



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGLONAAN DAN EKSPRESI GEN *GLUCOSE OXIDASE* DARI
Aspergillus niger PADA VEKTOR pYES2/CT DALAM *Saccharomyces
cerevisiae* INVSc1**

TESIS

NINA HASTUTI

0706172323

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI BIOLOGI

PROGRAM PASCASARJANA

DEPOK

JUNI 2010



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGLONAAN DAN EKSPRESI GEN *GLUCOSE OXIDASE*
DARI *Aspergillus niger* PADA VEKTOR pYES2/CT DALAM
Saccharomyces cerevisiae INVSc1**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains**

**NINA HASTUTI
0706172323**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
PROGRAM PASCASARJANA
DEPOK
JUNI 2010**

JUNI 2010

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Nina Hastuti
NPM : 0706172323
Tanda Tangan :
Tanggal : 23 Juni 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Nina Hastuti
NPM : 0706172323
Program Studi : Biologi
Judul Tesis : Pengklonaan dan Ekspresi Gen *Glucose Oxidase*
dari *Aspergillus niger* pada Vektor pYES2/CT
dalam *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Vanny Narita, Ph.D. ()
Pembimbing : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc ()
Penguji : Dr. Amarila Malik Apt., M.Si ()
Penguji : Dr. Abinawanto ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 23 Juni 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Vanny Narita, Ph.D. selaku Pembimbing I dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc selaku Pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
- (2) Badan Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (BPPT) yang telah banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan;
- (3) Dr. Amarila Malik Apt., M.Si, Dr. Abinawanto, Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed. dan Dr. Nisyawati, MS. yang telah memberikan masukan dalam penyusunan tesis, serta para Dosen Program Studi Biologi, Program Pascasarjana, FMIPA - UI, yang telah mencurahkan ilmunya kepada penulis;
- (4) Pratondo Busono, Ph.D., Fifit Juniarti B.Sc.(Hons), Sabar Pambudi, S.Si., Doddy Irawan, S.Si., Wahyu Hidayati, S.Si., Aris Rudiyanto, S.Si., Drs. Subintoro, Drs. Amrizal, dan Nurhajiyah S.Si. atas bantuan, dukungan, dan masukan pengetahuan;
- (5) Orang tua dan keluarga saya yang telah memberikan bantuan dukungan doa, material dan moral; dan
- (6) Mba Evi, rekan-rekan Pascasarjana Biologi serta sahabat-sahabat terbaik (Melly, Mba Devin, Dimas, Pak Irzal, Pak Eko, Anggi, Ibu Nining, Ibu Yanti, Agus, Diana, Dewi, Siti) yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala

kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2010



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

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

Nama : Nina Hastuti
NPM : 0706172323
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :
Pengklonan dan Ekspresi Gen *Glucose Oxidase* dari *Aspergillus niger* pada Vektor pYES2/CT dalam *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir 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 : 23 Juni 2010

Yang menyatakan

(Nina Hastuti)

ABSTRAK

Nama : Nina Hastuti
Program Studi : Biologi
Judul : Pengklonaan Gen *Glucose Oxidase* (GOX) *Aspergillus niger*
pada Vektor Ekspresi pYES2/CT dalam *Escherichia coli* DH5 α

Glucose oxidase (GOX) digunakan dalam berbagai aplikasi medis seperti biosensor glukosa. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh klon gen GOX dari *Aspergillus niger* dalam vektor ekspresi pYES2/CT. Dari hasil pengklonaan didapat 3 kandidat klon yang selanjutnya diverifikasi dengan PCR dan digesti. Klon yang terverifikasi dinamakan pYES-GOX. Hasil analisis sekuens menunjukkan klon GOX berada sesuai dengan *Open Reading Frame*. Terdapat mutasi delesi pada nukleotida ke 1767 sehingga klon ini merupakan mutasi *frameshift*. Mutasi ini menyebabkan gen GOX rekombinan tidak terekspresikan sebagai protein fusi GOX-His₆. Hasil BLASTN menunjukkan homologi yang tinggi terhadap sekuens GOX strain *A. niger* lainnya seperti sebesar 99% homologi dengan sekuens *A. niger glucose oxidase* mRNA, *complete cds*. Dalam penelitian selanjutnya klon GOX rekombinan ini akan diekspresikan ke dalam *Saccharomyces cerevisiae*.

Kata Kunci : *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Glucose oxidase*,
Pengklonaan
i+59 halaman ; 14 gambar; 1 tabel
Daftar Pustaka : 35 (1989-2010)

ABSTRACT

Name : Nina Hastuti
Program Study : Biology
Title : Cloning The Glucose Oxidase (GOX) Gene from *Aspergillus niger* within pYES2/CT Vector in *Escherichia coli* DH5 α

Glucose oxidase (GOX) is used in various medical applications such as glucose biosensor. The research objective is to clone GOX gene from *Aspergillus niger* into pYES2/CT expression vector. Three clone candidate was verified by PCR and subsequent digestion. A verified clone was named pYES-GOX. The results showed that the sequence of cloned GOX gene was in accordance with the Open Reading Frame. Deletion mutation occurred at nucleotide number 1767 introducing a frameshift. Therefore, this recombinant GOX gene would not be expressed as GOX-His₆ fusion protein. BLASTN results showed a high homology to the GOX sequence of other *A. niger* strains, including a 99% sequence homology with *A. niger* glucose oxidase mRNA, complete cds. In subsequent studies, recombinant GOX gene would be expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.

Key Words : *Aspergillus niger*, Cloning, *Escherichia coli*, Glucose oxidase
i+59 pages ; 14 pictures; 1 tables
Bibliography : 35 (1989-2010)

ABSTRAK

Nama : Nina Hastuti
Program Studi : Biologi
Judul : Ekspresi Gen *Glucose Oxidase* (GOX) *Aspergillus niger* pada Vektor pYES2/CT dalam *Saccharomyces cerevisiae* untuk Aplikasi Biosensor Glukosa

Enzim *glucose oxidase* (GOX) telah dikenal lama sebagai bahan baku biosensor glukosa. Enzim GOX mengkatalisis reaksi oksidasi dari β -D-*glucose* menjadi D-*glucono- δ -lactone* dan hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron. Klon gen GOX yang berasal dari *Aspergillus niger* di dalam vektor ekspresi *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 pYES2/CT telah berhasil di dapatkan pada penelitian sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengekspresikan gen GOX rekombinan di dalam *S. cerevisiae* INVSc1. Plasmid rekombinan pYES2/CT yang mengandung gen GOX berhasil ditransformasi ke dalam *S. cerevisiae* INVSc1 menggunakan metode LiAc. Protein total diekstraksi menggunakan berbagai variasi metode. Metode vortex dengan penambahan *glass beads* sebagai teknik ekstraksi yang optimal. Protein rekombinan diinduksi dengan konsentrasi induser 2, 4 dan 8% galaktosa. Hasil induksi ekspresi protein tidak terlihat secara jelas, walaupun kemungkinan besar protein rekombinan GOX terdapat pada fase supernatan. Berdasarkan uji menggunakan *glucose assay* dan analisis biosensor glukosa, protein rekombinan GOX induksi dengan 8% galaktosa selama 48 jam mempunyai aktivitas lebih tinggi dibandingkan GOX komersial. Pada masa datang, perbaikan perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil ekspresi protein GOX rekombinan yang optimal.

Kata Kunci : *Aspergillus niger*, *Biosensor glukosa*, *Ekspresi*, *Glucose oxidase*, *Saccharomyces cerevisiae*

i+56 halaman ; 37 gambar; 5 tabel

Daftar Pustaka : 26 (1989-2008)

ABSTRACT

Name : Nina Hastuti
Program Study : Biology
Title : Expression The Glucose Oxidase (GOX) Gene *Aspergillus niger* within pYES2/CT Vector in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 for Glucose Biosensor Application

Glucose oxidase (GOX) enzyme has been applied as a raw material glucose biosensor. GOX enzyme catalyses the oxidation of β -D-glucose into D-glucono- δ -lactone and hydrogen peroxide (H_2O_2) using oxygen as an electron acceptor. Previously, GOX gene from *Aspergillus niger* was successfully cloned into *Saccharomyces cerevisiae* expression vector, pYES2/CT. The purpose of this study was to express recombinant GOX gene in *S. cerevisiae* INVSc1. Recombinant plasmid pYES2/CT containing GOX gene was successfully transformed into *S. cerevisiae* INVSc1 using the LiAc method. Then the total proteins were extracted using various protocols with glass beads lyses method as the optimal extraction technique. The recombinant protein was induced by of 2, 4 and 8% galactose inducer. However induced expression of this protein was not significantly observed, although it was shown that recombinant GOX protein was likely to be present in the supernatant phase. Based on glucose liquid assay and a preliminary glucose biosensor analysis, the recombinant GOX protein induced with 8% galactose for 48 hours had a higher activity than commercial GOX. In the future, further improvements need to be done to obtain optimal recombinant GOX protein expression.

Key Words : *Aspergillus niger*, Expression, Glucose biosensors, Glucose oxidase, *Saccharomyces cerevisiae*

i+56 pages ; 37 pictures; 5 tables

Bibliography : 26 (1989-2008)

Name : Nina Hastuti (0706172323)
Title : Cloning and Expression of Glucose Oxidase Gene from *Aspergillus niger* within pYES2/CT Vector in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1
Thesis Supervisors : I. Vanny Narita Ph.D.
II. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc

SUMMARY

Glucose oxidase (GOX; β -D-glucose: 1-oxygen-oxidoreductase, EC 1.1.3.4.) is an enzyme that catalyzes the oxidation of β -D-glucose into D-glucono-1,5-lactone and then became D-acid gluconate and hydrogen peroxide. GOX enzyme is the main product of *Aspergillus niger* in gluconic acid fermentation industry, food technology, clinical analysis and foremost as a glucose sensor.

The discovery of glucose sensors is very important for patients with diabetes mellitus. Diabetes mellitus is a condition of disturbance of normal metabolism in the body caused by the body inability to make or supply the hormone insulin that resulted in an increase in blood sugar, which exceeded the normal value. Insulin is a hormone released by the pancreas which is responsible for maintaining normal blood sugar levels.

Blood sugar in the form of glucose is chemically measured initially using pieces of paper (paper strips). However, paper strip measurement is not accurate and slow, mainly due to its relatively large size. As an alternative to this paper strip device, glucose biosensor based on biochemical reactions of enzyme GOX is proposed to be more accurate and rapid.

Agency for the Assessment and Application of Technology (BPPT) has performed research on cloning and expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* within pYES2/CT vector in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1. The research objectives were (1) to clone GOX gene from *A. niger* into pYES2/CT vector inside *Escherichia coli* DH5 α and (2) to express recombinant GOX gene within pYES2/CT in *S. cerevisiae* INVSc1. Studies were conducted in

the Laboratory of Agro Industry and Biotechnology I (LAPTIAB I), Center for Pharmaceutical and Medical Technology, BPPT, Serpong, in September 2008 until March 2010.

