkembang biak hingga dua kali jumlah semula (*doubling time*) dalam waktu 20 menit (Madigan, dkk. dalam Robinson 2003: 9—10). *Escherichia coli* juga mudah dimanipulasi, sehingga gen asing dapat diintroduksi ke dalam *Escherichia coli*. Proses tersebut dikenal dengan transformasi. Namun, *Escherichia coli* pada keadaan normal tidak dapat disisipi gen dari luar, sehingga bakteri harus mengalami perlakuan fisika atau kimiawi tertentu supaya dapat meningkatkan kemampuannya dalam mengambil DNA. Sel yang telah mengalami perlakuan ini disebut sel yang bersifat kompeten (Inoue, dkk. 1990:). *Escherichia coli* telah diketahui informasi mengenai keseluruhan genomnya. Bakteri ini memiliki 4.639.221 pasang basa dengan ± 4.000 gen. Selain itu, galur dari *Escherichia coli* pada umumnya juga tidak menyebabkan patogen (Madigan, dkk. dalam Robinson 2003: 9—10). Galur yang biasa digunakan dalam penelitian rekayasa genetika ialah DH5 α , TOP10, dan JM109 (Casali 2003: 27—36).

Escherichia coli DH5 α pertama kali diisolasi oleh Hanahan pada tahun 1983 (Griffith 2001: 9—11). Galur ini biasa digunakan untuk penelitian rekayasa genetika, karena memiliki mutasi gen *endA1*, *recA1*, *deoR*, *gyrA96*, dan *lacZAM15*. Gen *endA1* merupakan gen penyandi enzim endonuklease I yang

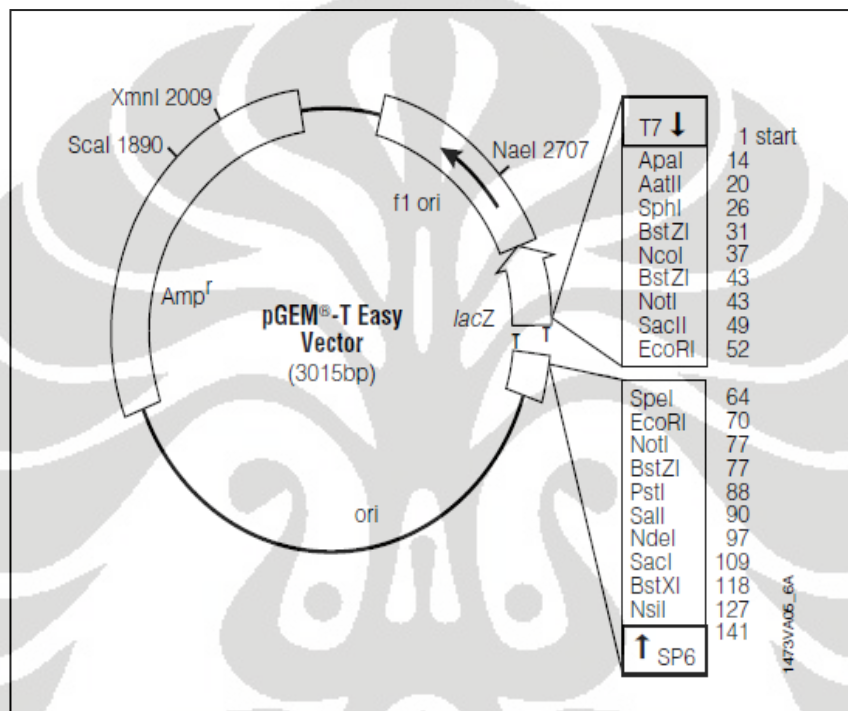
berperan dalam aktivitas degradasi, seperti pemotongan RNA dan nuklease pada DNA, memotong plasmid hingga menjadi 7 (tujuh) oligonukleotida. Mutasi ini menyebabkan *E. coli* galur DH5 α memiliki genom dan plasmid lebih stabil, sehingga menghasilkan kualitas plasmid yang lebih bagus ketika ekstraksi plasmid. Gen *recAI* menyandi protein *recA* yang berperan dalam regulasi perbaikan DNA, pembelahan kromosom dan rekombinasi homolog. Mutasi ini menyebabkan rekombinasi gen homolog tidak terjadi, sehingga vektor yang membawa gen sisipan dari bakteri inang dapat lebih stabil. Mutasi gen *deoR* menyebabkan bakteri dapat tetap tumbuh pada medium yang hanya mengandung satu sumber karbon, serta lebih efisien dalam penyerapan fragmen DNA ukuran besar, sehingga dapat membuat konstruksi dengan ukuran gen sisipan yang besar (Casali 2003: 27—36).

Gen *gyrA96* merupakan gen penyandi girase atau topoisomerase tipe II yang berperan dalam *unwinding* DNA dengan cara delesi dari pengulangan basa nukleotida. Mutasi ini dapat memudahkan proses pengklonaan, karena pengulangan basa nukleotida umumnya dapat ditemukan pada gen sisipan pada plasmid. Mutasi gen *lacZ Δ M15* menyebabkan tidak adanya aktivitas *lacZ* pada *E. coli*, sehingga enzim β -galaktosidase tidak diekspresikan. Enzim β -galaktosidase berperan untuk menguraikan laktosa, seperti X-GAL. Koloni yang dapat menguraikan laktosa pada substrat yang mengandung X-GAL akan berubah warna menjadi biru, sedangkan laktosa yang tidak terurai akan menyebabkan koloni tetap berwarna putih. Oleh karena itu, *Escherichia coli* DH5 α dapat diseleksi menggunakan medium seleksi putih biru (Casali 2003: 27—36).

2.5 Plasmid pGEM-T *easy*

Plasmid pGEM-T *easy* termasuk ke dalam plasmid dengan produk *high-copy-number* dengan ukuran 3015 pasang basa, sehingga banyak digunakan sebagai vektor dalam pengklonaan. Plasmid ini memiliki basa Timin (T) yang menggantung pada sisi terminal 3' atau biasa disebut T-*overhang*, sehingga plasmid ini dapat dijadikan vektor untuk sisipan gen hasil PCR (Promega 2015: 2). T-*overhang* pada plasmid menyebabkan plasmid memiliki keadaan *sticky end*,

sehingga meningkatkan probabilitas tepat sasaran dan efisiensi terjadinya ligasi gen sisipan hasil PCR. *T-overhang* juga berperan untuk mencegah terjadinya resirkularisasi gen sisipan. Namun, tidak semua gen produk PCR yang akan diligasi memiliki sisi terminal 3' yang berakhir basa adenin (A). Oleh karena itu, gen sisipan hasil PCR ditambahkan satu basa adenin (A) pada terminal 3' dengan cara *A-tailing* supaya gen dapat disisipkan pada pGEM T-*easy* (Promega 2015: 13).



Gambar 2.5 Plasmid pGEM T-*easy*

[sumber: Promega 2015: 11]

Plasmid pGEM T-*easy* memiliki 4 (empat) lokus gen besar yang berperan dalam pengklonan gen, yaitu *f1 ori*, *Amp^r*, *ori*, dan *lacZ*. Sekuens *origin of Replication* (*ori*) merupakan tempat inisiasi replikasi DNA plasmid. Plasmid tersebut juga memilih daerah restriksi yang telah dikenali dan ditandai oleh enzim restriksi nuklease, seperti *EcoRI*, *XbaI*, dan *SphI*. Gen asing disisipkan pada daerah *ori*, sehingga gen dapat dikarakterisasi setelah dilakukan amplifikasi (Promega 2015: 11). Area *Amp^r* merupakan lokus gen yang mengekspresikan

enzim β -laktamase, sehingga plasmid ini resisten terhadap antibiotik ampisilin (Cantrell 2003: 260).

Sekuens *lacZ* memiliki lokus promotor RNA polimerase T7 dan SP6 yang mengandung daerah penyandian α -*peptida* penginisiasi enzim β -galaktosidase. Daerah tersebut mengapit situs restriksi plasmid pGEM T-*Easy* yang menjadi tempat disisipkannya gen asing produk hasil PCR. Apabila gen asing berhasil dilekatkan oleh enzim ligase eksonuklease pada situs restriksi, α -*peptida* menjadi tidak aktif, sehingga enzim β -galaktosidase tidak diekspresikan. Gen sisipan tersebut menjadi supresor promotor *lacZ*. Enzim β -galaktosidase berperan untuk menguraikan X-GAL. Koloni yang mengandung plasmid dengan gen sisipan akan tetap berwarna putih, sedangkan koloni yang mengandung plasmid tanpa gen sisipan akan berubah menjadi biru. Oleh karena itu, plasmid ini dapat digunakan dalam seleksi pengklonaan menggunakan media putih biru (Lu 2003: 170).

2.6 Sekuensing

Sekuensing DNA merupakan teknik pengenalan urutan basa-basa nukleotida suatu DNA. Metode sekuensing terdiri atas 3 (tiga) jenis, yaitu metode Maxam Gilbert, Sanger dan *automated DNA sequencing*. Metode Maxam-Gilbert dilakukan menggunakan reagen spesifik untuk memotong untai DNA secara spesifik, seperti fosfat radioaktif. Metode Sanger dilakukan dengan cara menyintesis DNA secara *in vitro* dari cetakan (*template*) oleh DNA *polymerase*. DNA *polymerase* yang digunakan ialah deoksinukleotida (dNTP) dan dideoksinukleotida (ddNTP) (Campbell dkk. 2008: 403). Metode *Automated DNA sequencing* merupakan pengembangan dari metode Sanger. Metode ini dilakukan menggunakan mesin dan menggunakan ddNTP *flouresence* sebagai pengganti primer berlabel radioaktif. Oleh karena itu, setiap ddNTP akan memberi warna ketika diberikan cahaya. Cahaya yang dipancarkan kemudian ditangkap detektor serta diterjemahkan oleh program pada komputer sebagai susunan basa-basa dari DNA (Fairbanks & Andersen 1999: 287).

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian kloning gen penyandi *lysophospholipase* yang berasal dari *B. halodurans* CM1 menggunakan vektor pGEM T-*easy* pada *E. coli* DH5 α dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) yang berada di Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), PUSPIPTEK, Serpong, pada bulan Januari sampai Mei 2017.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan ialah *Bacillus halodurans* CM1 yang diisolasi dari sedimen pada pemandian air panas di Cimanggu, Jawa Barat. Sel inang yang digunakan ialah *Escherichia coli* DH5 α . Kedua biakan tersebut merupakan koleksi dari Laboratorium Biologi Molekular Non-Virus, Pusat Teknologi Bioindustri, Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LABTIAP), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT). Vektor yang digunakan ialah pGEM-T *easy* [Promega] dengan ukuran 3015 pasang basa.

3.3 Alat

Alat yang digunakan antara lain erlenmeyer, botol duran, ose, *mikrotube*, tabung reaksi, gelas ukur, tips, inkubator [Memmert], pH meter [Inolab], nanodrop [Biodop], *shaker incubator* [Kuhner], *vortex mixer*, autoklaf, mikropipet [Serana], timbangan, mini spin [Gyrozen], *thermal cycler* PCR [BIORAD], *thermomixer* [Infiniti], aparatus elektroforesis [Mupid], konsentrator [Infiniti], oven, cawan petri, *laminar air flow* (LAF), *thermomixer* [Infiniti], kulkas

[SHARP], *waterbath* [Buchi], *magnetic stirer*, dan *gel documentation* [Protein Sampel].

3.4 Bahan

Bahan yang digunakan ialah Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA), enzim T4 DNA ligase [KAPA], *KAPA Taq Extra Hot Start DNA polymerase* [KAPA], *tryptone* [Biomatik], *yeast* ekstrak [Himedia], natrium klorida, agarosa [Invitrogen], antibiotik ampisilin, akuades (ddH₂O), *buffer Tris Acetate* EDTA (TAE) 1x, *Tris buffer* fenol, *buffer Tris* EDTA (TE), natrium asetat, Etidium Bromida (EtBr), isopropanol, TB (*Transformation Buffer*), Dimetil Sulfoxida (DMSO), etanol 70%, *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG), *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside* (X-GAL), alkohol, *loading dye*, DNA ladder 1 kb [Fermentas], *tributyryn*, *Polyetylen Glycol* (PEG), pasangan primer gen *lysophospholipase* yaitu primer *phospholip-orf-fwd* (Lampiran 5) dan primer *phospholip-orf-rev* (Lampiran 5), enzim restriksi *EcoRI* [Fermentas] untuk pemotongan situs pada plasmid. Purifikasi gen yang telah teramplifikasi dilakukan dengan menggunakan *Gel/ PCR DNA Extraction Kit* [Geneaid] yang berisi *DF buffer* yang mengandung guanidin tiosinat, *W1 buffer*, *wash buffer* yang mengandung etanol, *elution buffer*, *DF column*, *collection tube*. Selain itu, bahan-bahan lain yang diperlukan dalam penelitian ialah sarung tangan [SENSI Gloves], *wrap plastic* [Klin Pak], kertas lapis alumunium, tusuk gigi, tisu [Tessa], korek api, dan masker [SENSI Mask]. Medium yang digunakan dalam penelitian ini ialah horikoshi cair, horikoshi agar yang mengandung xilan, Luria Bertani (LB) agar, Luria Bertani (LB) cair, *Super Optimal Broth* (SOB), *Super Optimal broth with Catabolite repression* (SOC), dan TBA (*tributyryn agar*).

3.5 Cara Kerja

Skema alur kerja penelitian dapat dilihat pada Lampiran 2 (dua).

3.5.1 Pembuatan Larutan, *Buffer* dan Media

Pembuatan larutan, *buffer*, dan media terdapat pada Lampiran 3 (tiga).

3.5.2 Ekstraksi Genom *Bacillus halodurans* CM1

Ekstraksi genom *Bacillus halodurans* CM1 dilakukan menggunakan metode ekstraksi fenol-kloroform dengan modifikasi (Saito & Miura 1963: 619—622). Satu koloni bakteri diinokulasikan ke dalam medium horikoshi cair pH 9 sebanyak 50 mL dan diinkubasi semalaman pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rotasi per menit (rpm) dan pada suhu 55°C. Sel dikumpulkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3.500 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Pelet sel diresuspensi dengan 2,5 mL 50 mM TE buffer (Tris HCl pH 8 + EDTA), lalu dibekukan selama 30 menit pada suhu -20°C. Larutan *lysozyme* segar ditambahkan sebanyak 0,25 mL pada sel tersebut, lalu dibiarkan mencair pada suhu ruang. Sel yang telah mencair kembali diletakkan ke dalam es selama 45 menit, lalu dipindahkan ke *microtube* baru dengan volume sebanyak 300 µL.

Larutan STEP (SDS, EDTA dan proteinase K) dan serbuk proteinase K dengan konsentrasi 1 mg/mL, ditambahkan sebanyak 50 µL ke dalam masing-masing *microtube* lalu dihomogenkan. *Microtube* tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam dengan sesekali diguncang perlahan. Tris *buffer* fenol sebanyak 300 µL ditambahkan ke dalam *microtube* yang telah diinkubasi, lalu dicampur perlahan menggunakan teknik *pipetting up and down* selama 5 menit. Sampel kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm, 4°C, selama 5 menit untuk memisahkan lapisan. DNA yang berada pada lapisan atas dipindahkan ke dalam *microtube* steril, lalu ditambahkan kloroform:isoamil alkohol (24:1) sebanyak 300 µL kemudian dicampurkan secara perlahan menggunakan teknik *pipetting up and down* selama 5 menit. Sentrifugasi kembali dilakukan pada 13.000 rpm, 4°C selama 5 menit. Supernatan dipindahkan kembali ke dalam *microtube* steril, lalu ditambahkan natrium asetat 3M sebanyak 0,1% dari volume supernatan, kemudian dihomogenisasi.

Etanol dengan konsentrasi 100% sebanyak 2 kali volume ditambahkan ke dalam campuran tersebut, kemudian dihomogenkan dengan cara membolak-balik

tabung. Genom akan membentuk endapan putih. *Microtube* tersebut disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang lalu pelet dicuci dengan etanol 70% sebanyak 500 µL, kemudian diguncang perlahan dan disentrifugasi kembali selama 5 menit, dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, sedangkan DNA yang berada dalam bentuk pelet dikeringkan pada konsentrator selama 15 menit. Pelet tersebut dilarutkan dalam TE atau air steril dan disimpan pada suhu -20°C.