The results showed that GOX gene from *A. niger* was successfully cloned into pYES2/CT in *E. coli* DH5 α . Sequence analysis showed that GOX gene was cloned in the right Open Reading Frame. Deletion mutation occurred at nucleotide number 1767 introducing a frameshift. Therefore, this recombinant GOX gene would not be expressed as GOX-His₆ fusion protein.

Recombinant plasmid pYES2/CT containing GOX gene was successfully transformed into *S. cerevisiae* INVSc1 using the LiAc method. Then the total proteins were extracted using various protocols with glass beads lyses method as the optimal extraction technique. The recombinant protein was induced by of 2, 4 and 8% galactose inducer. However induced expression of this protein was not significantly observed, although it was shown that recombinant GOX protein was likely to be present in the supernatant phase. Based on glucose liquid assay and a preliminary glucose biosensor analysis, the recombinant GOX protein induced with 8% galactose for 48 hours had a higher activity than commercial GOX. In the future, further improvements need to be done to obtain optimal recombinant GOX protein expression.

i + 132 pp

Bibl : 55 (1989 -- 2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK.....	viii
SUMMARY	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
PENGANTAR PARIPURNA.....	1
MAKALAH I : PENGKLONAN GEN <i>GLUCOSE OXIDASE</i> (GOX) <i>Aspergillus niger</i> PADA VEKTOR EKSPRESI pYES2/CT DALAM <i>Escherichia coli</i> DH5 α	
Pendahuluan.....	4
Lokasi dan Waktu Penelitian	6
Bahan dan Cara Kerja	6
Hasil dan Pembahasan.....	19
Kesimpulan dan Saran.....	36
Daftar Acuan	37
Lampiran	41
MAKALAH II : EKSPRESI GEN <i>GLUCOSE OXIDASE</i> (GOX) REKOMBINAN PADA VEKTOR pYES2/CT DALAM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	
Pendahuluan.....	64
Lokasi dan Waktu Penelitian	67
Bahan dan Cara Kerja	68
Hasil dan Pembahasan.....	75
Kesimpulan dan Saran.....	99
Daftar Acuan	100
Lampiran	103
DISKUSI PARIPURNA	121
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN	128
DAFTAR ACUAN.....	130

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.1.1	Elektroforesis gel agarosa hasil PCR gen GOX <i>Aspergillus niger</i>	19
1.1.2	Elektroforesis gel agarosa hasil purifikasi produk PCR gen GOX.....	22
1.2.1	Elektroforesis gel agarosa hasil isolasi plasmid pYES2/CT.....	23
1.3.1	Elektroforesis gel agarosa hasil purifikasi vektor serta sisipan didigesti dengan <i>Bam</i> HI dan <i>Xba</i> I.....	24
1.5.1	Hasil transformasi hasil ligasi pYES2/CT dan gen GOX.....	28
1.6.1.1	Elektroforesis gel agarosa hasil isolasi kandidat plasmid rekombinan.....	31
1.6.2.1	Elektroforesis gel agarosa hasil verifikasi PCR DNA plasmid rekombinan.....	32
1.6.2.2	Elektroforesis gel agarosa hasil verifikasi digesti DNA plasmid rekombinan dengan <i>Bam</i> HI.....	33
1.6.2.3	Hasil analisis <i>open reading frame</i> klon GOX.....	34
2.1	Skema reaksi enzim <i>glucose oxidase</i> (GOX).....	65
2.1.1.1	Hasil transformasi pYES-GOX ke dalam <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 pada minimal medium.....	76
2.1.2.1	Elektroforesis gel agarosa hasil verifikasi PCR DNA plasmid rekombinan pYES-GOX dari <i>S. cerevisiae</i> INVSc1.....	78
2.2.1.1	Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan <i>glass beads</i> , induksi 8% galaktosa.....	80
2.2.1.2	Analisis SDS-PAGE metode : sonikasi, vortex dengan penambahan <i>glass beads</i> , induksi 8% galaktosa.....	80
2.2.1.3	Analisis SDS-PAGE metode : sonikasi, induksi 8% galaktosa.....	81
2.3.1.1	Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan <i>glass beads</i> , induksi 8% galaktosa, fase supernatan.....	83
2.3.1.2	Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan <i>glass beads</i> , induksi 8% galaktosa, fase pelet.....	83
2.3.2.1	Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan <i>glass beads</i> , 2% galaktosa.....	86
2.3.2.2	Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan <i>glass beads</i> , 4% galaktosa.....	86
2.3.2.3	Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan <i>glass beads</i> , induksi 8% galaktosa.....	87
2.4.1.1	Hasil <i>glucose assay</i> (OD ₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 4% galaktosa, blangko larutan	

	<i>glucose assay</i>	89
2.4.1.2	Hasil <i>glucose assay</i> (OD ₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 4% galaktosa, blangko <i>breaking buffer</i>	89
2.4.1.3	Hasil <i>glucose assay</i> (OD ₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 8% galaktosa, blangko larutan <i>glucose assay</i>	90
2.4.1.4	Hasil <i>glucose assay</i> (OD ₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 8% galaktosa, blangko <i>breaking buffer</i>	90
2.4.2.1a	Hasil purifikasi protein pYES-GOX menggunakan sephadex G-100, fase supernatan, induksi 8% galaktosa selama 48 jam, pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit, metode ekstraksi vortex dengan penambahan <i>glass beads</i>	93
2.4.2.2a	Hasil <i>cyclic voltammograms</i> uji strip biosensor menggunakan protein GOX.....	95
2.5.1	Hasil analisis SEM strip biosensor, perbesaran 1000X.....	98

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1.1 Letak primer pada gen <i>glucose oxidase</i> (GOX).....	41
1.2 Bagan cara kerja pengklonaan gen GOX ke dalam <i>E. coli</i> DH5 α	42
1.3 Komposisi bahan kimia, cara pembuatan larutan atau <i>buffer</i>	43
1.4 Pembuatan medium.....	47
1.5 Analisis konsentrasi DNA sisipan gen GOX dan vektor plasmid pYES2/CT yang telah didigesti dengan <i>Bam</i> HI dan <i>Xba</i> I serta dipurifikasi dengan perangkat lunak BIO1D.....	48
1.6 Perhitungan rasio molar reaksi ligasi.....	50
1.7 Nilai efisiensi transformasi sel kompeten.....	50
1.8 Elektroferogram hasil sekuensing klon 5.....	51
1.9 Hasil analisis BLASTN.....	59
1.10 <i>Alignment</i> sekuens pYES-GOX hasil sekuensing terhadap <i>A. niger glucose oxidase</i> mRNA complete cds.....	60
1.11 Hasil analisis sekuens klon GOX yang mengalami mutasi dibandingkan dengan gen GOX dari <i>A. niger</i> NRRL-3.....	62
1.12 Struktur kristal <i>Glucose Oxidase</i> (Protein Data Base ID: 1GAL).....	62
1.13 Hasil analisis domain klon GOX.....	62
1.14 Poster publikasi Perhimpunan Peneliti Bahan Alam (PERHIPBA). 11—12 Agustus 2009, Badan Penerapan Pengkajian Teknologi (BPPT), Jakarta	63
2.1 Bagan cara kerja ekspresi protein rekombinan.....	103
2.2 Pembuatan medium.....	104
2.3 Komposisi bahan kimia, cara pembuatan larutan atau <i>buffer</i>	105
2.4 Hasil <i>glucose assay</i> (OD ₅₀₀).....	109
2.5 Analisis SDS-PAGE optimalisasi metode ekstraksi protein, keberadaan protein GOX dan optimalisasi konsentrasi induser galaktosa.....	111

PENGANTAR PARIPURNA

Glucose oxidase (GOX; β -D-glucose: 1-oxygen-oxidoreductase, EC 1.1.3.4.) merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi dari β -D-glucose menjadi D-glucono-1,5-lactone kemudian menjadi D-asam glukonat dan hidrogen peroksida (Cullen 2007). Enzim GOX merupakan homodimer (protein dimer), berukuran kira-kira 150—170 kDa mengandung satu ikatan kuat dengan flavin adenin dinukleotida (FAD) per monomer sebagai kofaktor (Pulci *et.al.* 2004).

Enzim β -D *glucose oksidase* biasanya digunakan bersama-sama dengan peroksida dan suatu senyawa berwarna. Adanya oksigen, akan dihasilkan asam glukonat dan hidrogen peroksida akan diuraikan oleh peroksidase. Adanya senyawa berwarna memudahkan untuk mengukur aktivitas enzim dan konsentrasi glukosa secara tidak langsung dengan bantuan spektrofotometer (Suhartono 1989).

Berbagai penelitian mengenai enzim GOX yang berasal dari *Aspergillus niger* telah dilakukan antara lain oleh : Frederick *et.al.* (1990) mengenai pengklonaan, sekuensing, sekresi dan analisis kinetik yeast pembawa enzim GOX dari *Aspergillus niger* ; Katrluk *et.al.* (1996) mengenai biosensor yang menggunakan enzim GOX *Aspergillus niger* ; dan Yamaguchi *et.al.* (2007) mengenai ekspresi GOX *Aspergillus niger* ke dalam *Pichia pastoris*. Enzim GOX yang berasal dari *Penicillium spp.* juga telah diteliti antara lain oleh Pulci *et.al.* (2004) mengenai pengklonaan, sekuensing dan ekspresi GOX *Penicillium variabile* P16 ; Crognale *et.al.* (2006) mengenai ekspresi gen GOX *Penicillium variabile* P16 ke dalam *Pichia pastoris* dan karakterisasi enzim rekombinan ; dan Simpson *et.al.* (2007) mengenai isolasi, purifikasi dan karakterisasi GOX *Penicillium sp.* CBS 120262.

Enzim GOX adalah produk utama dari kapang *Aspergillus niger* dalam industri fermentasi asam glukonat, teknologi makanan, analisis klinik dan terutama sebagai sensor glukosa (Pulci *et.al.* 2004). Penggunaan enzim GOX dalam industri harus melewati tahap purifikasi agar terbebas dari zat-zat yang mengkontaminasi sehingga dihasilkan reaksi maksimal. Penggunaan GOX dari

yang belum murni sering ditemukan kontaminan seperti katalase, selulase, dan amilase sehingga dapat menghambat aplikasi dalam bidang industri, kesulitan dalam proses purifikasi dan penghematan biaya purifikasi menjadi faktor-faktor yang mendorong gen GOX *Aspergillus niger* untuk diklonakan dan diekspresikan dalam *Saccharomyces cerevisiae* sebagai bentuk glikosilat (Witt *et al.* 1998; Crognale *et al.* 2006).

Pengklonaan adalah suatu proses memasukkan fragmen DNA asing (gen) ke dalam sel inang (sel bakteri, tumbuhan atau hewan). Fragmen DNA yang akan diklonakan biasanya disisipkan ke dalam suatu vektor untuk membentuk DNA rekombinan. Vektor bertindak sebagai kendaraan untuk membawa gen ke dalam sel inang. Vektor tersebut dimasukkan ke dalam sel inang dan ikut bereplikasi sehingga dihasilkan fragmen DNA identik dalam jumlah banyak. Sel inang yang mengandung fragmen DNA tersebut disebut sebagai klon (Wong 1997).

Menurut Brock *et al.* (1994), teknik pengklonaan dapat bermanfaat untuk mempelajari mekanisme replikasi dan ekspresi suatu gen di dalam organisme prokariotik, eukariotik maupun virus. Pengklonaan gen juga dapat digunakan untuk mengubah struktur dan fungsi protein dengan memanipulasi gen-gen pengkode protein tersebut (Wong 1997).

Alat sensor glukosa sangat penting bagi penderita penyakit diabetes mellitus. Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang berlangsung kronik di mana penderita diabetes tidak bisa memproduksi insulin dalam jumlah yang cukup atau tubuh tidak mampu menggunakan insulin secara efektif sehingga terjadi kelebihan gula dalam darah. Pengukuran kadar gula darah merupakan cara untuk mengetahui apakah seseorang menderita penyakit diabetes mellitus atau tidak. Menurut Atun (2010), seseorang dikatakan menderita diabetes jika memiliki kadar gula darah saat puasa lebih dari 126 mg/dL dan saat tidak puasa atau normal lebih dari 200 mg/dL.

Pada awalnya kadar gula darah diukur menggunakan *paper strip* yang dapat berubah warna karena reaksi kimiawi dengan glukosa. Akan tetapi, produk ini banyak mengandung kelemahan seperti akurasi rendah, kecepatan pengukuran lambat serta ukurannya relatif besar. Tahun 1962, Leland Clark mengembangkan alat pengukur kadar gula darah berdasarkan reaksi biokimia dengan enzim *glucose*

oxidase (GOD/GOX) yang diproduksi oleh kapang *Aspergillus niger*. Penelitian Leland Clark tersebut menunjukkan bahwa enzim GOX bereaksi secara spesifik dengan glukosa. Alat pengukur yang menyatukan elemen biologis baik yang terikat kuat atau terintegrasi di dalam transduser dikenal dengan istilah biosensor (Witarto 2000).

Langkah awal agar enzim GOX dapat digunakan sebagai sensor glukosa adalah dengan mengekspresikan gen GOX tersebut ke dalam suatu organisme. Ekspresi gen adalah suatu proses pengeluaran informasi dikandung suatu gen menjadi suatu bentuk sifat organisme. Ekspresi gen terbagi menjadi dua tahapan yaitu pemindahan informasi genetik dari DNA ke RNA (transkripsi) dan penterjemahan informasi genetik terdapat pada RNA menjadi polipeptida (translasi) (Wong 1997).

Pendeteksian suatu gen spesifik dapat dilakukan melalui ekspresi protein gen tersebut pada sistem bakteri atau khamir. Ekspresi suatu gen dalam bakteri, fragmen DNA yang diklonasi hanya terdiri atas gen fungsional saja karena bakteri merupakan organisme prokariot yang tidak memiliki mekanisme pematangan mRNA. Selain itu, gen perlu disisipkan pada suatu vektor ekspresi. Apabila suatu gen atau DNA mengandung sekuen pengkode protein disisipkan ke dalam suatu vektor ekspresi pada bagian *open reading-frame* (ORF), maka akan menghasilkan protein fusi. Protein fusi merupakan protein yang terbentuk dari protein-protein dalam sel dengan protein *insert* dalam jumlah cukup besar, serta dapat mencegah toksisitas dan degradasi proteolitik terhadap protein *insert* (Hara & Yamakawa 1996).

Pengembangan alat biosensor di Indonesia masih terbatas. Hal ini disebabkan karena bahan baku enzim GOX yang masih diimpor dari luar negeri. Usaha pengembangan alat biosensor di Indonesia menggunakan GOX diawali dengan penelitian pengklonaan untuk memperbanyak produksi GOX sehingga diharapkan biosensor menggunakan enzim tersebut dapat digunakan secara luas oleh masyarakat.

Makalah 1

PENGLONAAN GEN *GLUCOSE OXIDASE* (GOX) *Aspergillus niger* PADA VEKTOR EKSPRESI pYES2/CT DALAM *Escherichia coli* DH5a

Nina Hastuti

ninahastuti41@yahoo.com

ABSTRACT

Glucose oxidase (GOX) is used in various medical applications such as glucose biosensor. The research objective is to clone GOX gene from *Aspergillus niger* into pYES2/CT expression vector. Three clone candidate was verified by PCR and subsequent digestion. A verified clone was named pYES-GOX. The results showed that the sequence of cloned GOX gene was in accordance with the Open Reading Frame. Deletion mutation occurred at nucleotide number 1767 introducing a frameshift. Therefore, this recombinant GOX gene would not be expressed as GOX-His₆ fusion protein. BLASTN results showed a high homology to the GOX sequence of other *A. niger* strains, including a 99% sequence homology with *A. niger* glucose oxidase mRNA, complete cds. In subsequent studies, recombinant GOX gene would be expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords : *Aspergillus niger*, Cloning, *Escherichia coli*, Glucose oxidase

PENDAHULUAN

Glucose oxidase (GOX) merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi dari β -D-glucose menjadi D-glucono-1,5-lactone kemudian menjadi D-asam glukonat dan hidrogen peroksida (Cullen 2007). Enzim GOX merupakan homodimer (protein dimer), berukuran kira-kira 150—170 kDa mengandung satu ikatan kuat dengan flavin adenin dinukleotida (FAD) per monomer sebagai kofaktor. Enzim tersebut merupakan glikosilat dengan kandungan karbohidrat 16% (Hecht *et.al.* 1993b; Crognale *et. al.* 2006). Menurut Pulci *et al.* (2004) & Frederick *et al.* (1990), GOX merupakan enzim ekstraselular yang dapat digunakan dalam industri fermentasi asam glukonat, aplikasi teknologi makanan

sebagai sumber hidrogen peroksida pada pengawetan makanan, analisis klinis penentuan kadar gula darah, dan sensor glukosa.

Pengembangan GOX sebagai sensor glukosa sangat berguna bagi penderita Diabetes mellitus (DM). Diabetes mellitus adalah suatu kondisi terganggunya metabolisme di dalam tubuh akibat ketidakmampuan tubuh membuat atau menyuplai hormon insulin sehingga terjadi peningkatan gula darah melebihi nilai normal (Atun 2010). Insulin adalah hormon dihasilkan oleh pankreas bertanggung jawab dalam mempertahankan kadar gula darah. Di kalangan masyarakat luas, penyakit DM lebih dikenal sebagai penyakit gula atau kencing manis. Berbagai penelitian mengenai penyakit DM menunjukkan terjadi kecenderungan peningkatan penderita. Desriani (2003), melaporkan di Indonesia jumlah penderita DM lebih tinggi di daerah urban dibandingkan di daerah rural. Pada tahun 2020 diperkirakan akan ada 7 juta penderita DM di Indonesia, dan jumlah penderita di dunia diperkirakan mencapai 306 juta jiwa.

Pengukuran kadar gula darah merupakan cara untuk mengetahui apakah seseorang menderita penyakit diabetes mellitus atau tidak. Menurut Atun (2010), seseorang dikatakan menderita diabetes jika memiliki kadar gula darah saat puasa lebih dari 126 mg/dL dan saat tidak puasa atau normal lebih dari 200 mg/dL.

Gula darah berbentuk glukosa pada awalnya diketahui dengan cara kimiawi menggunakan *paper strip*. *Paper strip* dapat berubah warna karena reaksi kimiawi dengan glukosa. Cara pengukuran gula darah berkembang dengan mengukur kadar oksigen terlarut pada darah. Akan tetapi, produk ini kurang populer karena banyak mengandung kelemahan misalnya akurasi rendah, kecepatan pengukuran lambat serta ukurannya relatif besar (Witarto 2000). Pada tahun 1962, Leland Clark mengembangkan alat pengukur gula darah berdasarkan reaksi biokimia dengan enzim *glucose oxidase* (GOD/GOX) dan kemudian mengukurnya secara elektrokimia. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa enzim GOX yang diproduksi oleh kapang *Aspergillus niger* bereaksi secara spesifik dengan glukosa. Perangkat analisis yang menggabungkan bahan biologis baik terikat kuat atau terintegrasi di dalam transduser fisikokimia dikenal dengan istilah biosensor (Mozaz *et al.* 2004).

Biosensor menggunakan enzim GOX mempunyai mekanisme kerja sangat bergantung pada keberadaan oksigen. Elektron hasil oksidasi glukosa oleh enzim GOX ditangkap oleh elektroda sehingga kadar glukosa berbanding lurus dengan sinyal elektronik yang diterima. Biosensor ini menjadi cara alternatif untuk mengatasi kelemahan pengukuran gula darah menggunakan *paper strip*. Enzim GOX yang diproduksi oleh kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* spp. bereaksi secara spesifik dengan glukosa (Witt *et al.* 1998).

Pengembangan biosensor menggunakan enzim GOX di Indonesia masih terbatas. Hal ini disebabkan karena bahan baku GOX masih diimpor dan terbatasnya produksi GOX oleh kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* spp. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh klon gen GOX dari *A. niger* ke dalam *E. coli* DH5 α . Diharapkan GOX dapat diproduksi dengan kuantitas dan kualitas yang tinggi.

METODOLOGI

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB I), Badan Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (BPPT), PUSPIPTEK Serpong, selama 7 bulan (September 2008 – April 2009).

BAHAN DAN ALAT

Sampel DNA

Sampel berupa DNA genom *Aspergillus niger* koleksi Badan Penerapan Pengkajian Teknologi Culture Collection (BPPTCC), Serpong.

Sel inang

Sel inang dalam pengklonaan untuk mendapatkan rekombinan adalah *Escherichia coli* DH5a (Invitrogen).

Vektor

Vektor pengklonaan yang digunakan adalah pYES2/CT (Invitrogen).

Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian : medium cair *Super Optimal Broth* (SOB), medium padat SOB, medium cair *Super Optimal Broth With Catabolite Repression* (SOC), medium cair *Yeast Peptone Dextrose* (YPD cair) dan medium padat YPD.