3.5.3 Amplifikasi Gen *Lysophospholipase* menggunakan PCR

Daerah gen *lysophospholipase* diamplifikasi sebagai DNA sisipan untuk pengklonan gen yang akan dilakukan. Primer spesifik yang digunakan didesain berdasarkan sekuens gen penyandi *lysophospholipase Bacillus halodurans* C-125 pada situs <http://www.genome.jp> dengan kode gen BH3288. Primer didesain memiliki 1 (satu) perbedaan basa pada basa ke 783. Sekuens dari primer tersebut disajikan pada Lampiran 4 (empat). Amplifikasi tersebut dilakukan dengan menggunakan PCR dan enzim *KAPA Taq Extra Hot Start DNA polymerase* berdasarkan protokol dari KAPA (KAPA Biosystems 2017: 1—2). Total volume reaksi PCR untuk 20 µL sampel yang terdiri atas 0,5 µL genom *Bacillus halodurans* CM1 yang digunakan sebagai cetakan; pasangan primer gen *lysophospholipase* masing-masing sebanyak 1 µL; 4 µL 10x *KAPA Taq Extra Buffer*; 1,2 µL 25 mM MgCl₂; 0,4µL 10 mM dNTPs; 0,2 µL Taq DNA *polymerase* 2,5U/µL; dan 11,7 µL ddH₂O. Program PCR diatur dengan kondisi berdasarkan modifikasi dari prosedur *KAPA Taq Extra Hot Start* yang tersaji pada Lampiran 5 (lima). Denaturasi, penempelan primer dan pemanjangan dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

3.5.4 Elektroferesis menggunakan Gel Agarosa

Hasil PCR divisualisasi dengan cara elektroforesis menggunakan gel agarosa 1%. Gel dimasukkan ke dalam perangkat elektroforesis dan dituangkan *buffer* TAE 1x sampai gel terendam. Cara pembuatan gel agarosa 1% dan *buffer*

TAE 1x terdapat pada Lampiran 3. Sebanyak 3 μ L *ladder* DNA dimasukkan ke dalam *well* agarosa, sedangkan untuk sampel diambil 3 μ L sampel DNA lalu dicampur dengan 1 μ L *loading dye* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan teknik *up and down*. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam *well* gel agarosa yang belum diisi *ladder*. Alat elektroforesis dihubungkan dengan aliran listrik tegangan 100 Volt selama \pm 23 menit. Gel agarosa kemudian direndam dalam larutan etidium bromida selama 10 menit. Hasil elektroforesis dilihat di atas UV transiluminator dan didokumentasikan dengan *Gel Documentation*.

3.5.5 Purifikasi Gen *Lysophospholipase* Hasil Amplifikasi PCR

Purifikasi fragmen hasil PCR dilakukan dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Extraction Kit* [Geneaid] sesuai dengan protokol (Geneaid 2012: 3). Sebanyak 5x volume sampel DF *buffer* yang mengandung guanidin tiosinat hasil PCR ditambahkan DF *buffer* sebanyak 5x lalu dicampur dengan menggunakan vorteks. Sampel tersebut diinkubasi pada suhu 55°C selama 15 menit, sambil dikocok setiap selang waktu 2 menit. Kolom DF dimasukkan ke dalam *collection tube*, kemudian sampel dipindahkan ke dalam kolom DF tersebut. Kolom DF disentrifugasi dengan 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang terdapat pada *collection tube*. Sebanyak 600 μ L *wash buffer* yang mengandung etanol dimasukkan ke dalam kolom DF, kemudian didiamkan selama 1 menit, lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang terdapat pada *collection tube* dibuang, lalu kolom DF dan *collection tube* kembali disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit hingga kolom matriks kering sehingga residu *wash buffer* juga hilang. Kolom DF dipindahkan ke tabung pemulihan (*recovery tube*) atau *microtube* steril lalu ditambahkan *elution buffer* sebanyak 30 μ L ke tengah-tengah matriks kolom. Tabung tersebut diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Hasil dari purifikasi produk PCR tersebut kemudian diukur konsentrasinya menggunakan *Nanodrop*.

3.5.6 Ligasi Gen *Lysophospholipase* ke pGEM-T Easy

Plasmid pGEM-T Easy merupakan vektor yang memiliki T-Overhang, sedangkan fragmen *lysophospholipase* tidak menghasilkan A-Overhang pada kedua ujung ketika amplifikasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penambahan basa Adenin atau disebut A-tailing untuk menambahkan Adenin di ujung 3' pada produk PCR supaya dapat disisipi. A-tailing dilakukan berdasarkan protokol KAPA Biosystem (2017: 1—2), dengan cara menginkubasi fragmen PCR yang ditambahkan sebanyak 0,1 dNTPs, KAPA Taq extra buffer B dengan Mg^{2+} , dan KAPA Taq Extra Hot Start DNA polymerase pada suhu 72°C selama 30 detik.

Ligasi fragmen PCR ke dalam vektor pGEM-T easy dilakukan sesuai dengan protokol Promega (2015: 4). Ligasi menggunakan T4 DNA Ligase dengan rasio molar 3:1 dengan fragmen gen. Fragmen gen *lysophospholipase* hasil A-tailing diligasi sesuai dengan protokol ligasi untuk vektor pGEM-T easy dari Promega. Produk hasil A-tailing sebanyak 3 μ L; 1 μ L vektor pGEM-T easy; 1 μ L 10x buffer T4 DNA ligase; dan 1 μ L T4 DNA Ligase 10 U/ μ L dicampur dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalaman.

3.5.7 Pembuatan Sel Kompeten *Escherichia coli* DH5 α

Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 α didasarkan pada metode $CaCl_2$ (Inoue dkk. 1990). Seluruh tahapan pembuatan kompeten sel ini dilakukan dalam keadaan aseptis. Kultur *E. coli* DH5 α dari stok digores pada media LB agar, dan diinkubasi \pm 16 jam pada suhu 37°C. Koloni tunggal *E. coli* DH5 α dari plate diinokulasi ke media LB 50 mL lalu diinkubasi pada 100 rpm, 30 °C selama semalaman sampai nilai OD 600 =0,4-0,8. Kultur bakteri kemudian diinkubasi dalam es sampai dingin setelah itu disentrifugasi pada 3.500 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan cara aseptis. Pelet disuspensikan dengan bantuan mikropipet dengan menambahkan TB buffer (Transformation buffer) dingin sebanyak 16,75 mL, lalu diinkubasi pada es selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan lagi pada 3.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan cara aseptis di dalam laminar air flow (LAF). Pelet

disuspensikan dengan bantuan pipet dengan menambahkan TB *buffer* dingin sebanyak 4 mL, diinkubasi di es selama 10 menit. Sebanyak 0,3 mL DMSO ditambahkan lalu diinkubasi dalam es selama 10 menit. Campuran tersebut dipindahkan ke *microtubes* masing-masing sebanyak 0,2 mL, dan disimpan dalam -80°C.

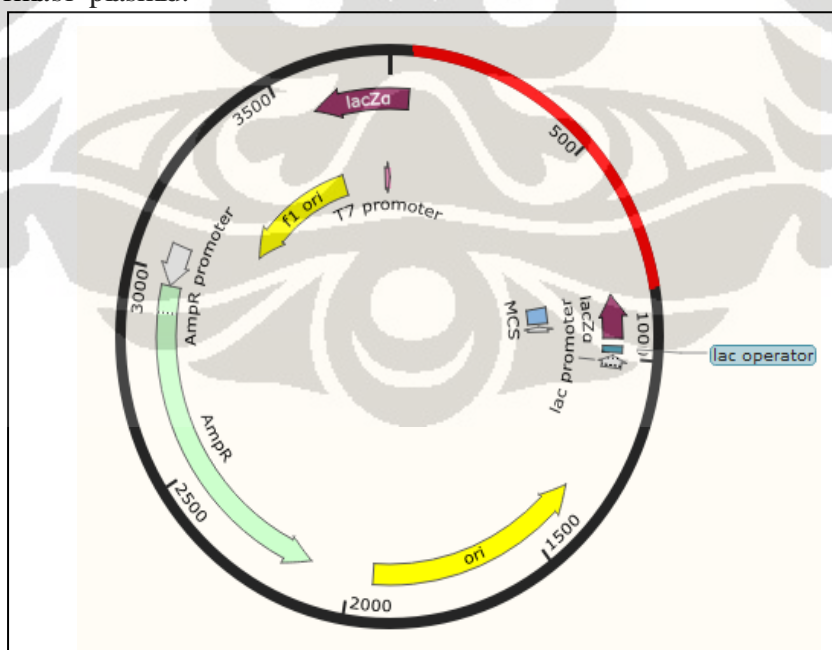
3.5.8 Transformasi Plasmid Rekombinan ke *Escherichia coli* DH5 α

Transformasi DNA plasmid produk ligasi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α dilakukan dengan metode *heat shock* (Hanahan 1983: 561) yang dimodifikasi. Kompeten sel yang telah disimpan diinkubasi di dalam es hingga mencair selama \pm 1 jam. Transformasi dilakukan dengan cara mencampurkan 10 μ L produk ligasi dengan 100 μ L kompeten sel tersebut, kemudian disuspensikan dengan teknik *pipeting up and down* hingga tercampur sempurna, lalu diinkubasi dalam es selama 30 menit. Sel kompeten diberikan kejutan panas dengan cara diinkubasi dalam *thermomixer* 42°C tepat selama 1 menit, kemudian diinkubasi kembali dalam es selama 2 menit. Medium SOC ditambahkan sebanyak 800 μ L dan diinkubasi dalam *shaker incubator* 150 rpm, 37°C selama 1 jam. Sel disentrifugasi 6.000 rpm selama 5 menit, sebanyak 200 μ L supernatan dibuang, dan sisanya diresuspen kembali dengan pelet.

Seleksi dilakukan pada medium LB agar yang mengandung antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 100 μ g/mL. Sebanyak 30 μ L disebar merata pada medium LB agar + ampisilin, 40 μ L *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) 0,1 M dan 50 μ L *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside* (X-GAL) 4%. Transformasi kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 37°C. Keberhasilan proses transformasi dapat dilihat dengan metode *screening* koloni putih-biru pada medium yang mengandung X-GAL. Koloni yang diduga positif berwarna putih diambil, lalu dikultur dalam media LB cair yang mengandung ampisilin untuk selanjutnya diisolasi DNA plasmidnya.

3.5.9 Konstruksi Plasmid Rekombinan menggunakan *SnapGene*

Konstruksi peta plasmid rekombinan dilakukan dengan menggunakan program *SnapGene* untuk mengetahui ilustrasi letak posisi gen *insert lysophospholipase* yang akan diligasikan ke plasmid pGEM-T *Easy*. Langkah pertama yang dilakukan ialah memasukan sekuens dari pGEM-T *Easy* ke dalam program, dengan cara memilih opsi “insert” atau “open file”. Peta plasmid akan terbuka, lalu pilih opsi “action” kemudian “restriction cloning” dan “insert fragment”. Fragmen yang dimasukkan ialah fragmen gen penyandi *lysophospholipase Bacillus halodurans* C-125 yang dijadikan refrensi, setelah itu dilakukan perintah untuk simulasi kloning dan akan didapatkan ilustrasi konstruksi peta plasmid seperti pada Gambar 3.5.9 dengan ukuran ± 3798 pasang basa. Posisi gen *insert* terletak pada *multiple cloning site* (MCS) dari pGEM-T *Easy*, yang berada pada situs operon *lac* dan diantara situs *EcoRI*. Operon *lac* terdiri atas *start* kodon dari *lacZ*, *lac* operator dan β -*lactamase coding region*. Berdasarkan Gambar 3.5.9 terdapat *selectable marker* (penyeleksi) berupa gen resisten ampisilin (AmpR) yang digunakan untuk seleksi antibiotik pada plasmid rekombinan. Penyeleksi ini akan menjadi parameter keberhasilan proses transformasi plasmid.



Gambar 3.5.9 Konstruksi plasmid pGEM T-easy—*lysophospholipase*

[sumber: Helianti 2017 unpublished data]

3.5.10 Ekstraksi Plasmid dari *Escherichia coli* DH5 α Rekombinan

Isolasi DNA plasmid dari koloni yang diduga positif dilakukan dengan metode alkali (Birnboim & Doly 1979: 1513—1517). Sebanyak 3 mL kultur *E. coli* DH5 α rekombinan dalam 5 mL LB+ampisilin yang telah ditumbuhkan semalaman, disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm, 4°C selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet dicampur dengan 100 μ L *solution* I dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Sebanyak 200 μ L *solution* II ditambahkan, kemudian tabung dikocok perlahan ke atas dan ke bawah, lalu diinkubasi dalam es selama 5 menit. *Solution* III sebanyak 150 μ L segera ditambahkan ke dalam tabung tersebut, kemudian dikocok dengan kuat dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 13.000 rpm, 4°C, selama 20 menit, kemudian supernatan diambil dan dipindahkan ke *microtube* baru. Isopropanol dengan rasio 1:1 terhadap supernatan yang telah diambil, ditambahkan. Tabung tersebut dibolak-balikan, lalu diinkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm, 4°C, selama 30 menit, dan supernatan dibuang. Pelet yang terbentuk kemudian dicuci dengan 0,5 mL etanol 70 % untuk menghilangkan residu isopropanol, lalu disentrifugasi 13.000 rpm, 4°C, selama 5 menit dan supernatan dibuang. Pelet dikeringkan dan dilarutkan dalam 50 μ L Tris-HCl 10 mM pH 8 + RNase 1 mg/mL.

Plasmid hasil isolasi yang akan digunakan untuk sekuensing perlu dipurifikasi terlebih dahulu. Purifikasi dilakukan menggunakan metode presipitasi kualitatif PEG (Pulleyblank, dkk. 1983: 191—193). Sebanyak 30 μ L *Polyethylene Glycol* (PEG) 20% dan 2,5 M NaCl ditambahkan ke dalam plasmid, lalu dikocok sampai tercampur sempurna. Campuran tersebut kemudian diinkubasi dalam es selama 1 jam, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm, 4°C selama 10 menit, kemudian dicuci dengan etanol 70% sebanyak 100 μ L. Campuran disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm, 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang, lalu pelet dikeringkan menggunakan konsentrator. Pelet kering kemudian dilarutkan dalam 20 μ L Tris-HCl 10mM pH 8. Plasmid

hasil isolasi yang telah dipurifikasi, lalu divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1 %.

3.5.11 Konfirmasi Plasmid Rekombinan dengan Enzim Restriksi

Konfirmasi digesti menggunakan enzim *EcoRI* dilakukan pada koloni transforman yang diduga mengandung plasmid rekombinan. Plasmid rekombinan tersebut telah diisolasi menggunakan metode alkali. Reaksi Digesti yaitu terdiri atas 2 μL 10x *buffer EcoRI*; 3 μL DNA plasmid rekombinan yang akan dikonfirmasi; 0,5 μL enzim restriksi *EcoRI*; dan 14,5 μL ddH₂O. Campuran tersebut diinkubasi pada 37°C selama 2 jam. Enzim *EcoRI* dinaktivasi dengan cara diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit. Hasil restriksi kemudian dianalisis dengan gel elektroforesis pada agarosa 1% menggunakan 1 kb DNA *ladder*, lalu dibandingkan dengan program *SnapGene*.

3.5.12 Sekuensing dan Analisis Sekuens DNA

Hasil amplifikasi gen *lysophospholipase* yang disisipkan pada pGEM T-*easy* dikirimkan ke *First Base* untuk disekuensing. Sekuensing dilakukan menggunakan primer *forward* pUC M13 (-40) dan primer *reverse* M13 (-20). Hasil sekuensing kemudian diedit dengan perangkat lunak BioEdit dan *Sequence Scanner 2.0* (*Applied Biosystems*), kemudian dilakukan analisis sekuens menggunakan program CLUSTAL W pada <http://www.genome.jp>. Analisis sekuens dilihat hubungan kekerabatannya dengan database gen yang tersedia pada *Genbank* menggunakan pendekatan bioinformatika yaitu melalui teknik *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> dan program BLAST pada <http://www.genome.jp> untuk mengonfirmasi bahwa fragmen DNA produk PCR merupakan fragmen gen *lysophospholipase*.