Larutan dan *buffer*

Larutan dan *buffer* yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 1.3.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacto tryptone* [BD], *yeast extract* [Oxoid], natrium klorida [J.T. Baker], agar *bacteriological* [Oxoid], Pepton [Sigma], kalsium klorida [Merck], kalium klorida [Sigma], magnesium klorida [Sigma], *ampicillin anhydrous* [Sigma], glukosa [Sigma], Rnase A [Sigma], enzim restriksi *Bam* HI [Fermentas] dan *Xba* I [Fermentas], 10x TangoTM *buffer* [Fermentas], enzim T4 DNA ligase 3 u/μl dan 10x T4 DNA ligase *buffer* [Promega], mangan klorida tetrahidrat [Merck], *Tag buffer with MgCl₂* [Promega], *PCR Nucleotide Mix* [Promega], enzim *Tag DNA Polymerase* [Promega], AccuPrimeTM Pfx Supermix [Invitrogen], *Kit PCR Core System* [Promega], *Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* [Promega], *Wizard[®]*

plus SV minipreps DNA Purification System, penanda 1 kb DNA ladder [Fermentas], λ DNA HindIII Markers [Fermentas], agarosa [Fermentas], 6x loading dye [Fermentas], etidium bromida 10 mg/ml [Promega], Tris Base [Promega], tris-hidroklorid [Promega], etanol 96 % [Invitrogen], akuades, nuclease-free water [Ultrapure], dimethyl sulfoxide (DMSO) [MP], etilen diamin tetra asetat (EDTA) [Sigma], natrium hidroksida (NaOH) [Sigma], kalium asetat [Sigma], etanol 70% [Merck], etanol 96% [Merck].

Primer

Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi sebagai berikut :

Forward gox 9 (*Bam* HI) 5'-gatgatccgatgAGCAATGGCATTGAAGC-3'

Reverse gox 9 (*Xba* I) 5'-gatgggtctagaACTCACTGCATGGAAGC-3'

(Lampiran 1.1).

Primer yang digunakan untuk sekuensing sebagai berikut :

T7 : 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

CYC1 : 5' GTCACGCTTACATTCACGC 3'

GOX-F2 : 5' GCGACACCGGCGATGACT 3'

GOX-R2 : 5' CGTAGGCGAAGTGGTGAAGGT 3'

Alat

Peralatan digunakan dalam penelitian antara lain : Erlenmeyer [Iwaki, Schott Durant], gelas beaker [Schott Durant], mortar, tabung mikrosentrifus 1,5 ml [Axygen], pipette tips [Axygen], pipet mikro 0,2—2,0 μ l; 2—20 μ l; 20—200 μ l; 100—1000 μ l [Bio-Rad], gelas ukur 100 ml [Iwaki], tabung falcon 15 ml dan 50 ml [Iwaki, Corning], jarum tanam bulat (ose), tabung reaksi [Pyrex], cawan petri [Petriq], *UV table combi-light* [Vilber Lourmat], monitor [Rainbow CCTV], *printer box* [Sony], *photo documentation* [Vilber Lourmat], timbangan 0,02 – 210 gram [AND GF- 200], aluminium foil [Bagus], pH meter [Thermo], *vortex* [Bio-Rad], *water bath shaker* [Jeio Tech], rotary shaker [Heidolph], *wrap plastic* [Klinpak], *hot plate* dan *magnetic stirrer* [Ika[®] RH-KT/C], *Pipette Pump* [Bel art

Alla], *centrifuge* [Sorvall & Beckman], *microcentrifuge* [Sorvall], *microwave oven* [General Electric], *apparatus electrophoresis* [Bio-Rad], *thermal cycler* [AB2400], tabung sampel PCR 200 µl [Axygen] kertas parafilm [Iwaki Novix-II], *timer* [Jpn CBM], *syringe* [Terumo]; membran *filter* bakteri 22 µm dan 45 µm [Corning]; kotak es [Marina Cooler]; sarung tangan karet [Sensi gloves]; botol semprot alkohol; masker; kertas tisu; plastik tahan panas; spatula, kamera digital [Nikkon], *laminar air flow cabinet* [ESCO], lemari asam [ESCO], bunsen elektrik [Flamingo], *deep freezer* -80° C [Angelantoni Scientifica], inkubator 37° C [Sanyo], autoklaf [Tomy], mesin pembuat es [Hoshizaki & NordCap], spatel *drygalsky* [Iwaki Pyrex], oven [Bicasa Termostatica], spektrofotometer [Shimadzu UV-160A & Thermo], kuvet silika [Bio-Rad], Sub-Cell® GT Agarose gel electrophoresis system [Bio-Rad], perangkat gel documentation [Vilber LourMat], *sequencer* [ABI 3130 *Genetic Analyzer*], dan perangkat komputer analisis elektroforesis [Intel, Applied Biosystems], kertas saring, lemari pendingin [LG & Toshiba].

CARA KERJA

Cara kerja secara umum dapat dilihat pada Lampiran 1.2.

Pembuatan medium

Cara pembuatan medium dapat dilihat pada Lampiran 1.4.

Pembuatan larutan dan *buffer*

Cara pembuatan larutan dan *buffer* dapat dilihat pada Lampiran 1.3.

Pembuatan kultur stok *Aspergillus niger*

Kapang *Aspergillus niger* diinokulasikan dengan menggunakan jarum tanam tajam ke dalam cawan petri yang berisi medium YPD agar secara aseptis,

diinkubasi pada suhu 30° C selama 5 hari sehingga akan diperoleh kultur stok siap digunakan (Frederick 1990).

Isolasi gen penyandi GOX dari *Aspergillus niger*

Isolasi gen penyandi GOX dari *Aspergillus niger* dilakukan dengan metode DNA minipreparation. Sebanyak satu potong stok kultur *Aspergillus niger* dari cawan petri berukuran 1 cm x 1 cm diinokulasikan pada medium YPD cair 50 ml dalam 250 ml Erlenmeyer, diinkubasi pada suhu 36° C dengan pengocokan 150 rpm selama 3 hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman No 1. Miselium yang dihasilkan ditambahkan 0,7 ml larutan A (yang telah dipanaskan 65° C) kemudian digerus menggunakan mortar. Sebanyak 0,5 ml sampel yang telah digerus dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus, ditambahkan 0,5 ml kloroform : fenol, dengan perbandingan 1 : 1, disentrifugasi selama 10 menit, kecepatan 13000 rpm, pada suhu 4° C. Hasil DNA genom *Aspergillus niger* yang berada pada lapisan atas diambil, ditambahkan 10 µl larutan B, 5—10 µl RNase kemudian diinkubasi 37° C selama 30 menit. Selanjutnya, ditambahkan 70 µl Na asetat 3 M dan etanol 99 % dengan perbandingan 1 : 2, diinkubasi selama 5 menit pada -20° C, disentrifugasi selama 5 menit. Hasil sentrifugasi dikeringkan sehingga didapatkan pelet, ditambahkan 300 µl etanol 70 % dan disentrifugasi selama 2 menit. Hasil sentrifugasi dikeringkan, ditambahkan 30-50 µl ddH₂O kemudian dianalisis dengan gel elektroforesis.

Amplifikasi gen penyandi GOX dengan teknik PCR

Proses amplifikasi gen penyandi GOX dilakukan dengan teknik PCR berdasarkan metode Invitrogen (2004). Komposisi amplifikasi gen penyandi GOX adalah *AccuPrimeTM Pfx SuperMix* 22,5 µl, Primer *Reverse* 0,5 µl (10 pmol/µl), Primer *Forward* 0,5 µl (10 pmol/µl) dan DNA cetakan 0,5 µl. Bahan tersebut dimasukkan di dalam tabung mikrosentrifus 0,2 ml, lalu disentrifugasi beberapa detik agar bahan tercampur dengan baik. Sampel selanjutnya diletakkan

di dalam tempat tabung mikrosentrifus pada mesin *thermal cycler* AppliedBiosystem 2400.

Perlakuan PCR sebagai berikut. Suhu awal denaturasi adalah 94° C selama 5 menit lalu siklus PCR dimulai dengan suhu denaturasi 94° C selama 1 menit, suhu *annealing* 59° C selama 1 menit, dan suhu polimerisasi pada 72° C selama 2 menit. Siklus berlangsung sebanyak 30 kali dan diakhiri dengan suhu polimerisasi pada 72° C selama 5 menit dan diikuti dengan penurunan suhu menjadi 4° C. Kontrol negatif dan positif disertakan dalam reaksi PCR. Kontrol negatif dibuat dengan komposisi yang sama seperti reaksi PCR sampel namun tanpa penambahan DNA cetakan. Kontrol positif menggunakan *kit PCR Core System* (Promega), yang terdiri dari *positive control plasmid DNA* (1 ng/μl), *upstream control primer*, dan *downstream control primer*. Hasil perbanyakan dengan PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

Elektroforesis gel agarosa

Pemisahan fragmen DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa berdasarkan modifikasi metode Sambrook & Russell (2001). Gel agarosa 0,8% dibuat dengan mencampurkan 0,8 g bubuk agarosa dengan 100 ml *buffer tris acetate* (TAE) 1x, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan homogen. Larutan didinginkan beberapa saat kemudian dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah dipasangkan cetakan sumur (*comb*), setelah gel mengeras cetakan sumur kemudian diangkat dan gel diletakkan dalam elektroforesis serta direndam dengan larutan TAE 1x.

Buffer loading 6x ditambahkan ke dalam larutan DNA hingga konsentrasi akhir *buffer* 1x. Campuran kemudian dihomogenkan menggunakan pipet yaitu dengan memipet beberapa kali. Campuran kemudian dimasukkan ke dalam sumur agarosa. Sebanyak 1 μg (2 μl) penanda berat molekul λ DNA/*Hind* III dimasukkan ke dalam sumur sebagai pembanding ukuran fragmen DNA

Elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik sebesar 200 A, dengan tegangan 80—100 V. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit (atau ketika warna *loading buffer* bermigrasi hingga sejauh tiga perempat bagian gel agarosa).

Gel agarosa lalu direndam di dalam etidium bromida (EtBr) dengan konsentrasi akhir 1 µg/ml (10mg/ml x 1/10.000) selama 10—15 menit. Fragmen DNA dapat dilihat di bawah sinar UV. Hasil elektroforesis didokumentasikan menggunakan perangkat gel dokumentasi.

Purifikasi DNA hasil elektroforesis dengan *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*

Purifikasi DNA hasil elektroforesis gel agarose menggunakan *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* berdasarkan Promega (2004). Proses purifikasi membutuhkan dua larutan yaitu *membrane wash solution* (mengandung 10 mM kalium asetat pH 5,0; 16,7 µM EDTA pH 8,0; dan 80% etanol) dan *membrane binding solution* (mengandung 0,5 M kalium asetat pH 5,0 dan 4,5 M guanidin isotiosianat). *Membrane wash solution* dipersiapkan terlebih dahulu dengan menambahkan 15 ml etanol 95% ke dalam *membrane wash solution*.

Fragmen DNA hasil elektroforesis yang dikehendaki dipotong dan diisolasi dari gel yang telah diketahui bobotnya, ditempatkan dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Bobot potongan gel dihitung berdasarkan selisih bobot tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml berisi gel dan tabung kosong. Potongan gel tersebut kemudian ditambahkan 10 µl *membrane binding solution* untuk setiap 10 mg potongan gel. Campuran diinkubasi pada suhu 50—65° C dan sesekali divorteks hingga potongan gel terlarut sempurna.

Potongan gel terlarut dituang ke dalam *SV minicolumn* dan *collection tube*, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang, dan disentrifugasi (1 menit, 13.000 rpm). Cairan dalam *collection tube* dibuang, *collection tube* dipasang kembali dengan *SV minicolumn*. *Membrane wash solution* ditambahkan sebanyak 700 µl dan disentrifugasi kembali (1 menit, 13.000 rpm). Cairan dalam *collection tube* dibuang, lalu *collection tube* dipasang kembali dengan *SV minicolumn*. Pencucian dilakukan kembali dengan *membrane wash solution* sebanyak 500 µl dan disentrifugasi (5 menit, 13.000 rpm). Cairan dalam *collection tube* dibuang dan *SV minicolumn* dipindahkan ke atas tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Sebanyak 50 µl *nuclease-free water* ditambahkan ke dalam *SV minicolumn* dan

disentrifugasi (1 menit, 13.000 rpm). Hasil purifikasi dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml disimpan pada suhu -20° C.

Isolasi vektor ekspresi pYES2/CT dengan metode lisis alkali

Prosedur isolasi vektor ekspresi (plasmid) berdasarkan metode minipreparasi Lisis Alkali (Sambrook & Russell 2001). Sebanyak satu koloni bakteri *E. coli* DH5 α mengandung plasmid pYES2/CT diambil. Koloni tersebut kemudian diinokulasi ke dalam 5 ml medium cair SOB mengandung ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 μ g/ml. Kultur diinkubasi pada suhu 37° C kecepatan 200 rpm selama 12 sampai 16 jam dalam *shaking water bath incubator*.

Sebanyak 1,5 ml kultur dipindahkan ke mikrotube steril 1,5 ml. Kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4° C, supernatan dibuang. Pelet diresuspensi dengan 100 μ l larutan alkalin lisis 1 dingin kemudian campuran dihomogenkan dengan 200 μ l larutan segar larutan alkalin lisis 2 kemudian tabung dibolak-balik dan 150 μ l larutan dingin larutan alkalin lisis 3. Tabung dibolak-balik beberapa kali agar tercampur sempurna. Campuran disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit pada temperatur 4° C. Supernatan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus steril dan ditambahkan *RNase* 10 μ g/ml sebanyak 5 μ l, diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam. Supernatan ditambahkan dengan larutan fenol:kloroform (1:1) sebanyak 1 ml kemudian campuran divorteks agar tercampur sempurna dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4° C. Supernatan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus steril, ditambahkan etanol 96% dingin sebanyak 2 kali volume awal dan diinkubasi pada -20° C selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C, fase cair dibuang. Sebanyak 1 ml larutan etanol 70% ditambahkan ke dalam tabung, disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4° C, fase cair dibuang. Pelet dikeringkan di dalam desikator pada suhu 42° C selama 20 menit, setelah benar-benar kering ditambahkan sebanyak 50 μ l ddH₂O dan disimpan di suhu -20° C.

Digesti vektor ekspresi pYES2/CT dan produk PCR Menggunakan Enzim Restriksi *Bam* HI dan *Xba* I.

Pemotongan plasmid pYES2/CT dilakukan berdasarkan modifikasi metode Promega (2006). Volume akhir untuk setiap reaksi digesti adalah 10 μ l terdiri dari 1 μ l *Buffer Tango* 1X, 5 unit enzim *Bam* HI (10 unit/ μ l), 5 unit enzim *Xba* I (10 unit/ μ l), DNA (plasmid pYES2/CT atau produk PCR) dan ddH₂O disesuaikan hingga volume akhir mencapai 10 μ l. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril. Larutan tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam. Hasil reaksi digesti dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Fragmen DNA yang terdigesti diisolasi dari gel dan dipurifikasi menggunakan *Wizard[®] SV and PCR Clean-Up System* (Promega).

Pengukuran konsentrasi DNA

Pengukuran konsentrasi DNA berdasarkan Parakarn (1999) melalui perbandingan dari densitas fragmen DNA sampel dengan penanda DNA yang digunakan. Proses pengukuran konsentrasi DNA tersebut dibantu dengan *software* Bio1D (Vilber Lourmat).

Ligasi gen GOX dan vektor pYES2/CT

Ligasi gen GOX dan vektor pYES2/CT menggunakan enzim *T4 DNA ligase* berdasarkan metode Promega (2007). Reaksi ligasi dipersiapkan dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml steril dengan mencampurkan 10x *T4 DNA ligase buffer* (konsentrasi akhir 1x); DNA vektor pYES2/CT dan gen GOX yang telah didigesti dan dipurifikasi dengan rasio molar vektor:sisipan = 1:11 (DNA vektor sebanyak 3 μ l dan sisipan 32 μ l); 6 unit *T4 DNA ligase* (3 unit/ μ l); serta *nuclease-free water* steril atau ddH₂O disesuaikan hingga volume akhir reaksi mencapai 70 μ l. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit, lalu diinkubasi kembali pada suhu 16° C selama 16 jam.

Kontrol positif ligasi yaitu reaksi 10x *T4 DNA ligase buffer* (konsentrasi akhir 1x); vektor pYES2/CT (yang telah didigesti dengan *Bam* HI dan *Xba* I, serta dipurifikasi dari gel), 0,6 unit *T4 DNA ligase* (3 u/ μ l), serta *nuclease-free water* steril atau ddH₂O yang disesuaikan hingga volume akhir reaksi mencapai 10 μ l. Reaksi kontrol negatif ligasi sama dengan reaksi pada kontrol positif ligasi, namun *T4 DNA ligase* diganti dengan *nuclease-free water* steril dalam jumlah yang sama.

Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 α

Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 α dengan metode CaCl₂ dilakukan berdasarkan Sambrook & Russell (2001). Sebanyak satu koloni *E. coli* DH5 α diinokulasi ke dalam 5 ml medium SOB, diinkubasi pada suhu 37° C, kecepatan 150 rpm, selama 12—16 jam dalam *shaking water bath incubator*. Kultur yang telah diinkubasi ditentukan OD₆₀₀. Sebanyak 1,04 μ l kultur dimasukkan ke dalam 50 ml medium SOB, ditumbuhkan pada *shaker* suhu 37° C, selama 16 jam dengan kecepatan pengocokan 150 rpm, sampai mencapai OD₆₀₀ 0,35—0,55.

Seluruh kultur sel bakteri dipindahkan ke tabung sentrifugasi 50 ml, diinkubasi dalam kotak es (suhu 0° C) selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Pelet yang terbentuk dipisahkan dari supernatan, kemudian disuspensikan dengan 10 ml larutan buffer MgCl₂-CaCl₂ (80 mM:20 mM) dingin (Lampiran 1). Tabung dikocok perlahan agar larutan tercampur dengan pelet. Suspensi disentrifugasi kembali (4000 rpm, 10 menit, suhu 4° C), kemudian didekantasi. Pelet yang terbentuk disuspensikan dengan 2 ml larutan CaCl₂ 0,1 M dan 5—10% (150 μ l) *dimethyl sulfoxide* (DMSO), diinkubasi dalam es selama 10 menit. Kultur sel kompeten dipindahkan ke dalam beberapa tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml sebanyak 50—200 μ l. Sel kompeten *E. coli* dapat langsung digunakan untuk transformasi atau disimpan dalam lemari pendingin pada suhu -80° C.

Transformasi vektor ekspresi pYES2/CT dengan metode kejutan panas

Transformasi DNA plasmid ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α dilakukan dengan metode kejutan panas (Sambrook & Russell 2001). Sel kompeten ditambahkan 1 μ l DNA plasmid dengan konsentrasi 25—50 ng/ μ l dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml, kemudian diinkubasi dalam kotak es selama 30 menit. Tabung dipindahkan ke alat *heat block* dan diinkubasi pada suhu 42° C selama tepat 90 detik. Tabung langsung diinkubasi 10 menit dalam kotak es, kemudian ditambahkan 300 μ l medium SOC. Sel transforman diinkubasi pada *incubator shaker* suhu 37° C selama 45 menit dengan kecepatan rendah (100 rpm).

Penapisan (seleksi) sel *E. coli* DH5 α transforman dilakukan pada medium seleksi SOB mengandung ampisilin dibuat berdasarkan Sambrook & Russell (2001). Medium SOB agar untuk penapisan ditambahkan larutan ampisilin (konsentrasi akhir 100 μ g/ml). Sebanyak 50—100 μ l kultur sel transforman disebar di atas medium penapisan dan diratakan dengan spatel *drygalski*. Setelah kultur tersebar merata cawan petri ditutup dengan plastik *wrap* dan kultur diinkubasi pada temperatur ruang selama 15 menit agar meresap. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 12—16 jam dengan posisi cawan petri terbalik.

Kontrol positif dan negatif disertakan pada proses transformasi. Kontrol positif transformasi berupa kultur sel kompeten *E. coli* DH5 α yang disebar diatas medium nonseleksi (SOB agar tanpa ampisilin), sedangkan kontrol negatif transformasi berupa kultur sel kompeten *E. coli* DH5 α disebar diatas medium SOB ampisilin. Nilai efisiensi transformasi ditentukan dengan menghitung jumlah koloni transforman yang tumbuh, kemudian dimasukkan dalam persamaan efisiensi transformasi (Zhiming Tu *et al.* 2005).

Persamaan Efisiensi Transformasi

Efisiensi transformasi = jumlah koloni x rasio pengenceran x volume transformasi/ volume yang disebar

Verifikasi vektor rekombinan

Verifikasi digesti dengan *Bam* HI dan *Xba* I (*double digestion*)

Verifikasi digesti DNA vektor rekombinan sama seperti cara kerja digesti vektor ekspresi pYES2/CT. Kontrol verifikasi digesti disertakan bersamaan dengan verifikasi, yaitu berupa pYES2/CT utuh didigesti dengan enzim restriksi *Bam* HI dan *Xba* I. Hasil digesti divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarose 1% (b/v).