3.5.13 Uji Kualitatif Produk Gen pada Media Lipid

Sampel *Escherichia coli* DH5 α yang mengandung gen *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 digores pada media LB agar yang mengandung ampisilin dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hal yang sama dilakukan juga terhadap kontrol, yaitu koloni yang berwarna biru pada kultur transforman. Koloni tunggal yang terbentuk diinokulasi ke dalam 5 mL media LB cair yang mengandung ampisilin 100 $\mu\text{g/mL}$. Kultur sampel diinkubasi menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama semalaman, lalu kultur disegarkan kembali dengan cara memindahkan 1 mL ke dalam 7 mL LB dengan ampisilin. Kultur yang telah disegarkan dibiarkan selama ± 3 jam hingga mencapai kisaran OD antara 0,7 dan 0,8. Pengukuran OD dilakukan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm. Nilai OD antara kultur sampel dan kontrol negatif diusahakan memiliki nilai hasil pengukuran yang sama. Kultur yang telah mencapai nilai OD tersebut, disegarkan kembali dengan cara mengambil 2 mL ke dalam 50 mL LB dengan kandungan ampisilin, *tributylin* 2% dan IPTG 0,1 M; kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu 37°C, kecepatan 150 rpm dan selama semalaman.

Sebanyak 1,5 μL kultur sampel ditetaskan menggunakan mikropipet ke dalam media LB yang mengandung *Tributylin* (TBA) dan 0,1 M IPTG untuk uji kualitatif (Litthauer dkk. 2010: 4281—4284). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24—72 jam. Pembuatan media TBA dapat dilihat pada Lampiran 2. Aktivitas lipolitik dari *Escherichia coli* DH5 α rekombinan dibandingkan berdasarkan indeks lipolitiknya. Diameter sisi atas-bawah dan kanan-kiri diukur dan dihitung rata-ratanya.

3.5.14 Pengolahan dan Analisis Data

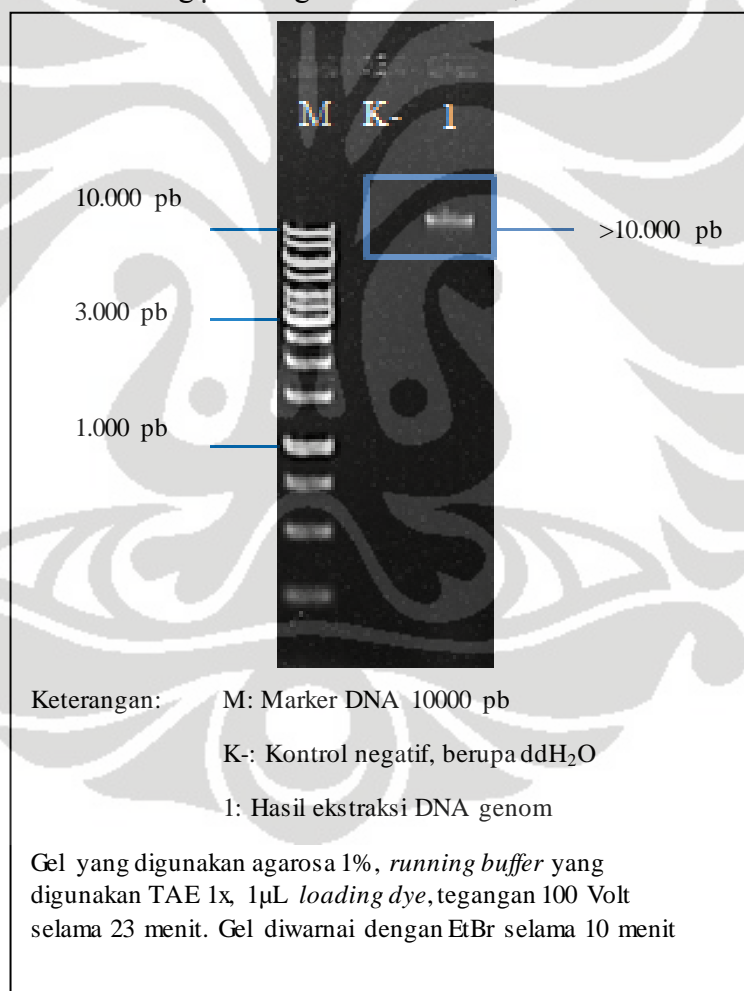
Data pengklonaan gen *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 pada *Escherichia coli* DH5 α dan uji kualitatif produk gennya ditampilkan dalam bentuk gambar dan deskriptif.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Genom *Bacillus halodurans* CM1

Hasil ekstraksi DNA genom divisualisasikan dengan gel agarosa 1% dapat dilihat pada Gambar 4.1. Hasil visualisasi menunjukkan tidak terdapat pita DNA pada lajur yang mengandung kontrol negatif, tetapi pita DNA yang tebal terdapat pada lajur 1 (satu) dengan ukuran di atas 10.000 pasang basa. Genom hasil ekstraksi tersebut diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan Nanodrop [Biodrop], yaitu sebesar 52ng/μL dengan kemurnian 1,823.



Gambar 4.1 Hasil ekstraksi DNA genom *Bacillus halodurans* CM1

[sumber: dokumentasi pribadi]

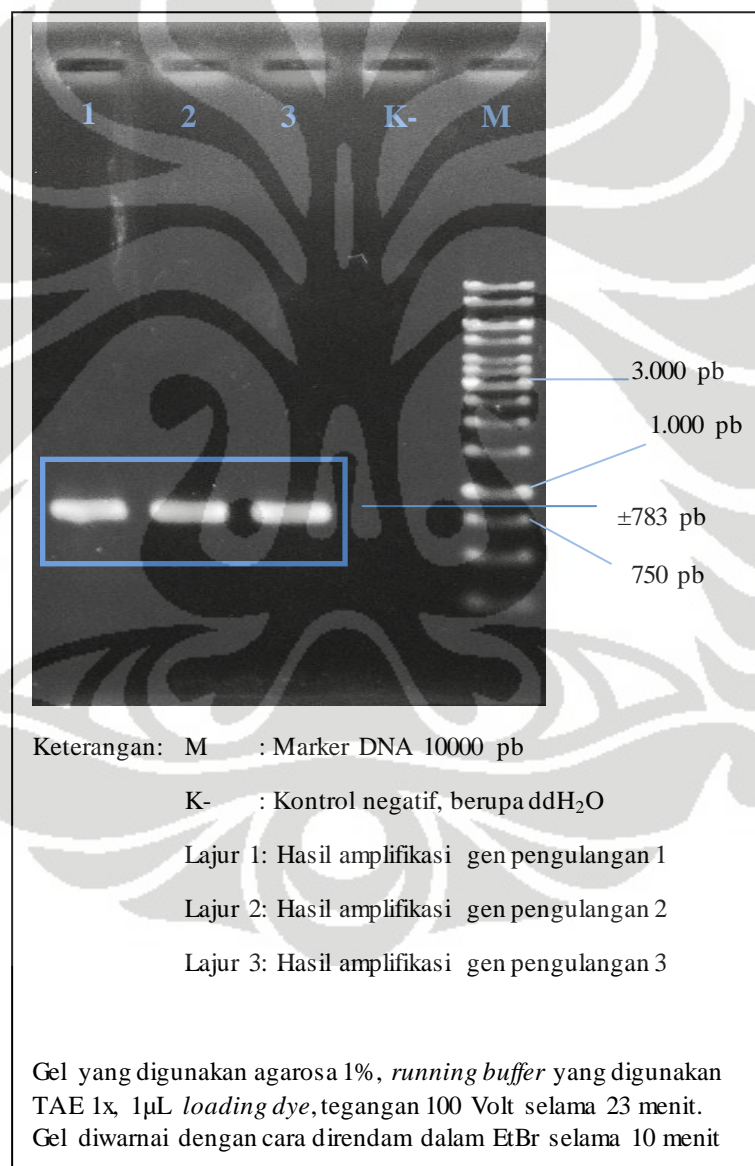
Menurut Takami (2000: 4317), ukuran keseluruhan genom dari *Bacillus halodurans* C-125 yang memiliki kemiripan 99% dengan *Bacillus halodurans* CM1, ialah lebih besar dari 10.000 pasang basa, atau lebih tepatnya 4.202.353 pasang basa sehingga hasil ekstraksi genom yang didapatkan sesuai dengan literatur. Pita tunggal dan tebal mengindikasikan hasil dari ekstraksi menggunakan metode fenol yang diintroduksi oleh Saito & Miura (1963) dengan beberapa modifikasi berhasil dan tidak mengandung kontaminan, karena tidak terdapat pita pada lajur negatif (Handoyo & Ruderta 2000: 1). Menurut Henegariu dkk. (1997: 510), konsentrasi DNA cetakan sejumlah 30—500 ng dapat digunakan untuk *template* reaksi PCR dengan volume $\pm 20 \mu\text{L}$. Oleh karena itu, DNA genom yang telah diekstraksi dapat digunakan untuk amplifikasi gen.

Ekstraksi DNA genom *Bacillus halodurans* CM1 menggunakan metode Saito & Miura (1963: 619—622) pernah dilakukan oleh Noer (2011: 31) dan Safirah (2016: 29). Hasil dari ekstraksi tersebut juga menunjukkan pita dengan ukuran ≥ 10.000 pb. Ekstraksi DNA merupakan proses pemisahan DNA genom dengan pengotor-pengotor lain, seperti protein dan lemak. Penambahan *lysozyme* pada tahapan ekstraksi bertujuan menghancurkan peptidoglikan yang merupakan komponen utama dalam dinding sel bakteri. Selain itu, penambahan deterjen SDS bertujuan menghancurkan lapisan lemak pada membran sel, sehingga membuat DNA akan lebih mudah terekstraksi. Penambahan proteinase K dan fenol dapat memisahkan protein dengan asam nukleat sehingga asam nukleat akan tetap berada dalam larutan. Hal tersebut dapat terjadi karena fenol merupakan pelarut organik (Brown 2010: 29).

4.2 Amplifikasi Gen *Lysophospholipase* menggunakan PCR

Hasil dari amplifikasi fragmen gen *lysophospholipase* dapat dilihat pada Gambar 4.2. Visualisasi tersebut menunjukkan terdapat pita tebal dan jelas diantara 750 pasang basa dan 1.000 pasang basa pada lajur 1, 2, dan 3. Namun, tidak terdapat pita pada lajur kontrol negatif yang mengindikasikan tidak terkontaminasi. Berdasarkan Gambar 4.2., dapat disimpulkan bahwa gen target telah teramplifikasi dan tidak terjadi kontaminasi. Hasil dari produk PCR

dipurifikasi menggunakan *Gel/PCR purification extraction kit* [GeneAid] kemudian diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan *Nano drop*. Konsentrasi dan kemurnian yang terukur ialah 98,24 ng/ μ L dan 1,851. Fragmen gen *lysophospholipase* diamplifikasi menggunakan primer spesifik, yaitu primer *forward phospholip-orf-fwd* dan *reverse phospholip-orf-rev*. Berdasarkan *database* di NCBI dan www.genome.jp primer tersebut menunjukkan ukuran gen sebesar 783 pasang basa. Oleh karena itu, hasil visualisasi sesuai dengan gen target yang diharapkan. Selain itu, gen yang telah teramplifikasi merupakan gen spesifik dan murni, sehingga tahap purifikasi berhasil dilakukan.



Gambar 4.2 Hasil amplifikasi gen *lysophospholipase*

[sumber: dokumentasi pribadi]

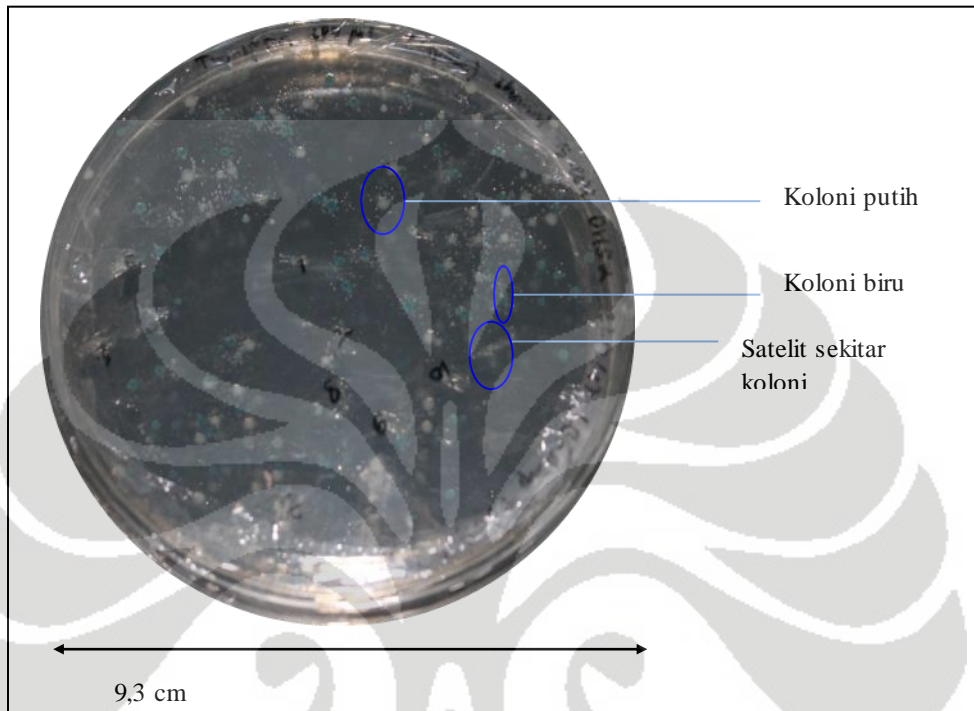
Amplifikasi dilakukan menggunakan KAPA *Extra Hot Start*. Keberhasilan amplifikasi ditentukan oleh beberapa faktor seperti konsentrasi dan desain primer yang digunakan, deoksiribonukleotida triposfat (dNTP), komposisi *buffer*, jumlah siklus reaksi, dan enzim *taq polymerase*. Penggunaan enzim *polymerase* dengan *proofreading* yang tinggi dapat meminimalisir kesalahan dalam reaksi PCR (Zahn dkk. 2007: 463). KAPA *Extra Hot start* memiliki tingkat keakuratan yang tinggi dengan aktivitas eksonuklease *proofreading* sehingga dapat meminimalisir hasil amplifikasi yang tidak spesifik selama proses reaksi, serta meningkatkan sensitivitas dan reaksi menjadi lebih efisien (KAPA *Biosystems* 2017: 1). *Proofreading* merupakan aktivitas koreksi basa nukleotida oleh DNA polimerase (Wanlin Bi & Stambrook 1998: 3073). Amplifikasi gen *alkxyn* dan 16S rRNA dari *Bacillus halodurans* CM1 juga pernah dilakukan oleh Noer (2011: 32) dan Safirah (2016: 30) menggunakan KAPA *Extra Hot Start*.

Keberhasilan amplifikasi juga ditentukan oleh kualitas primer serta kespesifikan primer. Primer yang baik memiliki panjang basa 18—30 basa, konsentrasi primer antara 0,1—0,4 μM dan memiliki *annealing* yang tidak terlalu jauh antara *primer forward* dan *reverse*. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik sehingga menyebabkan terbentuknya primer dimer, sedangkan konsentrasi yang rendah dapat memengaruhi efisiensi PCR (Grunewald 2003: 92). Penempelan primer yang spesifik dipengaruhi oleh kemiripan yang tinggi dengan sekuens target (Abd-Elsalam 2003: 94). Efisiensi PCR juga dipengaruhi oleh jumlah siklus. Jumlah siklus yang melebihi 30 siklus akan mengalami penurunan efisiensi amplifikasi. Hal tersebut disebabkan jumlah reagen dan aktivitas DNA polimerase telah menurun (Kolmodin & Birch 2002: 12).

4.3 Transformasi Plasmid ke *Escherichia coli* DH5 α

Hasil ligasi dapat dilihat dari keberhasilan transformasi, yaitu koloni putih dapat tumbuh pada media LB yang mengandung ampisilin, IPTG dan X-GAL. Hasil transformasi yang dilakukan dapat dilihat di Gambar 4.3. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat 102 koloni putih serta satelit pada sekitar koloni.

Berdasarkan jumlah tersebut, dapat disimpulkan bahwa transformasi memiliki nilai efisiensi 1×10^8 cfu/ μ g DNA. Namun, hanya 12 klon yang diambil untuk konfirmasi restriksi pada tahap selanjutnya. Pengambilan tersebut berdasarkan koloni putih yang tidak dikelilingi oleh satelit.



Gambar 4.3 Hasil transformasi pada medium LB+XGAL+IPTG

[sumber: dokumentasi pribadi]

Berdasarkan Tu dkk. (2005: 117), keberhasilan transformasi dapat ditentukan dengan nilai efisiensi transformasi yang tinggi. Efisiensi transformasi yang dihasilkan tinggi apabila mencapai $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g DNA (Promega 2015: 6). Berdasarkan nilai efisiensi transformasi yang didapat, maka transformasi yang dilakukan menghasilkan nilai transformasi yang tinggi. Efisiensi transformasi yang tinggi juga dipengaruhi oleh keberhasilan ligasi gen sisipan dengan vektor, fase pertumbuhan sel, teknik dalam pembuatan kompeten sel, dan penggunaan kompeten sel yang memiliki nilai efisiensi tinggi hingga 10^{10} transforman/ μ g DNA (Ahmad dkk. 2014: 568). Pembuatan kompeten sel dilakukan dengan penambahan larutan CaCl_2 ketika memasuki permulaan fase logaritmik pertumbuhan, karena pada fase tersebut mengalami pertumbuhan yang paling optimal dan aktif membelah sehingga memudahkan introduksi DNA asing.

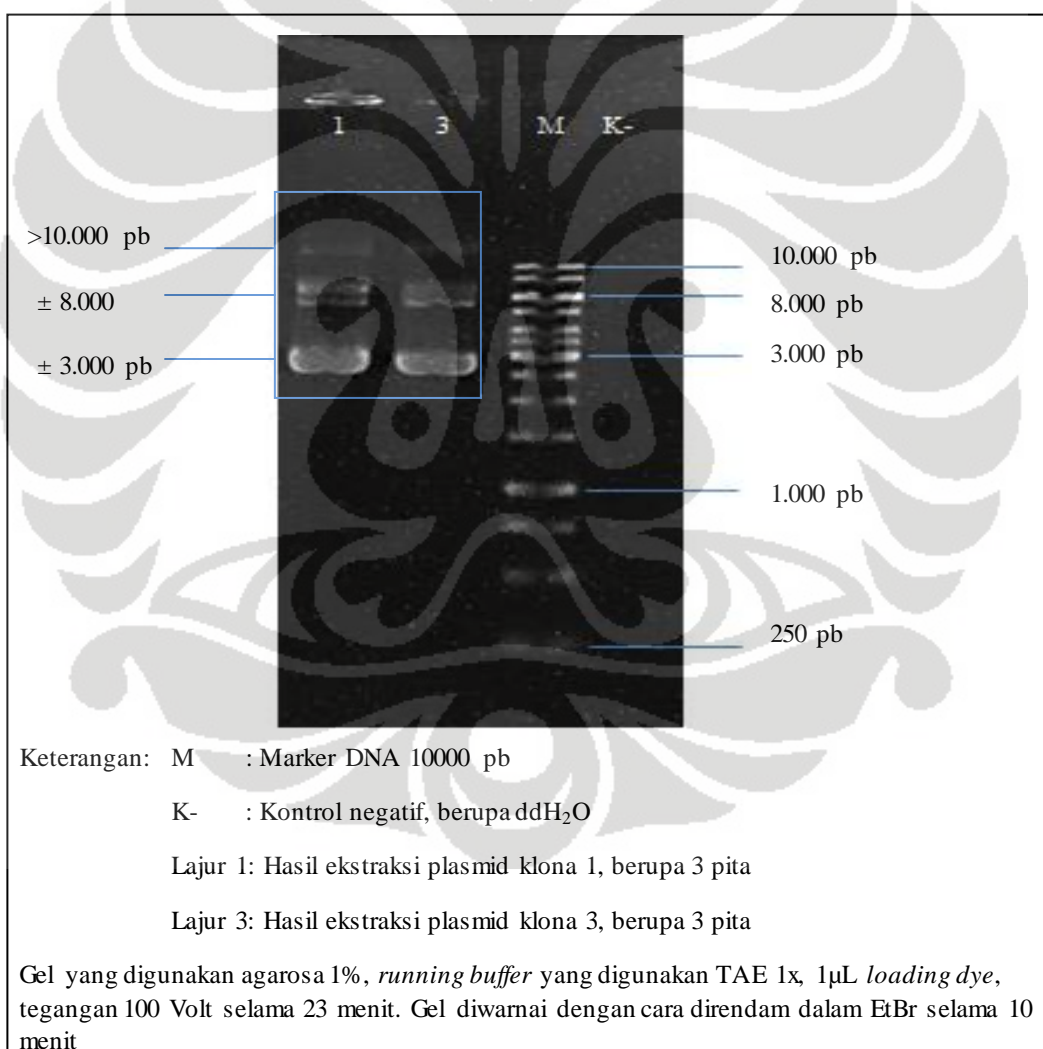
Selain itu, pada fase ini dinding bakteri permeabel terhadap ion klorida, tetapi tidak pada ion kalsium sehingga dinding akan membesar dan memudahkan DNA asing untuk masuk ke dalam sel (Tu dkk. 2005: 116—118).

Plasmid pGEM T-*easy* digunakan karena memiliki basa timin (T) yang mengantung pada kedua ujungnya atau sering disebut *T-overhang*, sehingga membuat produk PCR langsung dapat disisipkan ke dalam vektor tanpa harus dipotong. Hal tersebut mencegah resirkularisasi atau melingkarnya kembali vektor sebelum disisipi oleh gen sisipan. Gen sisipan tersebut harus diberikan penambahan gugus adenin atau disebut dengan *A-tailing* agar bisa menempel pada daerah *T-overhang* vektor tanpa plasmid harus direstriksi terlebih dahulu. Vektor pGEM-T *easy* yang digunakan memiliki promotor T7 dan SP6 yang berada diantara *Multiple Cloning Site* (MCS) dan promotor *lacZ* yang menyandi enzim β -galaktosidase. Enzim tersebut berperan dalam penguraian laktosa, seperti X-GAL, sehingga digunakan dalam *screening* putih biru. Koloni yang memiliki enzim tersebut dapat menguraikan X-GAL, sehingga apabila ditumbuhkan pada medium mengandung X-GAL, koloni akan berubah menjadi warna biru, sedangkan koloni yang tidak dapat menguraikan X-GAL akan berwarna putih. Hal tersebut disebabkan oleh gen sisipan pada pGEM T-*easy* berperan menjadi supresi bagi *lacZ*, sehingga tidak dapat mengekspresikan β -galaktosidase lalu mengubah warna koloni (Lu 2003: 170). Promotor *lacZ* dapat diinduksi oleh IPTG sehingga enzim dapat diekspresikan, sehingga medium penyeleksi juga perlu ditambahkan IPTG. Oleh karena itu, plasmid yang telah tersisipi gen dan tidak tersisipi gen dapat diseleksi. Berdasarkan Hansen dkk. (1998: 343—345), transformasi yang dilakukan berhasil karena terdapat 102 koloni putih, yaitu koloni dengan plasmid pGEM T-*easy* yang telah disisipi gen.

Hasil transformasi menunjukkan terbentuknya satelit disekitar koloni. Menurut EDVOTEK (2005: 7), satelit merupakan koloni-koloni berukuran kecil yang tidak resisten terhadap antibiotik ampisilin. Satelit dapat terbentuk pada *plate* hasil transformasi dengan waktu inkubasi yang lama dan konsentrasi ampisilin yang rendah. Selain itu, satelit dapat terbentuk apabila ampisilin rusak sehingga β -laktamase dapat dieskpresikan.

4.4 Ekstraksi Plasmid dari *Escherichia coli* DH5 α Rekombinan

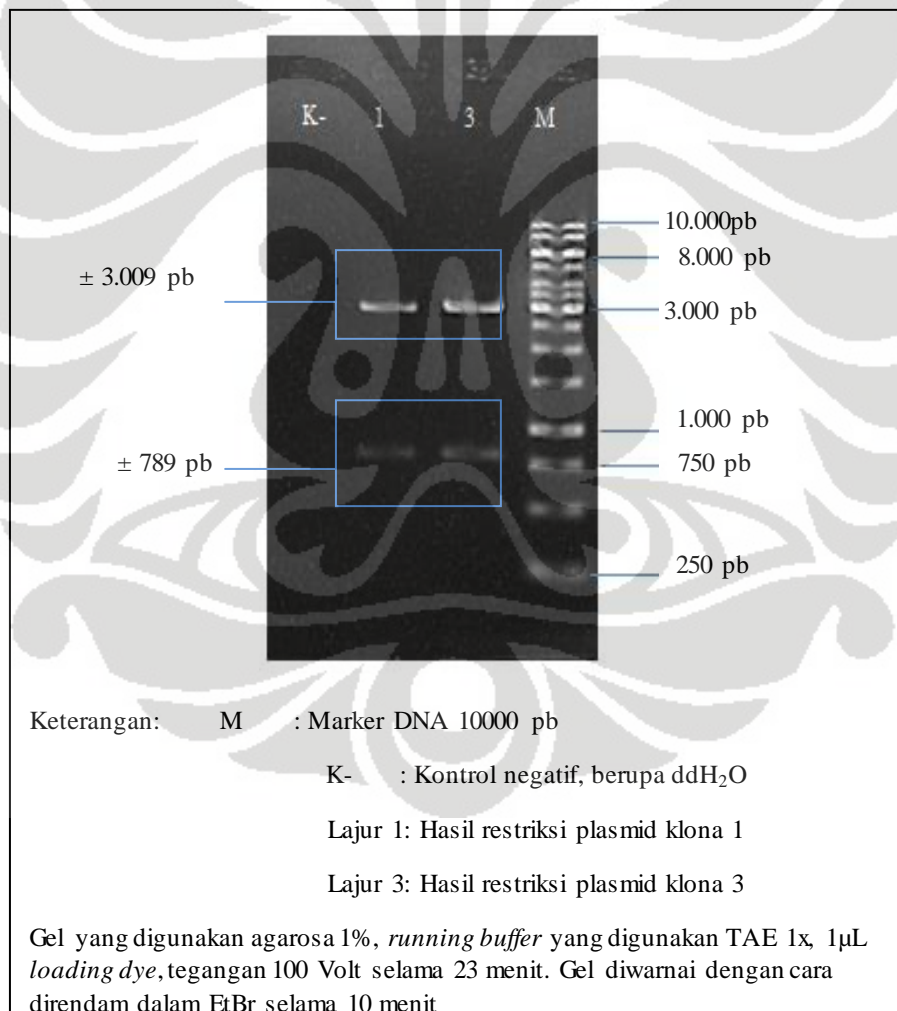
Visualisasi dari ekstraksi plasmid yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 4.4.(1). Hasil ekstraksi plasmid menunjukkan bahwa terdapat 3 (tiga) pita dengan ukuran yang berbeda pada 12 koloni putih yang diduga mengandung plasmid yang telah disisipi gen. Pita pertama yang paling tipis berada pada ± 10.000 pb, pita ke dua yang berada di tengah berada pada marka ± 8.000 pb; sedangkan pita yang paling tebal berada di marka dengan ukuran ± 3.000 pb. Namun, klon 1 dan 3 menunjukkan 3 (tiga) pita yang sangat jelas setelah dipurifikasi menggunakan PEG. Hasil ekstraksi tersebut akan digunakan untuk keperluan sekuensing.



Gambar 4.4.(1) Hasil ekstraksi plasmid klon 1 dan 3

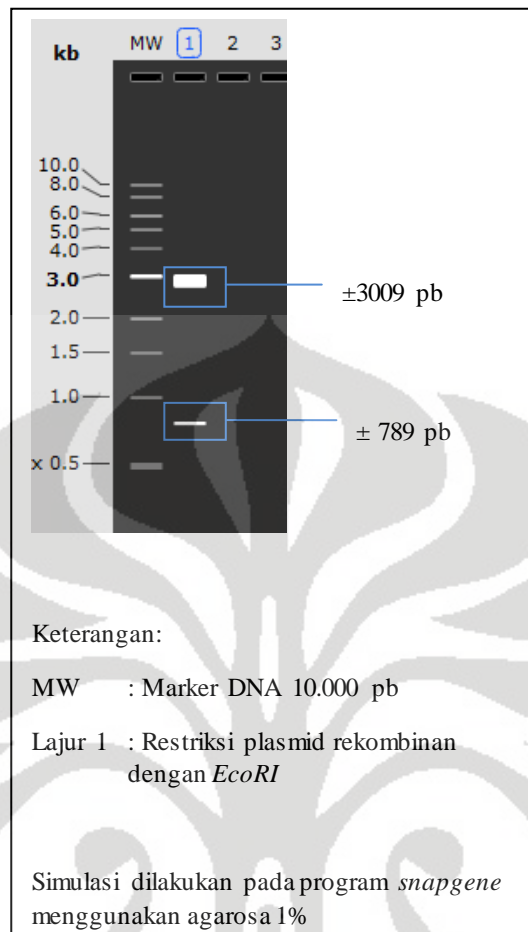
[sumber: dokumentasi pribadi]

Hasil restriksi menggunakan *EcoRI* dapat dilihat pada Gambar 4.4.(2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat 2 (dua) pita tebal berukuran ± 3.009 dan ± 789 pasang basa pada klon 1 (satu) dan klon 3 (tiga). Hal tersebut sesuai dengan simulasi visualisasi agarosa di program *snap gene* yang dapat dilihat pada Gambar 4.4.(3). Plasmid didigesti menggunakan situs *EcoRI* untuk mengonfirmasi bahwa gen telah berhasil disisipi. Plasmid pGEM T-*easy* memiliki 2 (dua) situs *EcoRI*, yang terletak diantara *multiple cloning site* (MCS), tepatnya berada pada urutan basa ke 52 dan 841, sehingga tidak memotong gen sisipan. Oleh karena itu, 2 (dua) klon tersebut akan dipakai dalam proses selanjutnya, yaitu sekuensing.



Gambar 4.4.(2) Hasil restriksi dengan *EcoRI*

[sumber: dokumentasi pribadi]



Gambar 4.4.(3) Simulasi restriksi di *snappgene*

[sumber: dokumentasi pribadi]

Plasmid hasil ekstraksi dapat memiliki 3 (tiga) konformasi (isomer) berbeda, yaitu *nicked (open circular)*, *linear* dan *super coiled* (Dale & von Schantz 2007: 38—39). Oleh karena itu, plasmid rekombinan tidak dapat ditentukan ukurannya sebelum dilakukan digesti menjadi konformasi *linear* (Carson & Robertson 2004: 24). Konformasi *nicked* terjadi karena salah satu untai DNA terpotong akibat proses enzimatik dan mekanis yang terjadi saat proses transformasi. Konformasi tersebut memiliki waktu migrasi paling lambat sehingga berada pada bagian atas gel. Plasmid yang telah diekstraksi juga dipurifikasi menggunakan PEG, yang dapat melarutkan protein dan RNA tetapi mengendapkan DNA plasmid. Penambahan larutan tersebut dapat mengurangi kontaminan protein ataupun larutan yang digunakan ketika ekstraksi (Pulleybank 1983: 194—195).

4.5 Sekuensing dan Analisis Sekuens DNA

Hasil sekuensing yang didapat berupa elektroferogram dan bentuk fasta. Hasil tersebut dapat dilihat pada Lampiran 7 (tujuh). Elektroferogram hasil sekuensing menunjukkan puncak-puncak sinyal tidak ambigu dan tidak bertumpuk, sehingga dapat dikatakan bahwa hasil sekuensing yang dilakukan baik. Konfirmasi identitas sekuens DNA dilakukan melalui sekuensing fragmen gen *lysophospholipase* dan dianalisis hasil sekuensingnya melalui penjajarannya terhadap sekuens gen yang terdapat di *GenBank*. Hasil sekuensing direpresentasikan menggunakan perangkat lunak *BioEdit*.