Verifikasi digesti dengan *Bam* HI

Verifikasi digesti *Bam* HI (*single digestion*) dilakukan apabila verifikasi digesti dengan *Bam* HI dan *Xba* I diperoleh hasil positif. Verifikasi dilakukan pada transforman kandidat plasmid rekombinan hasil pengklonaan yang telah diisolasi dengan metode lisis alkali. Komposisi campuran digesti dengan enzim *Bam* HI terdiri dari 3 µl DNA plasmid rekombinan, 0,5 µl enzim *Bam* HI, 1 µl 10x *buffer Bam* HI, dan 5,5 µl ddH₂O, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 3 jam. Kontrol verifikasi digesti disertakan, berupa plasmid pYES2/CT kosong didigesti dengan enzim *Bam* HI. Hasil digesti dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% menggunakan penanda DNA *1 kb Plus DNA ladder*.

Verifikasi dengan PCR

Verifikasi vektor rekombinan dengan metode PCR dilakukan apabila verifikasi digesti memberikan hasil positif. Reaksi PCR menggunakan *PCR SuperMix* (Invitrogen). Metode yang digunakan sama seperti PCR menggunakan *AccuPrimeTM Pfx Supermix*, namun DNA cetakan yang digunakan adalah DNA plasmid rekombinan telah diverifikasi digesti. Produk PCR diperoleh dianalisis dengan elektroforesis.

Sekuensing dan analisis sekuens

Sebelum disekuensing DNA dipurifikasi terlebih dahulu. Purifikasi DNA hasil elektroforesis gel agarose menggunakan *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* berdasarkan Promega (2004). Fragmen DNA hasil elektroforesis dikehendaki dipotong dan diisolasi dari gel yang telah diketahui bobotnya, ditempatkan dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Bobot potongan gel dihitung berdasarkan selisih bobot tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml berisi gel dan tabung kosong. Potongan gel tersebut kemudian ditambahkan 10 µl *membrane binding solution* untuk setiap 10 mg potongan gel. Campuran diinkubasi pada suhu 50—65° C dan sesekali divorteks hingga potongan gel terlarut sempurna.

Potongan gel terlarut dituang ke dalam *SV minicolumn* dan *collection tube*, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang, dan disentrifugasi (1 menit, 13.000 rpm). Cairan dalam *collection tube* dibuang, *collection tube* dipasang kembali dengan *SV minicolumn*. *Membrane wash solution* ditambahkan sebanyak 700 µl dan disentrifugasi kembali (1 menit, 13.000 rpm). Cairan dalam *collection tube* dibuang, lalu *collection tube* dipasang kembali dengan *SV minicolumn*. Pencucian dilakukan kembali dengan *membrane wash solution* sebanyak 500 µl dan disentrifugasi (5 menit, 13.000 rpm). Cairan dalam *collection tube* dibuang dan *SV minicolumn* dipindahkan ke atas tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Sebanyak 50 µl *nuclease-free water* ditambahkan ke dalam *SV minicolumn* dan disentrifugasi (1 menit, 13.000 rpm). Hasil DNA purifikasi disekuensing di Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT, Serpong. Reaksi sekuensing dilakukan berdasarkan metode *automated fluorescence sequencing* menggunakan mesin ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, 2000). Urutan nukleotida hasil sekuensing dibandingkan dengan database DNA pada GenBank melalui analisis BLASTN di situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, kemudian dilakukan pengecekan *open reading frame* (ORF), peptida dan *allignment* DNA hasil sekuensing dengan gen GOX dari *A. niger* NRRL-3 (Kriechbaum *et al.* 1989) menggunakan software *DNAstar*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Amplifikasi dan purifikasi gen GOX

Fragmen gen GOX sekitar 1.779 pb terlebih dahulu diamplifikasi dengan teknik PCR. Amplifikasi gen GOX bertujuan memperbanyak fragmen gen spesifik. Reaksi PCR yang dipisahkan melalui elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v) selama 30 menit dengan voltase 80 volt dan divisualisasikan dengan merendam gel dalam ethidium bromida (1 μ g/ml) berhasil mengamplifikasi fragmen gen GOX berukuran 1.779 pb secara spesifik (Gambar 1.1.1, lajur 1 & 2).



Gambar 1.1.1 Elektroforesis gel agarosa hasil PCR gen GOX *Aspergillus niger*

Proses PCR disertakan kontrol positif dan negatif. Kontrol positif berupa DNA plasmid kontrol dari kit *PCR Core System II* diamplifikasi dengan pasangan primer *upstream control* dan *downstream control* menghasilkan fragmen DNA berukuran 323 pb. Kontrol positif berfungsi untuk menunjukkan amplifikasi telah berlangsung dengan baik (Smith *et al.* 1997). Kontrol negatif merupakan campuran dari seluruh reagen PCR, tanpa DNA cetakan. Kontrol negatif berfungsi untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi pada reagen PCR. Hasil PCR memperlihatkan fragmen DNA berukuran sekitar 323 pb pada kontrol positif, sedangkan kontrol negatif tidak memperlihatkan adanya fragmen DNA

(Gambar 1.1.1, lajur 3 & 4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses PCR telah berhasil dilakukan dan menghasilkan gen target spesifik.

Keberhasilan amplifikasi gen GOX dapat dipengaruhi oleh konsentrasi komponen dalam reaksi PCR, antara lain enzim DNA polimerase, DNA cetakan, primer, kation divalen, kation monovalen, dNTP, *buffer*, serta kondisi reaksi PCR (Sambrook & Russell 2001). Reaksi PCR menggunakan AccuPrime™ *Pfx* SuperMix. Komponen PCR selain primer dan DNA cetakan telah tercampur di dalam AccuPrime™ *Pfx* SuperMix. AccuPrime™ *Pfx* SuperMix mengandung DNA polimerase *Pfx* yang memiliki ketelitian dan spesifitas tinggi karena mempunyai aktivitas *proofreading* 3' ke 5' (Invitrogen 2005).

Komponen PCR berupa primer yang digunakan dalam penelitian adalah GOX-F dan GOX-R. Primer GOX-F berukuran 30 pb, sedangkan GOX-R berukuran 29 pb. Primer GOX-F dan GOX-R mengandung sekuens gen target (gen GOX *Aspergillus niger*), sekuens enzim restriksi, serta daerah *flanking*. Kandungan GC dalam primer GOX-F dan GOX-R masing-masing sebesar 50 % dan 51,7 % sedangkan nilai *melting temperature* (T_m) sebesar 53,5° C dan 50,8° C. Menurut Abd-Elsalam (2003), selisih nilai T_m kedua primer tidak lebih besar dari 5° C dan berada pada kisaran 52—58° C.

Primer GOX-F dirancang dengan penambahan sekuens enzim restriksi *Bam* HI pada ujung 5', sedangkan GOX-R ditambahkan sekuens *Xba* I pada ujung 3'. Penambahan sekuens enzim restriksi *Bam* HI dan *Xba* I bertujuan menghasilkan potongan DNA berujung lengket (*sticky end*) pada DNA sisipan. Primer dirancang dengan penambahan daerah *flanking* (sekuens pYES2/CT) pada ujung 5' primer agar fragmen GOX hasil amplifikasi juga dapat disisipkan ke dalam pYES2/CT dan dapat diekspresikan oleh organisme eukariotik, salah satunya *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Invitrogen (2003), vektor pYES2/CT telah dimanipulasi secara genetik sehingga mampu mengekspresikan protein rekombinan dalam *S. cerevisiae* INVSc1. Penambahan sekuens pYES2/CT tidak mempengaruhi spesifisitas primer. Menurut Sambrook & Russell (2001), penambahan basa-basa yang tidak saling berkomplemen dengan DNA cetakan pada ujung 5' primer tidak mempengaruhi kespesifikan pelekatan suatu primer.

Konsentrasi cetakan gen GOX yang digunakan dalam PCR sebesar 131,73 ng/μl (Lampiran 1.5). Pengukuran seluruh konsentrasi sampel DNA selama penelitian dilakukan dengan metode perbandingan densitas dan menggunakan alat *software* Bio 1D. Menurut Sambrook & Russell (2001), pengukuran konsentrasi DNA yang lebih akurat adalah dengan membandingkan ketebalan (densitas) fragmen DNA sampel pada gel agarosa terhadap fragmen penanda DNA yang telah diketahui konsentrasinya. Langdon *et al.* (2003) melaporkan bahwa amplifikasi menggunakan AccuPrime™ Pfx Supermix hanya membutuhkan konsentrasi cetakan DNA rendah, yaitu 100 ng (untuk plasmid dan cDNA) sampai 100—200 ng (DNA genom).

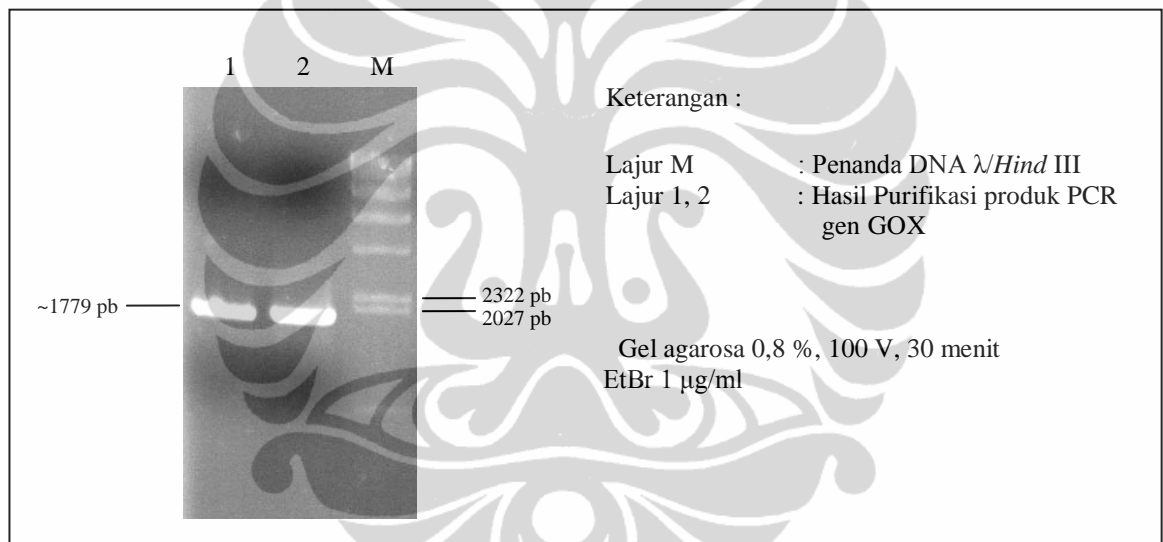
Proses PCR dalam penelitian dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94° C selama 5 menit. Denaturasi berikutnya dilakukan pada suhu 94° C selama 1 menit. Kondisi tahap denaturasi tersebut diperoleh berdasarkan hasil optimasi. Suhu denaturasi tergantung pada komposisi GC. Semakin tinggi kandungan GC, maka semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk memisahkan DNA untai ganda menjadi tunggal (Kramer & Coen 1998). Berdasarkan Sambrook & Russell (2001), waktu denaturasi untuk DNA linear tidak perlu terlalu lama karena dapat merusak DNA.