Sekuensing dilakukan dua arah menghasilkan 1429 pasang basa menggunakan primer *forward* dan 1633 pasang basa menggunakan primer *reverse*. Hasil dari klon 1 dan 3 menunjukkan hasil yang sama. Sekuens tersebut kemudian dilakukan penyejajaran atau *alignment*. Sekuens yang telah sejajar terdapat pada Gambar 4.5.(1).

```

ATGTGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGTTCGTCGTC
ATTCATGGGGCGGGAGAACACCATGGGCGTTATCAATGGCTCGCAA
AAAAGTTTAATAGCATCGGATTATCTGTAGTGATGGGTGATTTGCC
GGCCAGGGAAGGACAAGAGGGAAGCGCGGTCACATTCAGTCGTTCC
AACAGTACATTGATGTTGCTTGGAATGGGTGGAAGCAGCTAAGTT
GGAGCACGTGCCAATCTTCTTGTGGCCACAGCATGGGCGGACTTG
TAGCCGTTTCGCACGATGATTGAAGGAGGCACATTGCCAGTGCGTGC
TGTCATTCATCACCATGCTTTGATTTATATCAGTCACCTGGGAA
AGGAAAAGAATTGGCTTCGAAAATGTTGCACCGAGTAACGCCTACT
TTCTCGCATCATTAGGCATTCGTTCCGATTTAGTTACTCGAAATGA
AGAGATTCGTGAAGCCTACTTGAAGGATGAGCTTAGAGTAACAAAA
GTGTCCACGAAATGGTATTATGAGTTATCGAAGGCGATGCGAGATA
CCCGTCGTTATCCTGAAAAGTTCCCGAACGTACCATTGCTTGTTATG
CAGGCGGGAGAAGATTATACGGATAGAAAAGCGGCGTGGGAA
TGGTTAAATTCGGTTC AAGTAACGGAAAAGGCCTATAAAGAGTGGA
ATGGACTCTATCATGAAATTTTAATGAGCCTGAGCGGGAGGCTGT
GTTCAATACACCTGTTTTTTATCGAACAGCAATTATCATAG

```

Keterangan:
 : primer yang digunakan

Gambar 4.5. (1) Sekuens plasmid rekombinan klon 1 dan 3

[sumber: dokumentasi pribadi]

Hasil penyejajaran sekuensi menunjukkan terdapat 782 pasang basa yang sejajar, dan terdapat 1 (satu) perbedaan dengan gen *lysophospholipase Bacillus halodurans* C-125. Perbedaan tersebut disebabkan karena primer didesain secara sengaja memiliki 1 (satu) basa yang berbeda. Namun, hal tersebut tidak terlalu berpengaruh karena perbedaan basa A dan G tetap menyandi kodon yang sama, yaitu kodon stop. Hasil *alignment* dengan gen penyandi *lysophospholipase Bacillus halodurans* C-125 terdapat pada Lampiran 6 (enam). Sekuens yang telah sejajar tersebut kemudian dianalisis melalui BLAST, yang terdapat pada NCBI dan www.genome.jp. Hasil tersebut dapat dilihat pada Lampiran 8 (delapan) dan 9 (sembilan). Berdasarkan hasil BLAST NCBI, sekuens tersebut merupakan genom *Bacillus halodurans* C-125 yang menyandi *lysophospholipase* dengan ukuran 783 pb dan tingkat kemiripan 100%. Berdasarkan analisis BLAST pada www.genome.jp, gen tersebut merupakan gen *lysophospholipase* dengan kode BH3288 yang berada pada *Bacillus halodurans* C-125 dengan ukuran 783 pasang basa. Tingkat kemiripan sekuens tersebut dengan gen *lysophospholipase* tersebut juga 100%.

Hasil sekuensing mengindikasikan bahwa penelitian gen *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 telah berhasil diklonasi. Klonasi rekombinan merupakan koloni bakteri *Escherichia coli* DH5 α yang membawa vektor pGEM-T *easy* dengan sisipan fragmen gen *lysophospholipase*. Sekuens yang telah diperoleh ditranslasikan ke dalam protein menggunakan program pada [website http://web.expasy.org/translate/](http://web.expasy.org/translate/). Hasil translasi ke protein dapat dilihat pada Gambar 4.5. (2).

```

Met WKWEVAEPRGVVVVIHGAGEHHGRYQWLAKKFNSIGLS
VVMMet GDLPGQGRTRGKRGHISFQQYIDVVLEWVEAAKLEH
VPIFLFGHSMet GGLVAVRTMet IEGGTLPVRAVILSSPCFDLY
QSPGKGKELASKMet LHRVTPTFSSHSGIRSDLVTRNEEIREAY
LKDELRVTKVSTKWYYELSKAMet RDTRRYPEKFPNVPLL
VMet QAGEDYITDRKAAWEWFNSVQVTEKAYKEWNGLYHEI
FNEPEREAVFQYTCFFIEQQLS Stop

```

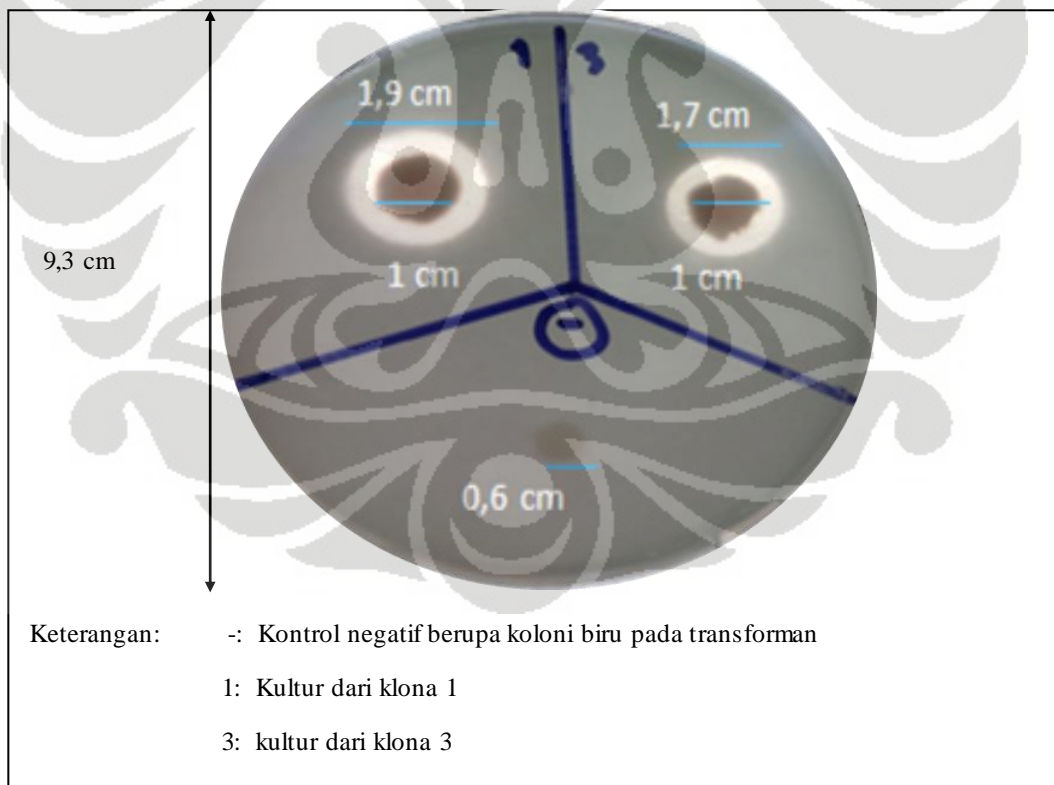
Gambar 4.5. (2) Translasi protein dari sekuens plasmid rekombinan

[sumber: dokumentasi pribadi]

Berdasarkan diagram tersebut, sekuens plasmid rekombinan dapat ditranslasikan ke dalam protein. Hal tersebut menunjukkan bahwa plasmid rekombinan dapat ditranslasikan menjadi protein yang fungsional karena terdapat kodon *start* dan *stop*. Oleh karena itu, klon 1 dan 3 dilakukan uji selanjutnya untuk melihat aktivitas enzim *lysophospholipase*.

4.6 Uji Kualitatif Produk Gen pada Substrat Lipase

Transforman yang telah dikonfirmasi dengan menggunakan enzim restriksi dan sekuensing, yaitu klon 1 (satu) dan 3 (tiga) akan diuji aktivitas lipasenya menggunakan deteksi zona bening pada substrat lipase. Hasil dari uji zona bening menggunakan teknik *drop* atau meneteskan kultur pada media mengandung tributyrin, ampisilin dan IPTG dapat dilihat pada Gambar 4.6. Hasil menunjukkan terdapat zona bening pada klon 1 dan 3, tetapi tidak terdapat zona bening pada kontrol negatif.



Gambar 4.6. Hasil *drop* transforman pada medium LB+TBA

[sumber: dokumentasi pribadi]

Inokulasi koloni transforman pada media LB *tributylin*, ampisilin dan IPTG bertujuan mengetahui adanya aktivitas lipase yang ditandai dengan zona bening. Penambahan IPTG dilakukan untuk menginduksi T7 promotor pada vektor sehingga gen dapat ditranslasikan, karena gen yang diamplifikasi belum memiliki promotor. Koloni transforman yang tumbuh pada media tersebut menunjukkan adanya zona bening (Gambar 4.6) setelah inkubasi 3 hari. Menurut Litthauer dkk. (2010: 4282—4283), zona bening yang terdapat terbentuk menandakan terjadinya proses hidrolisis terhadap substrat lipase yang dihasilkan oleh klon rekombinan tersebut. *Tributylin* merupakan salah satu substrat lipase yang dapat digunakan untuk mengukur aktivitas lipolitik, bahkan dapat digunakan juga untuk mengukur aktivitas *phospholipase* dan *lysophospholipase*. Namun, aktivitas lipolitik *lysophospholipase* akan lebih optimal bila berada pada substrat spesifik, seperti medium agar yang mengandung *lysolecithin* atau kuning telur (Merino, dkk. 1999: 4008—4010). Selain itu, gen penyandi *lysophospholipase* yang ditransformasikan ke *Escherichia coli* mengekspresikan enzim pada intraselular sel inang, sehingga perlu dikeluarkan enzim dengan cara sonikasi, homogenisasi, dan pelisisan menggunakan *lysozyme* (EMBL 2017: 1). Penyebab rendahnya aktivitas juga karena pGEM-T *easy* merupakan vektor kloning, bukan vektor ekspresi dan *Escherichia coli* DH5 α juga bukan merupakan vektor ekspresi. Hal ini sama seperti yang pernah dilakukan oleh Noer (2011) dan Safrah (2016).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Gen *lysophospholipase* dari *Bacillus halodurans* CM1 dengan ukuran 783 pasang basa berhasil diklona ke dalam *Escherichia coli* DH5 α .

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengujian dan ekspresi enzim *lysophospholipase* menggunakan medium spesifik. Perlunya dilakukan subklona gen *lysophospholipase* ke dalam vektor ekspresi agar gen *lysophospholipase* dapat diekspresikan dengan lebih tinggi. Vektor ekspresi yang dapat digunakan, seperti pSKE, dan pET. Perlu juga dilakukan subklona pada sel inang yang menghasilkan ekspresi enzim secara ekstraselular dan lebih tinggi.

DAFTAR ACUAN

- Abd-Elsalam, K. A. 2003. Bioinformatics tools and guideline to PCR primer design. *African Journal of Biotechnology* **2**(5): 91—95.
- Ahmad, I., T. Rubbab, F. Deeba, & S. M. S. Naqvi. 2014. Optimization of *E. coli* culture conditions for efficient DNA uptake by electroporation. *Turkish Journal Biology* **38**: 568—573.
- Ahluwalia, K.B. 2009. *Genetics*. 2nd ed. New Age International, New Delhi: xvi + 451 hlm.
- Aisyah, A. 2017. Optimasi produksi dan karakterisasi lipase *Bacillus halodurans* CM1. *Tesis*. Universitas Indonesia, Depok: xix+81 hlm.
- Ausubel, F.M, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 2003. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Incorporation: xiii + 4385 hlm.
- Birnboim, H. C., & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513—1523.
- Borrelli, G. M., & D. Trono. 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Jurnal Molecular Science* **16**: 20774—20840.
- Brown, T. A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 6th edition*. Blackwell Publishing, Malaysia : xv+312 hlm.
- Campbell, N.A., J.B. Reece L.A Urry, M.L. Chain, S.A. wasserman, P.V Minnorsky & R.B Jackson. 2008. *Biology*. 8th ed. Perarson Education Inc.
- Cantrell, S. A. 2003. Vectors for the expression of recombinant proteins in *E. coli*. *Dalam*: Casali, N. & A. Preston (eds.) 2003. *Methods in Molecular Biology: E. coli Plasmid Vectors*, Vol. 235. Humana Press Inc. New Jersey: 257—275.
- Carson, S., & D. Robertson. 2004. *Manipulation and expression of recombinant DNA: A laboratory manual*. 2nd ed. Elsevier Academic Press, London: xvi+ 151 hlm.

- Casali, N. 2003. *Escherichia coli* host strains. *Dalam: Casali, N. & A. Preston* (eds.) 2003. *Methods in Molecular Biology: E. coli Plasmid Vectors*, Vol. 235. Humana Press Inc. New Jersey: 27—48.
- Cesarini, S. F. I. J. Pastor, P. M. Nielsen, & P. Diaz. 2015. Moving towards a competitive fully enzymatic biodiesel process. *Sustainability* **7**: 7884—7903.
- Coe, J. G. S., C. F. Wilson, T. C. Sorrel, N. G. Latouche, & L. C. Wright. 2003. Cloning of CnLYSO1, a novel extracellular lysophospholipase of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Gene* **316**: 67—78.
- Dale, J.W & S.F. Park. 2004. *Molecular genetics of bacteria*. 4th ed. John Wiley & Sons, England: xiv + 337 hlm.
- Dale, J. W., & M. Von Schantz. 2007. *From gene to genomes: Concepts and applications of DNA technology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester: xii+360 hlm.
- Dellis, S. 2004. Understanding plasmid DNA. 5 hlm.
<http://www.cofc.edu/~dellis/virtuallabbook/PreLabReadings/Ex.6.html>
- Fairbanks, D.J. & W.R. Andersen. 1999. *Genetic: continuity of life*. Brook/Cole Publishing, New York: xii + 820 hlm
- Geneaid. 2012. Gel/PCR DNA Extraction Fragmen Kit Protocol. Geneaid. 3 hlm
- Griffith, M. 2001. Genetic modification of the *Escherichia coli* strain DH5 α to allow the selection of plasmid carrying complementary yeast genes. 54 hlm. <http://ion.uwinnipeg.ca/~moodie/Theses/MalachiGriffith2001.pdf> di akses pada 28 Februari 2017 pk. 23.17 WIB
- Grunenwald, H. 2003. Optimization of polymerase chain reaction. *Dalam: Bartlett, J. M. S., & D. Stirling* (eds.). 2003. *PCR Protocol*. 2nd ed. Humana Press, Inc., New Jersey: 89—99.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166** (4): 557—580.
- Handoyo, D., & A. Rudiretna. General principles and implementation of polymerase chain reaction. 2001. Genetic transformation of yeast. *BioTechniques* **30**: 816—831.

- Hansen, L.H., S. Knudsen, & S. J. Sorensen. 1998. The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*, **36** (6): 341—347.
- Hartl, D.L & W.J, Elizabeth. 1998. *Genetics principles and analysis*. 4th ed. Jones and Bartlett Publisher, Massachusett: xxiv + 840 hlm.
- Helianti, I. 2010. Materi Workshop biologi molekuler kloning dan transformasi pada *Bacillus*, materi disebarkan pada *Workshop: Teknik-teknik dasar biologi molekular (kloning gen) di Laptiab, BPPT, Tangerang* pada 4—6 Agustus 2010.
- Henegariu, O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vance, & P. H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-step Protocol. *BioTechniques* **23**: 504—511.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63** (4): 735—750.
- Horikoshi, K. 2008. Alkaliphiles. *Dalam: Encyclopedia of life Science*. John Wiley and Sons Ltd. Chichester: 1—9.
- Inoue H., H. Nojima, & H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23—28.
- Jemli, S., D. Ayadi-Zouari, H. B. Hlima, & S. Bejar. 2016. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology* **36**(2): 246—258.
- KAPA Biosystems. 2017. KAPA Taq HotStart PCR Kit Protocol. KAPA BIO. Boston, Massachusetts, USA: 2 hlm.
- Kolmodin, L. A. & D. E. Birch. 2002. Polymerase chain reaction: basic principles and routine practice. *Dalam: Chen, B. Y. & H. W. Janes (eds). 2002. PCR cloning protocol*. 2nd ed. Humana Press, Inc. New Jersey: 3—18.
- Litthauer, D., N. S. Abbai, L. A. Piater, & E. van Heerden. 2010. Pitfalls using tributyrin agar screening to detect lipolytic activity in metagenomic studies. *African Journal of Biotechnology* **9**(27): 4282—4285.