Tahap PCR selanjutnya yaitu *annealing*. Suhu *annealing* sebesar 59° C selama 1 menit dapat menghasilkan produk PCR optimal. Hasil optimasi suhu *annealing* tersebut masih berada dalam kisaran suhu *annealing* menurut Invitrogen (2004), yaitu 55—65° C. Suhu *annealing* yang optimal dapat meminimalkan perlekatan primer nonspesifik, meningkatkan jumlah produk PCR spesifik, dan mereduksi jumlah formasi primer-dimer (Sambrook & Russell 2001).

Hasil PCR yang optimal juga dipengaruhi oleh tahap polimerisasi. Suhu dan waktu dibutuhkan dalam tahap polimerisasi yaitu 72° C selama 2 menit dan disempurnakan pada suhu 72° C selama 5 menit. Menurut Kramer & Coen (1998), untuk mengamplifikasi 1 kb DNA dibutuhkan waktu polimerisasi (ekstensi) selama 1 menit. Kisaran suhu ekstensi yang dibutuhkan jika menggunakan enzim Taq polymerase adalah antara 72—78° C (Sambrook & Russell 2001).

Akurasi hasil PCR juga dipengaruhi oleh jumlah siklus. Jumlah siklus yang digunakan dalam proses amplifikasi yaitu sebanyak 30 siklus. Menurut Sambrook & Russell (2001), jumlah siklus yang optimal yaitu antara 30—35 siklus. Apabila jumlah siklus melebihi 35 siklus, maka akan diperoleh produk PCR yang tidak spesifik.

Fragmen DNA gen GOX ukurannya tepat kemudian dipurifikasi dengan kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System untuk menghilangkan sisa komponen PCR. Hasil purifikasi yang divisualisasi dengan elektroforesis menunjukkan pita tunggal berada di bawah pita berukuran 2.027 pb pada penanda λ Hind III, merupakan fragmen gen GOX berukuran sekitar 1.779 pb (Gambar 1.1.2, lajur 1 & 2).

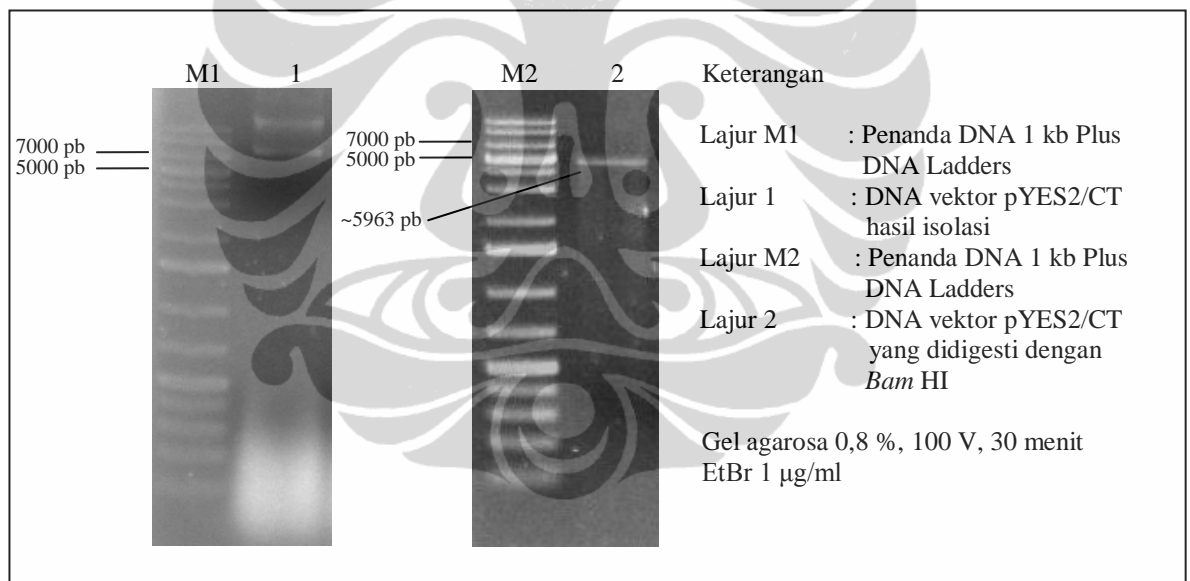


Gambar 1.1.2 Elektroforesis gel agarosa hasil purifikasi produk PCR gen GOX

Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses purifikasi berhasil dilakukan, karena gen GOX hasil purifikasi tidak terdegradasi dan tidak mengalami perubahan ukuran. Pita DNA hasil purifikasi terlihat lebih terang daripada pita hasil reaksi PCR. Penampakan yang relatif lebih terang menunjukkan bahwa proses purifikasi berhasil memurnikan fragmen DNA gen GOX dari pengotor berupa komponen PCR, protein, dan garam (Promega 2005).

2. Isolasi DNA vektor ekspresi pYES2/CT

Vektor pYES2/CT diperbanyak di dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α . Isolasi DNA menggunakan metode minipreparasi lisis alkali (Sambrook & Russell 2001). Plasmid pYES2/CT hasil isolasi digunakan sebagai vektor yang akan disisipkan gen GOX pada proses ligasi. Visualisasi elektroforesis plasmid pYES2/CT hasil isolasi menunjukkan dua pita DNA sejajar dengan penanda *1 kb Plus DNA Ladder*. Satu pita berada diantara 10.000—20.000 pb dan satu pita lain berada diantara 5.000—7.000 pb (Gambar 1.2.1, lajur 1). Plasmid yang telah didigesti dengan enzim *Bam* HI menunjukkan pita DNA tunggal berukuran 5.963 pb (Gambar 1.2.1, lajur 2). Berdasarkan hasil visualisasi dapat disimpulkan bahwa plasmid pYES2/CT telah berhasil diisolasi dari sel bakteri *E. coli* DH5 α dengan ukuran tepat, yaitu 5.963 pb.



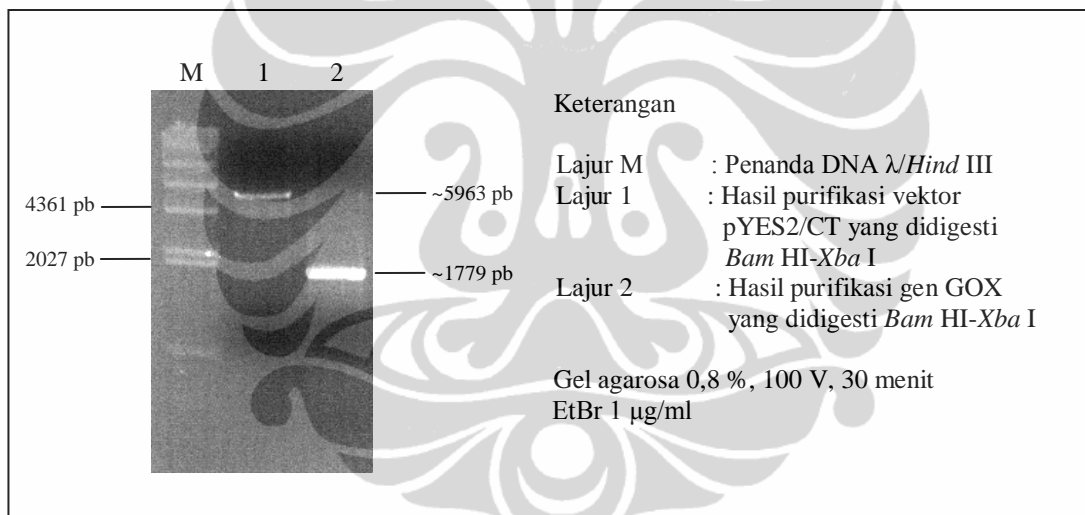
Gambar 1.2.1 Elektroforesis gel agarosa hasil isolasi plasmid pYES2/CT

Menurut Dale & von Schantz (2007), plasmid hasil isolasi yang belum didigesti dapat memiliki 3 konformasi, antara lain nicked (*open circular*), linear dan supercoiled. Plasmid hasil isolasi memiliki konformasi *nicked* karena kemungkinan salah satu untai DNA terpotong akibat perlakuan enzimatik atau mekanis. Konformasi DNA tersebut bermigrasi paling lambat sehingga pita DNA tampak berada di bagian atas gel. Plasmid pYES2/CT telah berhasil diisolasi

selanjutnya didigesti dengan enzim *Bam* HI dan *Xba* I (*double digestion*) sebelum diligasikan dengan sisipan gen GOX.

3. Digesti produk PCR sebagai sisipan dan pYES2/CT sebagai vektor

Produk PCR (gen GOX) sebagai sisipan dan pYES2/CT sebagai vektor kloning didigesti secara terpisah dengan kondisi dan menggunakan enzim restriksi *Bam* HI dan *Xba* I (*double digestion*). Hasil digesti dan purifikasi kedua komponen tersebut divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v). Hasil digesti vektor ekspresi pYES2/CT memperlihatkan terbentuknya fragmen DNA tunggal berukuran sekitar 5.963 pb, sedangkan hasil digesti produk PCR terbentuk fragmen DNA berukuran sekitar 1.779 pb (Gambar 1.3.1, lajur 1 & 2).



Gambar 1.3.1 Elektroforesis gel agarosa hasil purifikasi vektor serta sisipan didigesti dengan *Bam* HI dan *Xba* I

Konsentrasi DNA hasil purifikasi ditentukan berdasarkan perbandingan intensitas pita DNA pada hasil elektroforesis. Konsentrasi fragmen gen GOX hasil purifikasi adalah 131,73 ng/ μ l, sedangkan konsentrasi plasmid pYES2/CT 39,68 ng/ μ l (Lampiran 1.5).

Digesti merupakan tahap yang penting dalam tehnik pengklonaan. *Double digestion* dengan *Bam* HI dan *Xba* I terdapat pada daerah MCS vektor ekspresi pYES2/CT. Hasil digesti *Bam* HI dan *Xba* I menghasilkan potongan ujung

lengket (*sticky-end*) (Winfrey *et al.* 1997). Digesti DNA sisipan dan vektor oleh dua enzim restriksi berbeda bersifat *sticky end* akan menghasilkan kondisi *directional cloning* (Sambrook & Russell 2001). Strategi *directional cloning* dapat meningkatkan efisiensi dan mencegah DNA sisipan terligasi dengan arah tidak tepat. Kontrol disertakan pula pada reaksi *double digestion*, yaitu plasmid pYES2/CT didigesti dengan salah satu enzim (*Bam* HI atau *Xba* I). Pita yang terbentuk pada kontrol merupakan pita tunggal, menunjukkan bahwa kedua enzim berhasil memotong vektor dengan baik pada kondisi reaksi dan *buffer* yang digunakan.