- Lu, W. 2003. Rapid screening of recombinant plasmids. *Dalam: Casali, N. & A. Preston (eds.) 2003. Methods in Molecular Biology: E. coli Plasmid Vectors*, Vol. 235. Humana Press Inc. New Jersey: 169—174.
- Merino, S., A. Aguilar, M. M. Nogueras, M. Regue, S. Swift, & J. M. Tomás. 1999. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic aeromonas sp. serogroup O:34. *Infection And Immunity* **67** (8): 4008–4013.
- Murray, R.K., D. K. Granner, P. A. Mayes, & V. W. Rodwell. 2003. Biokimia Harper (Andry Hartono, Penerjemah). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nicholl, D. S. T. 2002. *An Introduction to Genetic Engineering* 2nd edition. Cambridge University Press, United Kingdom: xi+287 hlm
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (=NC-IUBMB). 2017. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> diakses pada 27 Februari 2017 pk 18.54 WIB
- Noer, S. 2011. Kloning gen xilanase alkalotermofilik pada *Escherichia coli* DH5 α dan karakterisasi produk gennya. *Tesis*. Universitas Indonesia, Depok: xiii+105 hlm.
- Passarge, E. 2007. *Color atlas of genetics*. 3rd ed. Georg Thieme Verlag. USA, New York: x + 469 hlm.
- Peacock, K. W. 2010. Biotechnology and genetic engineering. Maple Press, USA: xv+333 hlm.
- Pierce, B. A. 2005. *Genetic A Conceptual Approach*. 2nd ed. W.H. Freeman, Texas: 736 hlm.
- Primrose, S. B., R. M. Twyman & R. W. Old. 2001. *Principles of Gene Manipulation, 6th Edition*. Blackwell Science Ltd, USA: vii+377 hlm
- Promega. 2015. Protokol Promega. *Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems: Instruction for Use of Products A1360, A1380,*

A3600, AND A3610. USA. 29 hlm. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>

- Pulleyblank, D., Michalak, M., Laurent Daisley, S. & R. Glick. 1983. A method for the purification of *E. coli* plasmid DNA by homogeneous lysis and polyethylene glycol precipitation. *Molecular Biology Report* **9**: 191—195.
- Roberts, R.J. 2005. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *The journal of nucleic acid research* **102**(17): 5905—5908.
- Robinson, R. 2003. *Genetics Vol. 3*. Macmillan Reference USA, New York: xx + 250 hlm
- Safirah, D. 2016. Kloning dan Sekuensing Gen Xilanase dengan Produk Gen Berukuran 30 kDa dari *Bacillus halodurans* CM1 pada *Escherichia coli* DH5 α . *Skripsi*. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro: ix+69 hlm.
- Saito, H., & K. Miura. 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* **72**: 619—629.
- Sambrook, J., & D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sharma, R., Y. Chisti, & U.C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **19**: 627—662.
- Takami, H. & K. Horikoshi. 1999. Reidentification of facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **63** (5): 943—945.
- Takami, H., K. Nakasone, Y. Takaki, G. Maeno, R. Sasaki, N. Masui, F. Fuji, C. Hiram, Y. Nakamura, N. Ogasawara, S. Kuhara, & K. Horikoshi. 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* **28** (21): 4317—4331.
- The Biotechnology Education Company® (=EDVOTEK). 2005. Transformation of *E. coli* with pGAL™ (blue colony). 31 hlm

<https://www.thevespiary.org/rhodium/Rhodium/Vespiary/talk/files/3464-221e230.pdf?topic=990.0> diakses pada 5 Juli 2017 pk. 12.13 WIB

- Tu, Z., G. He, K. X. Li, M. J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao, D. P. Liu, H. Ye, J. Shi, & X. Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electric Journal of Biotechnology* **1** (8): 114—120.
- Ulfah, M., I. Helianti, B. Wahyuntari, & N. Nurhayati. 2011. Characterization of a new thermoalkalophilic xylanase-producing bacterial strain isolated from Cimanggu Hot Spring, West Java, Indonesia. *Microbiology Indonesia* **5** (3): 139—143.
- Wanli Bi, & P. J. Stambrook. 1998. Detection of known mutation by proof-reading PCR. *Nucleic Acids Research* **26**(12): 3073—3075.
- Zahn, R. C., I. Schelp, O. Utermöhlen, & D. von Laer. 2007. A-to-G hypermutation in the genomic Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Journal of Virology* **81** (2): 457—464.
- Zhu, S. 2007. Cloning and characterization of two lipases and a lysophospholipase from *Aspergillus niger*. *Thesis*. Concordia University (Canada), ProQuest Dissertations Publishing: x+119 hlm.

Lampiran 1

Perbandingan Karakteristik *Bacillus halodurans* CM1 dengan *Bacillus halodurans* C-125

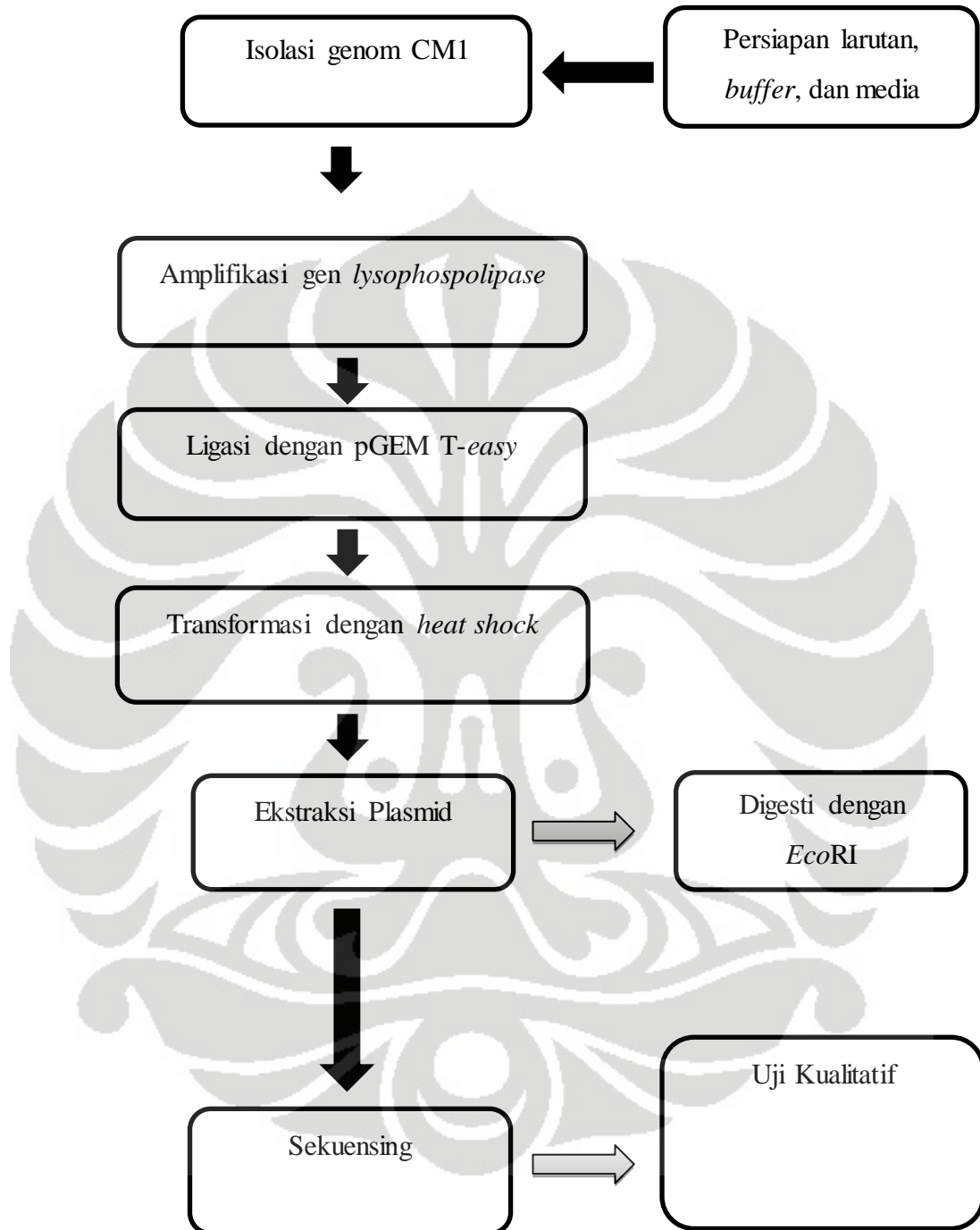
Characteristics	Strain CM1	Strain C-125
Cell shape	Rod	Rod*
Cell size	2,7-5,5	0,6-0,7 × 2,5-4 µm*
Colony color	White to brownish	Cream-white**
Endospores	+	+**
Gram staining	+	+*
Growth in anaerobic agar	+	+*
Voges-Proskauer	-	-*
Growth at 40°C	+	+*
Growth at 50°C	+	+*
Growth at 55°C	+	+*
Growth at pH 5	-	-*
Growth at pH 7	+	+*
Growth at pH 11	+	+**
Growth in NaCl 5%	+	+*
Growth in NaCl 7%	+	+*
Growth in NaCl 8%	-	+*
Growth in NaCl 10%	-	+*
Hydrolysis of Xylan	+	+**
Hydrolysis of Skim milk	+	N.D
Hydrolysis of Casein	+	+**
Hydrolysis of Starch	+	+**
Hydrolysis of Gelatin	+	+**
Hydrolysis of CMC	-	N.D
Hydrolysis of L-Arabinose	+	+*
Hydrolysis of Ribose	+	+**
Hydrolysis of D-Xylose	+	+*
Hydrolysis of Fructose	+	+*
Hydrolysis of Galactose	+	+**
Hydrolysis of Mannose	+	+**
Hydrolysis of Melibiose	+	+**
Hydrolysis of Lactose	+	+**
Hydrolysis of Sucrose	+	+**
Hydrolysis of Trehalose	+	+**
Hydrolysis of Rafinos	+	+**
Hydrolysis of Sorbitol	+	-**

ND: Not described; *Takami and Horikoshi 1999; **Aono 1995

[sumber: Ulfah dkk. 2011: 142]

Lampiran 2

Skema Alur Kerja Penelitian



Lampiran 3

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ <i>buffer</i> / media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk $V_t = 100$ ml)	Daftar acuan
1	Luria-Bertani (LB) Agar	Media kultur pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> DH5 α	0,5% <i>Yeast extract</i> 1% Trypton 1% NaCl 1% Agar teknis ddH ₂ O	Sebanyak 0,5 g <i>yeast extract</i> , 1 g tripton, 1 g NaCl, dan 1 g agar ditimbang lalu dilarutkan di dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan dihomogenkan, lalu disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Promega 2015: 24)
2	Luria-Bertani		0,5% <i>Yeast extract</i> 1% Trypton 1% NaCl ddH ₂ O	Sebanyak 0,5 g <i>yeast extract</i> , 1 g tripton, dan 1 g NaCl ditimbang lalu dilarutkan di dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan dihomogenkan, lalu disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Promega 2015: 24)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ <i>buffer</i> / media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk $V_t = 100$ ml)	Daftar acuan
3	Horikoshi + xilan (agar)	Media kultur pertumbuhan <i>Bacillus halodurans</i> CM1	1% Pepton 0,5% <i>Yeast extract</i> 0,1% KH_2PO_4 1% Na_2CO_3 2% Xilan 1,5% Agar teknis ddH ₂ O	Sebanyak 0,5 g <i>yeast extract</i> ; 1 g pepton; 0,1 g KH_2PO_4 ; 1 g Na_2CO_3 ; 2 g xilan ditimbang lalu dilarutkan di dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan dihomogenkan menggunakan <i>magnetic stirrer</i> , lalu ditambahkan agar dan dihomogenkan kembali, juga diatur pH sampai dengan 9. Larutan disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Horikoshi 2008: 2)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ buffer /media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk Vt = 100 ml)	Daftar acuan
4	Horikoshi	Media kultur pertumbuhan <i>Bacillus halodurans</i> CM1	1% Pepton 0,5% <i>Yeast extract</i> 0,1% KH ₂ PO ₄ 1% Na ₂ CO ₃ ddH ₂ O	Sebanyak 0,5 g <i>yeast extract</i> ; 1 g pepton; 0,1 g KH ₂ PO ₄ , 1 g Na ₂ CO ₃ 1% ditimbang lalu dilarutkan di dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan dihomogenkan menggunakan <i>magnetic stirrer</i> , lalu diatur pH hingga mencapai 9. Larutan tersebut disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Horikoshi 2008: 2)
5	Tributylin Agar (TBA)	Media uji kualitatif <i>lysophospholipase</i>	0,5% <i>Yeast extract</i> 1% Tripton 1% NaCl 2% Tributyrin 1,5 % Agar teknis; ddH ₂ O	Sebanyak 0,5 g <i>yeast extract</i> , 1 g tripton, 1 g NaCl, 2 ml tributyrin dan 1 g agar teknis ditimbang lalu dilarutkan di dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan dihomogenisasi menggunakan homogenizer. Larutan yang telah homogen, disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Helianti 2010)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ buffer/ media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk Vt = 100 ml)	Daftar acuan
6	Super Optimal Broth (SOB)	Media pertumbuhan untuk preparasi sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH5 α	0,5% <i>Yeast extract</i> 2% Trypton 0,0585% NaCl 0,0186% KCl ddH ₂ O 2 M ²⁺ Mg	Sebanyak 0,5 g <i>Yeast extract</i> ; tripton 2 g; NaCl 0,0585 g; KCl 0,0186 g; ddH ₂ O dilarutkan dalam 100 mL ddH ₂ O, disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Media tersebut ditambahkan 1 mL larutan magnesium 2 M steril. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Helianti 2010)
7	Super Optima Broth with Catabolite Repression (SOC)	Media pertumbuhan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH5 α	0,5% <i>Yeast extract</i> 2% Trypton 0,0585% NaCl 0,0186% KCl ddH ₂ O; 2 M Mg ²⁺ 2 M glukosa	Sebanyak 0,5 g <i>yeast extract</i> ; tripton 2 g; NaCl 0,0585 g; KCl 0,0186 g; ddH ₂ O dilarutkan dalam 100 mL ddH ₂ O, disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Media tersebut ditambahkan 1 mL larutan Mg ²⁺ 2 M steril dan 1 mL glukosa 2 M steril. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Promega 2015: 25)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ buffer/ media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk Vt = 100 ml)	Daftar acuan
8	2 M Mg ²⁺	Larutan <i>stock</i> untuk pembuatan media SOB dan SOC	1 M MgCl ₂ 1M MgSO ₄	Sebanyak 50 mL larutan 1 M MgCl ₂ ditambahkan dengan 1M MgSO ₄ 50 mL, lalu disterilisasi menggunakan <i>filter</i> di dalam <i>Laminar Air Flow</i> (LAF). Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Promega 2015: 25)
9	2 M glukosa	Larutan <i>stock</i> untuk pembuatan media SOC	36% Glukosa	Glukosa sebanyak 36 g ditimbang, lalu dilarutkan dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan disterilisasi menggunakan <i>filter</i> di dalam <i>Laminar Air Flow</i> (LAF). Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Helianti 2010)
10	Larutan <i>Lysozyme</i> 10 mg/mL	Ekstraksi genom <i>Bacillus halodurans</i> CM1	10 mg <i>lysozyme</i> 1 mL Tris 0,25 M HCl pH 8	Pembuatan <i>lysozyme</i> dilakukan dengan mencampurkan 10 mg <i>lysozyme</i> dengan 1 mL Tris HCl 0,25 M pH 8	(Helianti 2010)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ <i>buffer</i> / media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk $V_t = 100$ ml)	Daftar acuan
11	CH ₃ COO Na	Larutan stock untuk ekstraksi genom <i>Bacillus halodurans</i> CM1	CH ₃ COONa ddH ₂ O	Sebanyak 24,609 g CH ₃ COONa ditimbang, lalu dilarutkan ke dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu ruang atau ± 30°C..	(Helianti 2010)
12	Larutan STEP (SDS, Tris-HCl, EDTA, Proteinase K)	Larutan untuk ekstraksi genom <i>Bacillus halodurans</i> CM1	20% SDS 1 M Tris-HCl pH 8.0 0,5 M EDTA pH 8.0 20 mg/mL Proteinase K ddH ₂ O	Pembuatan larutan STEP dilakukan dengan mencampurkan 0,25 mL 20% SDS; 15 mL 1 M Tris-HCl pH 8.0; 80 mL 0,5 M EDTA pH 8.0 dan 1,25 mL 20 mg/mL Proteinase K, lalu ditambahkan ddH ₂ O sampai 100 mL. Larutan disterilisasi dengan filter dan disimpan pada suhu -20°C	(Helianti 2010)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ <i>buffer</i> / media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk $V_t = 100$ ml)	Daftar acuan
13	<i>Solution I</i>	Larutan untuk ekstraksi plasmid <i>Escherichia coli</i> DH5 α	EDTA 10mM Tris-HCl pH 8 25 mM glukosa 50mM ddH ₂ O	Sebanyak 2 mL Etilendiamintetraasetat (EDTA) 10mM; 2,5 mL Tris-HCl pH 8 25 mM; ditambahkan akuades sampai 48,75 mL lalu disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Larutan yang telah steril ditambahkan 1,25 mL glukosa 50 mM yang telah disterilkan menggunakan <i>filter</i> .	(Helianti 2010)
14	<i>Solution II</i>		NaOH 0,2 M SDS 1% ddH ₂ O steril	Sebanyak 150 μ L NaOH 0,2 M yang telah steril dicampurkan dengan 150 μ L SDS 1% yang telah steril, lalu ditambahkan dengan ddH ₂ O steril sebanyak 1,2 mL. Pembuatan larutan ini harus selalu baru setiap akan digunakan.	(Helianti 2010)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, *Buffer*, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan/ <i>buffer</i> /media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk $V_t = 100$ ml)	Daftar acuan
15	<i>Solution</i> III	Larutan untuk ekstraksi plasmid <i>Escherichia coli</i> DH5 α	Kalium Asetat 5M Asam asetat glasial ddH ₂ O	Sebanyak 60 mL kalium asetat 5 M dicampurkan dengan 11,5 mL asam asetat glasial, lalu ddH ₂ O sebanyak 28,5 mL ditambahkan. Larutan disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C.	(Helianti 2010)
16	<i>Buffer</i> TAE 50 kali	<i>Buffer</i> untuk <i>running</i> elektroforesis	Tris Base EDTA asam asetat glasial akuades	Sebanyak 121 g <i>Tris Base</i> yang dilarutkan dalam 250 mL akuades dicampurkan dengan 7,32 g EDTA yang dilarutkan dalam 50 mL akuades, kemudian pH diatur dengan penambahan NaOH hingga mencapai pH 8. Campuran tersebut ditambahkan asam asetat glasial sebanyak 28,55 mL lalu ditambahkan dengan akuades hingga mencapai 500 mL. Penyimpanan dilakukan pada suhu ruang atau $\pm 30^\circ\text{C}$, dan apabila akan digunakan diencerkan sebanyak 50 kali.	(Helianti 2010)

Lampiran 3 (Lanjutan)

Komposisi Bahan Kimia dari Larutan, Buffer, dan Media serta Cara Pembuatannya

No	Nama larutan /buffer/ media	Fungsi	Komposisi bahan	Cara pembuatan (untuk $V_t = 100$ ml)	Daftar acuan
17	Ampisilin 100 mg/ml	Antibiotik seleksi pertumbuhan kultur bakteri	<i>Amphichilin sodium salt</i> [Sigma] ddH ₂ O	Sebanyak 100 mg ampisilin ditimbang dan dilarutkan ke dalam 100 mL ddH ₂ O. Larutan disterilisasi menggunakan <i>filter</i> . Penyimpanan dilakukan pada suhu -20°C.	(Promega 2015: 24)
18	Media lipid (LB + 2% <i>tributyryn</i>)	Media kultur produksi enzim lipase rekombinan	0,5% <i>yeast extract</i> 1% Tripton 1% NaCl 2% <i>tributyryn</i> ddH ₂ O	Sebanyak 0,5 g <i>yeast extract</i> , 1 g tripton, dan 1 g NaCl ditimbang lalu dilarutkan di dalam 100 mL ddH ₂ O. <i>Tributyryn</i> sebanyak 2 mL ditambahkan ke dalam larutan tersebut lalu dihomogenisasi menggunakan <i>homogenizer</i> . Larutan yang telah homogen, lalu disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4°C	

Lampiran 4

Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen

No	Nama primer	Sekuens basa
1	<i>phospholip-orf-fwd</i>	5'- ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGC-'3
2	<i>phospholip-orf-rev</i>	5'- CTATGATAATTGCTGTTCGATAAAAAACAGG-'3

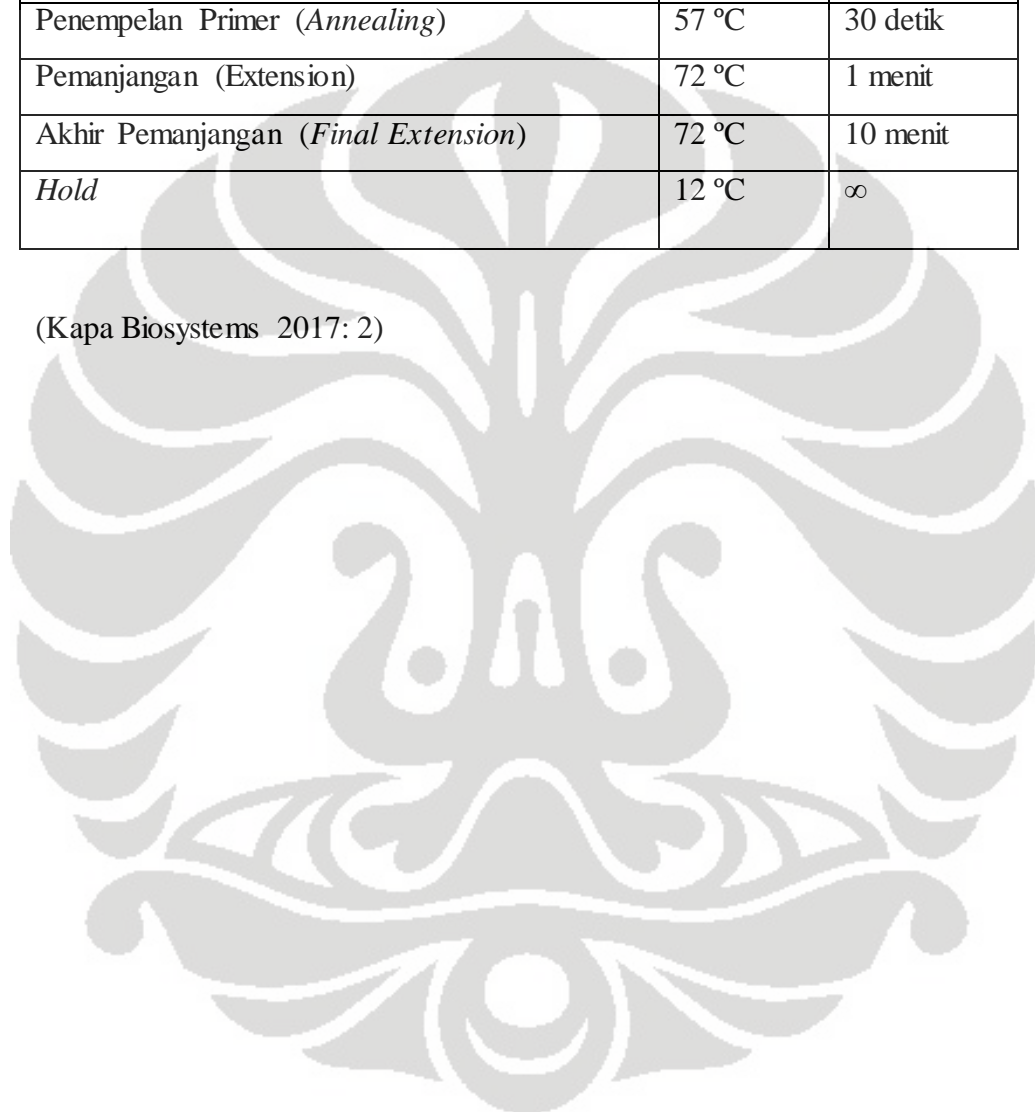


Lampiran 5

Kondisi Reaksi PCR menggunakan KAPA Taq Extra Hot Start DNA Polymerase

Perlakuan	Suhu	Waktu
Denaturasi Awal (<i>Initial Denaturation</i>)	95 °C	3 menit
Denaturasi (Denaturation)	95 °C	30 detik
Penempelan Primer (<i>Annealing</i>)	57 °C	30 detik
Pemanjangan (Extension)	72 °C	1 menit
Akhir Pemanjangan (<i>Final Extension</i>)	72 °C	10 menit
<i>Hold</i>	12 °C	∞

(Kapa Biosystems 2017: 2)



Lampiran 6

Hasil *Multiple Alignment* menggunakan CLUSTAL W

Klona 1

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

reference ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGT CGTCGTCATT CATGGGGCGGGA
reverse ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGT CGTCGTCATT CATGGGGCGGGA
forward ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGT CGTCGTCATT CATGGGGCGGGA
*****

reference GAACACCA TGGGC GTTAT CAATG GCTCG CAAAA AAGTT TAATAGCATC GGAT TATCT GTA
reverse GAACACCA TGGGC GTTAT CAATG GCTCG CAAAA AAGTT TAATAGCATC GGAT TATCT GTA
forward GAACACCA TGGGC GTTAT CAATG GCTCG CAAAA AAGTT TAATAGCATC GGAT TATCT GTA
*****

reference GTGATGGGTGATT TGCCT GGCCAGGGAAGGACAAGAGG GAAGC GCGGT CACATTCAGTCG
reverse GTGATGGGTGATT TGCCT GGCCAGGGAAGGACAAGAGG GAAGC GCGGT CACATTCAGTCG
forward GTGATGGGTGATT TGCCT GGCCAGGGAAGGACAAGAGG GAAGC GCGGT CACATTCAGTCG
*****

reference TTCCAACAGTACA TTGAT GTTGT CTTGGAATGGGTGGAAGCAGCTAAG TTGGAGCACGTG
reverse TTCCAACAGTACA TTGAT GTTGT CTTGGAATGGGTGGAAGCAGCTAAG TTGGAGCACGTG
forward TTCCAACAGTACA TTGAT GTTGT CTTGGAATGGGTGGAAGCAGCTAAG TTGGAGCACGTG
*****

reference CCAATCTTCTTGT TTGGCCACAGCATGGGCGGACTTGT AGCCGTTTCGCACGATGATTGAA
reverse CCAATCTTCTTGT TTGGCCACAGCATGGGCGGACTTGT AGCCGTTTCGCACGATGATTGAA
forward CCAATCTTCTTGT TTGGCCACAGCATGGGCGGACTTGT AGCCGTTTCGCACGATGATTGAA
*****

reference GGAGGCACATTGC CAGTGC GTGTC TGTCATTCTTTCATC ACCATGCTTT GATT TATAT CAG
reverse GGAGGCACATTGC CAGTGC GTGTC TGTCATTCTTTCATC ACCATGCTTT GATT TATAT CAG
forward GGAGGCACATTGC CAGTGC GTGTC TGTCATTCTTTCATC ACCATGCTTT GATT TATAT CAG
*****

reference TCACCTGGGAAAGGAAAA GAATTGGCTT CGAAAATGTT GCACCAGTAACGCCTACT TTC
reverse TCACCTGGGAAAGGAAAA GAATTGGCTT CGAAAATGTT GCACCAGTAACGCCTACT TTC
forward TCACCTGGGAAAGGAAAA GAATTGGCTT CGAAAATGTT GCACCAGTAACGCCTACT TTC
*****

reference TCGCATCA TTCAGGCATT CGTTC CGATT TAGTT ACTCGAAATGAAGAGATTC GTGAAGCC
reverse TCGCATCA TTCAGGCATT CGTTC CGATT TAGTT ACTCGAAATGAAGAGATTC GTGAAGCC
forward TCGCATCA TTCAGGCATT CGTTC CGATT TAGTT ACTCGAAATGAAGAGATTC GTGAAGCC
*****

reference TACTTGAAAGGATGAGCTTAGAGT AACAAAGTG TCCAC GAAATGGTAT TATGAGTTA TCG
reverse TACTTGAAAGGATGAGCTTAGAGT AACAAAGTG TCCAC GAAATGGTAT TATGAGTTA TCG
forward TACTTGAAAGGATGAGCTTAGAGT AACAAAGTG TCCAC GAAATGGTAT TATGAGTTA TCG
*****

reference AAGGCGATGCGAGATACC CGTCGTTATC CTGAAAAGTT CCCGAACGTACCAT TGCTTGTT
reverse AAGGCGATGCGAGATACC CGTCGTTATC CTGAAAAGTT CCCGAACGTACCAT TGCTTGTT
forward AAGGCGATGCGAGATACC CGTCGTTATC CTGAAAAGTT CCCGAACGTACCAT TGCTTGTT
*****

reference ATGCAGGCGGGAGAAGAT TATAT CACGGATAGAAAAGC GGCCTGGGAA TGGT TTAAT TCG
reverse ATGCAGGCGGGAGAAGAT TATAT CACGGATAGAAAAGC GGCCTGGGAA TGGT TTAAT TCG
forward ATGCAGGCGGGAGAAGAT TATAT CACGGATAGAAAAGC GGCCTGGGAA TGGT TTAAT TCG
*****

```

Lampiran 6 (Lanjutan)

Hasil *Multiple Alignment* menggunakan CLUSTAL W

```
reference GTTCAAGTAACGGAAAAGCCCTA TAAAGAGTGGAAATGGACTCTATCATGAAA TTTTAAAT
reverse GTTCAAGTAACGGAAAAGCCCTA TAAAGAGTGGAAATGGACTCTATCATGAAA TTTTAAAT
forward GTTCAAGTAACGGAAAAGCCCTA TAAAGAGTGGAAATGGACTCTATCATGAAA TTTTAAAT
*****
```

```
reference GAGCCTGAGCGGGAGGCTGTGTTTCAATACACCTGTTTTTTTATCGAACAGCAATTA TCA
reverse GAGCCTGAGCGGGAGGCTGTGTTTCAATACACCTGTTTTTTTATCGAACAGCAATTA TCA
forward GAGCCTGAGCGGGAGGCTGTGTTTCAATACACCTGTTTTTTTATCGAACAGCAATTA TCA
*****
```

```
reference TAA
reverse TAG
forward TAG
**
```

Terdapat satu perbedaan basa dengan sekuens *Bacillus halodurans* C-125, pada urutan basa ke 783, yaitu Adenin dengan Guanin

Klona 3

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
reference ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGT CGTCGTCATT CATGGGGCGGGA
reverse ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGT CGTCGTCATT CATGGGGCGGGA
forward ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGT CGTCGTCATT CATGGGGCGGGA
*****
```

```
reference GAACACCA TGGGC GTTAT CAATG GCTCG CAAAAAAGTT TAATAGCATC GGAT TATCT GTA
reverse GAACACCA TGGGC GTTAT CAATG GCTCG CAAAAAAGTT TAATAGCATC GGAT TATCT GTA
forward GAACACCA TGGGC GTTAT CAATG GCTCG CAAAAAAGTT TAATAGCATC GGAT TATCT GTA
*****
```

```
reference GTGATGGGTGATT TGCCT GGCCAGGGAAGGACAAGAGGGAAGC GCGGT CACATTCAGTCG
reverse GTGATGGGTGATT TGCCT GGCCAGGGAAGGACAAGAGGGAAGC GCGGT CACATTCAGTCG
forward GTGATGGGTGATT TGCCT GGCCAGGGAAGGACAAGAGGGAAGC GCGGT CACATTCAGTCG
*****
```

```
reference TTCCAACA GTACAT TGAT GTTGT CTTGGAATGGGTGGAAGCAGCTAAGTTGGAGCACGTG
reverse TTCCAACA GTACAT TGAT GTTGT CTTGGAATGGGTGGAAGCAGCTAAGTTGGAGCACGTG
forward TTCCAACA GTACAT TGAT GTTGT CTTGGAATGGGTGGAAGCAGCTAAGTTGGAGCACGTG
*****
```

```
reference CCAATCTT CTTGTTGGCCACAGCATGGGCGGACTTGTAGCCGTTTCGCACGATGATTGAA
reverse CCAATCTT CTTGTTGGCCACAGCATGGGCGGACTTGTAGCCGTTTCGCACGATGATTGAA
forward CCAATCTT CTTGTTGGCCACAGCATGGGCGGACTTGTAGCCGTTTCGCACGATGATTGAA
*****
```

```
reference GGAGGCACATTGCCAGTGCGTGTGTCATTCTTTCATCACCATGCTTTGATT TATAT CAG
reverse GGAGGCACATTGCCAGTGCGTGTGTCATTCTTTCATCACCATGCTTTGATT TATAT CAG
forward GGAGGCACATTGCCAGTGCGTGTGTCATTCTTTCATCACCATGCTTTGATT TATAT CAG
*****
```

```
reference TCACCTGGGAAAGGAAAA GAATTGGCTTCGAAAATGTTGCACCAGTAACGCCTACTTTC
reverse TCACCTGGGAAAGGAAAA GAATTGGCTTCGAAAATGTTGCACCAGTAACGCCTACTTTC
forward TCACCTGGGAAAGGAAAA GAATTGGCTTCGAAAATGTTGCACCAGTAACGCCTACTTTC
*****
```

```
reference TCGCATCA TTCAGGCATT CGTTCGATT TAGTTACTCGAAATGAAGAGATTCGTGAAGCC
```

```
reverse TCGCATCATTCAGGCATT CGTTCCGATT TAGTTACTCGAAATGAAGAGATTCGTGAAGCC
forward TCGCATCATTCAGGCATT CGTTCCGATT TAGTTACTCGAAATGAAGAGATTCGTGAAGCC
*****
```

Lampiran 6 (Lanjutan)

Hasil *Multiple Alignment* menggunakan CLUSTAL W

```
reference TACTTGAAGGATGAGCTTAGAGTAACAAAAGTGTCACGAAATGGTATATGAGTTATCG
reverse TACTTGAAGGATGAGCTTAGAGTAACAAAAGTGTCACGAAATGGTATATGAGTTATCG
forward TACTTGAAGGATGAGCTTAGAGTAACAAAAGTGTCACGAAATGGTATATGAGTTATCG
*****
```

```
reference AAGGCGATGCGAGATACCGTCGTTATCCTGAAAAGTCCCGAACGTACCATTGCTTGTT
reverse AAGGCGATGCGAGATACCGTCGTTATCCTGAAAAGTCCCGAACGTACCATTGCTTGTT
forward AAGGCGATGCGAGATACCGTCGTTATCCTGAAAAGTCCCGAACGTACCATTGCTTGTT
*****
```

```
reference ATGCAGGCGGGAGAAGATATATCACGGATAGAAAAGCGGCGTGGGAA TGGT TTAATTCG
reverse ATGCAGGCGGGAGAAGATATATCACGGATAGAAAAGCGGCGTGGGAA TGGT TTAATTCG
forward ATGCAGGCGGGAGAAGATATATCACGGATAGAAAAGCGGCGTGGGAA TGGT TTAATTCG
*****
```

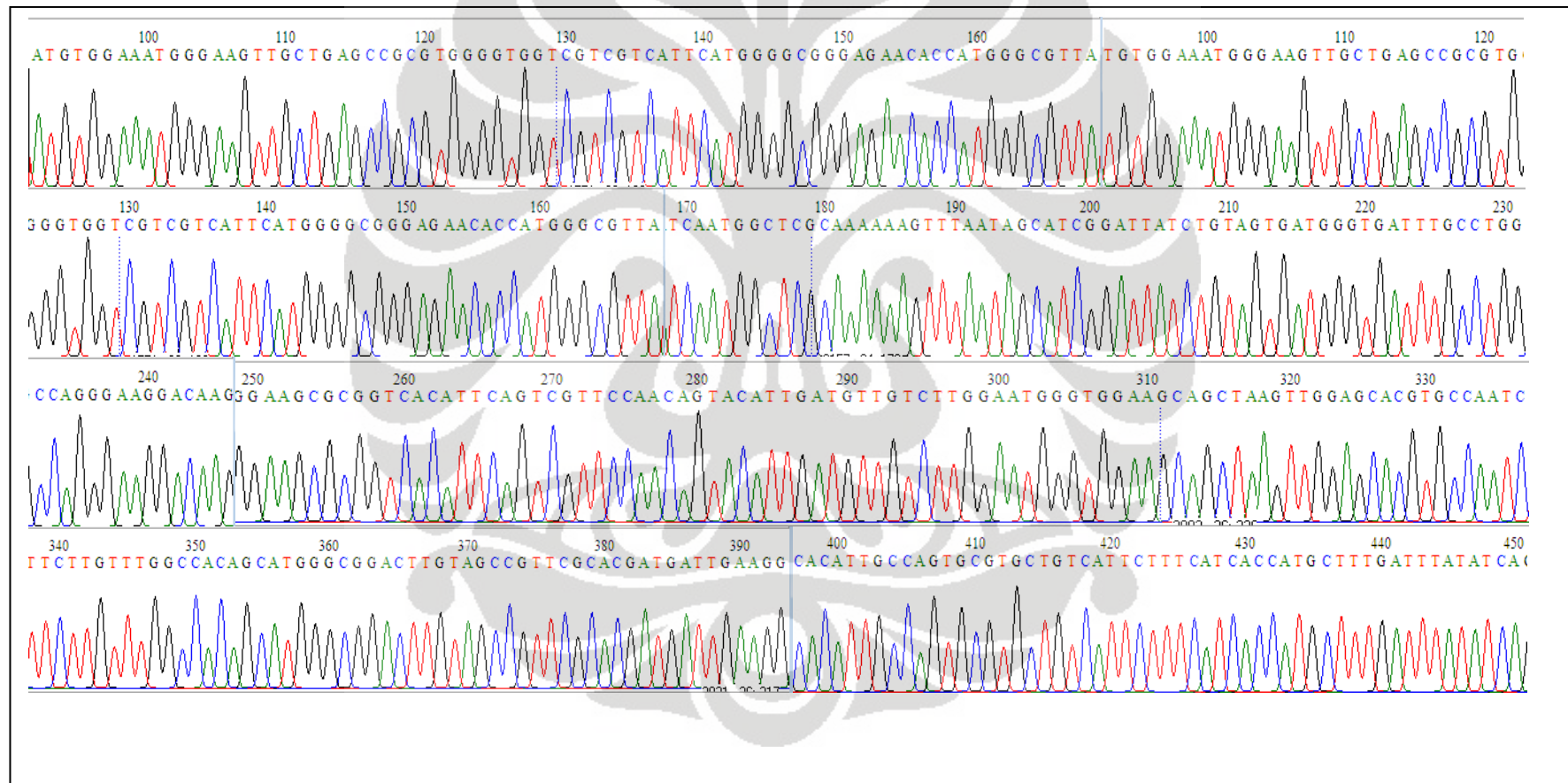
```
reference GTTCAAGTAACGGAAAAGGCCTATAAAGAGTGGAAATGGACTCTATCATGAAATTTTTAAT
reverse GTTCAAGTAACGGAAAAGGCCTATAAAGAGTGGAAATGGACTCTATCATGAAATTTTTAAT
forward GTTCAAGTAACGGAAAAGGCCTATAAAGAGTGGAAATGGACTCTATCATGAAATTTTTAAT
*****
```

```
reference GAGCCTGAGCGGGAGGCTGTGTTTCAATACACCTGTTTTTTTATCGAACAGCAATTA TCA
reverse GAGCCTGAGCGGGAGGCTGTGTTTCAATACACCTGTTTTTTTATCGAACAGCAATTA TCA
forward GAGCCTGAGCGGGAGGCTGTGTTTCAATACACCTGTTTTTTTATCGAACAGCAATTA TCA
*****
```

```
reference TAA
reverse TAG
forward TAG
**.
```

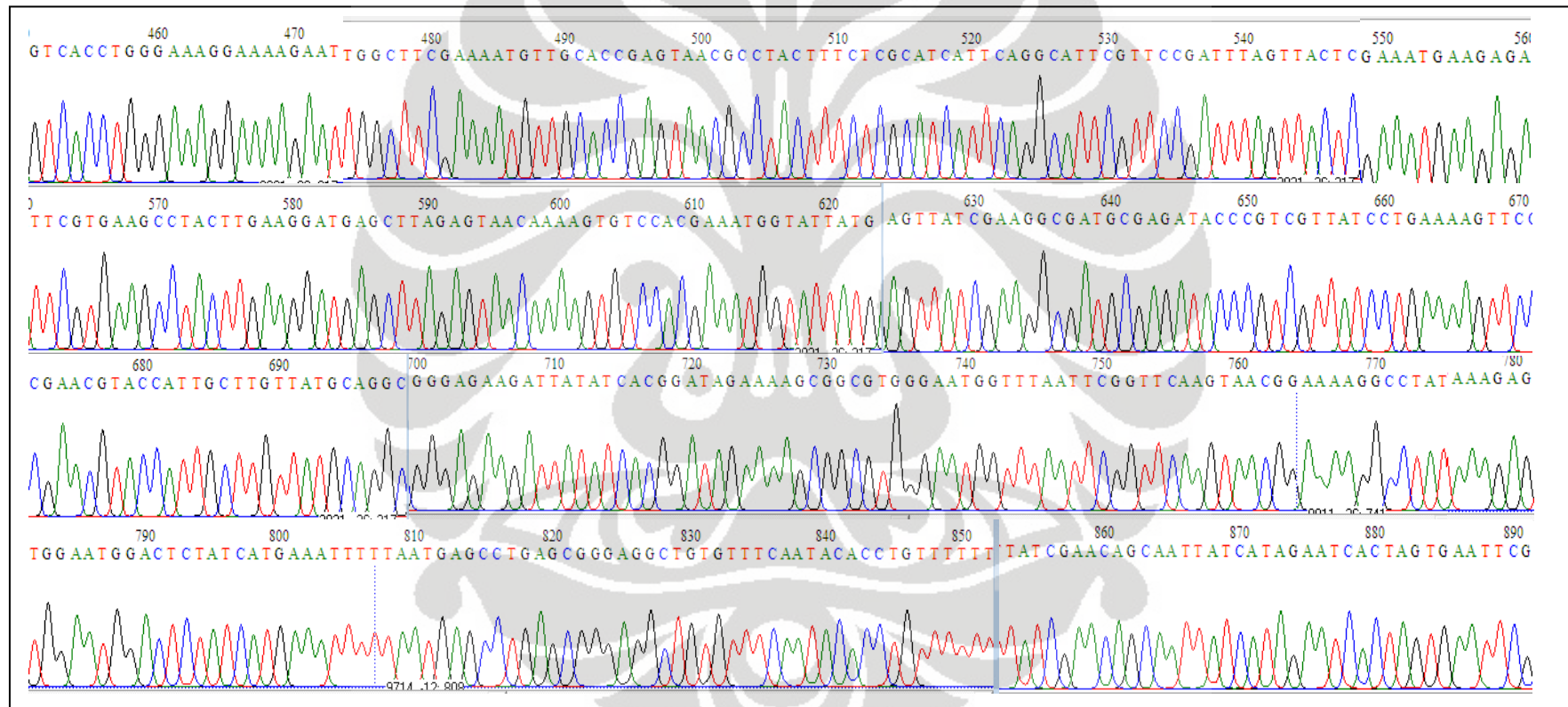
Terdapat satu perbedaan basa dengan sekuens *Bacillus halodurans* C-125, pada urutan basa ke 783, yaitu Adenin dengan Guanin.

Lampiran 7
Elektroferogram Sekuensing



Universitas Indonesia

Lampiran 7 (Lanjutan)
Elektroferogram Sekuensing



Universitas Indonesia

Lampiran 8

Hasil BLAST Query

1. Hasil Blast pada NCBI

Job title: Nucleotide Sequence (783 letters)

RID [K9M9A5DA01R](#) (Expires on 06-06 11:34 am)

Query ID [k|Query_78445](#) Database Name [nr](#)
 Description [None](#) Description [Nucleotide collection \(nr\)](#)
 Molecule type [nucleic acid](#) Program [BLASTN 2.6.1+ > Citation](#)
 Query Length [783](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Purple
>=200	Red

Query

1 150 300 450 600 750

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus halodurans C-125 DNA, complete genome	1445	1445	99%	0.0	100%	BA000004.3

Bacillus halodurans C-125 DNA, complete genome

GenBank: [BA000004.3](#)

[GenBank](#) [FASTA](#)

Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features

[Link To This View](#) [Feedback](#)

500 K 1 M 1,500 K 2 M 2,500 K 3 M 3,500 K

BA000004.3: 3.4M..3.4M (860bp)

Sequence

Genes

BH3288

CDS: [BAB07007.1](#)

Title: [lysophospholipase](#)

Comment: [BH3288](#)

Location: [complement\(3,412,591..3,413,373\)](#)

[Length]

Span: 783

Product: 260

Download: [BAB07007.1](#)

Links & Tools

BLAST Genomic: [BA000004.3 \(3,412,591..3,413,373\)](#)

FASTA View: [BA000004.3 \(3,412,591..3,413,373\)](#)

GenBank View: [BA000004.3 \(3,412,591..3,413,373\)](#)

BLAST Protein: [BAB07007.1](#)

BLINK Results: [BAB07007.1](#)

FASTA View: [BA000004.3 \(3,412,591..3,413,373\)](#), [BAB07007.1](#)

GenBank View: [BA000004.3 \(3,412,591..3,413,373\)](#), [BAB07007.1](#)

BLAST Results for: Nucleotide Sequence (783 letters)

Query_125251

Lampiran 8 (Lanjutan)

Hasil BLAST Query

2. Hasil BLAST pada genome.jp

>[bha:BH3288](#) lysophospholipase

[↑ Top](#)

Length=783

Score = 1411 bits (1564), Expect = 0.0
 Identities = 782/782 (100%), Gaps = 0/782 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGTCGTCGTCATTCATGGGGCGGGA
60
      |||
Sbjct 1 ATGTGGAAATGGGAAGTTGCTGAGCCGCGTGGGGTGGTCGTCGTCATTCATGGGGCGGGA
60

Query 61 GAACACCATGGGCGTTATCAATGGCTCGCAAAAAAGTTTAAATAGCATCGGATTATCTGTA
120
      |||
Sbjct 61 GAACACCATGGGCGTTATCAATGGCTCGCAAAAAAGTTTAAATAGCATCGGATTATCTGTA
120

Query 121 GTGATGGGTGATTTGCCTGGCCAGGGAAGGACAAGAGGGAAGCGCGGTCACATTCAGTCG
180
      |||
Sbjct 121 GTGATGGGTGATTTGCCTGGCCAGGGAAGGACAAGAGGGAAGCGCGGTCACATTCAGTCG
180

Query 181 TTCCAACAGTACATTGATGTTGTC TTGGAATGGGTGGAA GCAGC TAAGT TGGAGCACGTG
240
      |||
Sbjct 181 TTCCAACAGTACATTGATGTTGTC TTGGAATGGGTGGAA GCAGC TAAGT TGGAGCACGTG
240

Query 241 CCAATCTTCTTGTTTGGCCACAGCATGGGCGGAC TTGTAGCCGTTCGCACGATGATTGAA
300
      |||
Sbjct 241 CCAATCTTCTTGTTTGGCCACAGCATGGGCGGAC TTGTAGCCGTTCGCACGATGATTGAA
300

Query 301 GGAGGCACATTGCCAGTGC GTGCTGTCAT TCTTT CATCACCATGCTTTGATTTATATCAG
360
      |||
Sbjct 301 GGAGGCACATTGCCAGTGC GTGCTGTCAT TCTTT CATCACCATGCTTTGATTTATATCAG
360

Query 361 TCACCTGGGAAAGGAAAAGAATTGGCTTCGAAAA GTTGCACCGAGTAACGCC TACTTTC
420
      |||
Sbjct 361 TCACCTGGGAAAGGAAAAGAATTGGCTTCGAAAA GTTGCACCGAGTAACGCC TACTTTC
420

Query 421 TCGCATCATTCAGGCATTCGTTCCGATTTAGTTACTCGAAATGAAGAGATTCGTGAAGCC
480
      |||
Sbjct 421 TCGCATCATTCAGGCATTCGTTCCGATTTAGTTACTCGAAATGAAGAGATTCGTGAAGCC
480
  
```

Lampiran 8 (Lanjutan)

Hasil BLAST Query

```

Query 481 TACTTGAAGGATGAGCTTAGAGTAACAAAAGTGTCCACGAAATGGTATTATGAGTTATCG
540
Sbjct 481 TACTTGAAGGATGAGCTTAGAGTAACAAAAGTGTCCACGAAATGGTATTATGAGTTATCG
540

Query 541 AAGGCATGCGAGATACCCGTCGTATCC TGAAAAGTTC CCGAACGTACCATTGCTTGTT
600
Sbjct 541 AAGGCATGCGAGATACCCGTCGTATCC TGAAAAGTTC CCGAACGTACCATTGCTTGTT
600

Query 601 ATGCAGGCGGGAGAAGATTATATCACGGA TAGAAAAGCGGCGTGGGAATGGTTTAATT CG
660
Sbjct 601 ATGCAGGCGGGAGAAGATTATATCACGGA TAGAAAAGCGGCGTGGGAATGGTTTAATT CG
660

Query 661 GTTCAAGTAACGGAAAAGGCCTATAAAGAGTGAATGGA CTCTATCATGAAATTTTAAAT
720
Sbjct 661 GTTCAAGTAACGGAAAAGGCCTATAAAGAGTGAATGGA CTCTATCATGAAATTTTAAAT
720

Query 721 GAGCTGAGCGGGAGGCTGTGTTT CAATACACCTGTTTT TTTATCGAACAGCAATTATCA
780
Sbjct 721 GAGCTGAGCGGGAGGCTGTGTTT CAATACACCTGTTTT TTTATCGAACAGCAATTATCA
780

Query 781 TA 782
Sbjct 781 TA 782

```