Produk PCR dan vektor pYES2/CT masing-masing dapat didigesti secara *double digestion* dengan *Bam* HI dan *Xba* I. Berdasarkan Fermentas (2006), *Bam* HI dan *Xba* I dapat bereaksi secara optimal pada suhu yang sama (37° C) dan dapat diinaktivasi pada kondisi sama yaitu 80° C selama 20 menit. *Double digestion* disarankan menggunakan *buffer* Tango™ dengan konsentrasi akhir 1x karena menghasilkan persentase aktivitas enzim restriksi optimal (100% untuk *Bam* HI dan *Xba* I).

Proses digesti berjalan sempurna diperoleh dari hasil optimasi komposisi reaksi digesti. Kesulitan sering terjadi yaitu hasil visualisasi elektroforesis hasil digesti vektor plasmid pYES2/CT terlihat dua pita DNA berarti DNA belum terdigesti secara sempurna. Hal tersebut terjadi karena komposisi reaksi digesti kurang optimal sehingga harus dilakukan proses optimasi komposisi reaksi digesti.

4. Pembuatan sel kompeten

E. coli DH5α yang digunakan sebagai sel inang dalam pengklonaan terlebih dahulu dibuat kompeten. Kualitas sel kompeten diketahui dengan menghitung efisiensi transformasi. Perhitungan efisiensi transformasi sel kompeten *E. coli* DH5α berdasarkan Zhiming Tu *et al.* (2005) (Lampiran 1.7).

Menurut Sambrook & Russell (2001), *E. coli* DH5α termasuk strain umum digunakan untuk tujuan kloning karena menghasilkan efisiensi

transformasi cukup tinggi dan stabil. Perbedaan strain *E. coli* dan metode pembuatan sel kompeten dapat menghasilkan nilai efisiensi transformasi berbeda.

Sel kompeten DH5 α dibuat berdasarkan metode CaCl₂ (Sambrook & Russell 2001). Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 α diawali dengan melakukan peremajaan stok sel bakteri dengan menumbuhkan pada medium SOB agar dan menginkubasi pada suhu 37° C selama 16 jam.

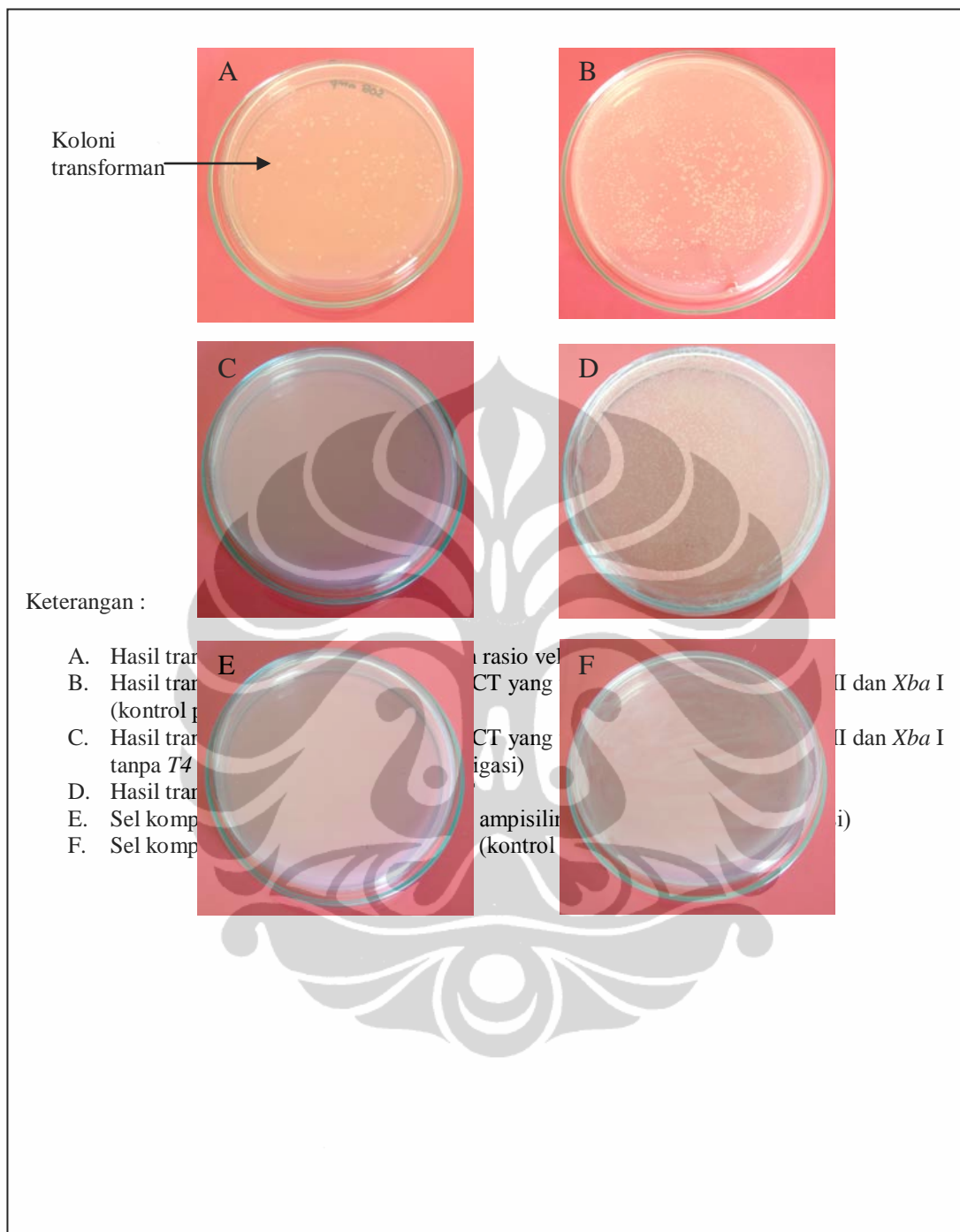
Sebanyak 4—5 koloni *E. coli* DH5 α hasil peremajaan selanjutnya diinokulasikan pada SOB cair dan diinkubasi pada suhu 37° C. Pertumbuhan sel diamati dengan pembacaan densitas optik (OD) pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀), sampai mencapai nilai 0,35—0,55. Efisiensi transformasi yang tinggi terpenuhi saat sel berjumlah kurang dari 10⁸ sel/ml, yaitu saat sel berada pada fase log awal sampai dengan pertengahan atau antara OD₆₀₀ 0,4 (Sambrook & Russell 2001). Zhiming Tu *et al.* (2005) melaporkan bahwa setiap strain berbeda memiliki karakteristik pertumbuhan berbeda pula. Bakteri *E. coli* XL1 blue tumbuh optimal pada OD₆₀₀ 0,15—0,45, *E. coli* TG1 pada OD₆₀₀ 0,2—0,5 dan *E. coli* DH5 α pada OD₆₀₀ 0,145—0,45.

Sel kompeten *E. coli* DH5 α dipersiapkan untuk stok dan digunakan larutan MgCl₂ dan CaCl₂. Penambahan kation berupa kalsium, mangan dan magnesium pada larutan dalam pembuatan sel kompeten diketahui dapat mempengaruhi transformasi *E. coli*. Pembuatan sel kompeten menggunakan dimethyl sulfoxide (DMSO) dengan konsentrasi 10%. Penggunaan DMSO dengan konsentrasi 10—15% dapat mengurangi pembentukan kristal es intraselular dan mencegah meningkatnya tekanan osmotik di luar sel. Konsentrasi DMSO terlalu tinggi dapat bersifat toksik bagi sel. Penggunaan DMSO dalam pembuatan sel kompeten diketahui juga dapat meningkatkan efisiensi transformasi (Zhiming Tu *et al.* 2005).

Pembuatan sel kompeten dilakukan pada suhu dingin (sekitar 0° C) karena larutan sebelumnya diinkubasi di dalam es diketahui dapat menghasilkan efisiensi transformasi yang diharapkan. Inkubasi *E. coli* dan *buffer* pada suhu 0° C merupakan tahap penting untuk meningkatkan efisiensi transformasi (Sambrook & Russell 2001).

5. Ligasi

Produk PCR dan vektor ekspresi pYES2/CT yang telah didigesti selanjutnya diligasi dengan enzim *T4 DNA ligase*. Konsentrasi DNA produk PCR dan vektor ekspresi pYES2/CT diukur menggunakan pembanding penanda λ /*Hind* III dengan fasilitas *software* Bio 1D (Lampiran 1.5). Perhitungan rasio molar reaksi ligasi dapat dilihat pada Lampiran 1.6. Hasil ligasi tidak dapat divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa karena keterbatasan konsentrasi akhir DNA pada reaksi ligasi. Oleh karena itu, untuk mengetahui keberhasilan ligasi dilakukan transformasi dan seleksi pada medium SOB ampisilin (Gambar 1.5.1).



Gambar 1.5.1 Hasil transformasi hasil ligasi pYES2/CT dan gen GOX.

Kondisi reaksi ligasi optimal diperoleh berdasarkan hasil optimasi pendahuluan, yaitu pada suhu 16° C selama 16 jam dan ditunjukkan dengan adanya koloni yang tumbuh pada medium seleksi ampisilin. Menurut Promega (2007), kedua molekul DNA berujung kohesif dapat diligasi pada suhu 12—16°

C. Reaksi ligasi pada saat kloning juga disertakan kontrol negatif ligasi. Kontrol negatif ligasi tidak memperlihatkan pertumbuhan koloni mengindikasikan reaksi digesti berjalan sempurna.

Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan ligasi adalah rasio molar vektor dan sisipan. Menurut Promega (2007), rasio molar vektor dan sisipan umum digunakan yaitu 1:1, 1:3 atau 3:1. Berdasarkan optimasi, rasio molar vektor dan sisipan tersebut tidak membuat gen GOX dan pYES2/CT terligasi. Hasil selanjutnya menunjukkan bahwa rasio molar vektor dan sisipan yang optimal yaitu 1:11 (Lampiran 1.6). Menurut Davis *et al.* (1994), konsentrasi rasio DNA vektor dan sisipan yang tinggi dapat meningkatkan probabilitas ligasi antara kedua fragmen tersebut dan mengurangi terjadinya resirkularisasi vektor.

Proses ligasi antara gen GOX dan pYES2/CT berhasil dilakukan pada suhu 16° C selama 16 jam dengan indikasi adanya pertumbuhan koloni. Hasil ligasi kemudian ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α . Hasil ligasi vektor ekspresi pYES2/CT dan produk PCR (gen GOX) diintroduksi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α melalui transformasi dengan kejutan panas (*heat shock*) dan ditumbuhkan pada medium seleksi SOB ampisilin. Efisiensi transformasi yang didapatkan pada saat kloning yaitu 4,8 x 10⁵ cfu/ μ g (Lampiran 1.7). Bakteri *E. coli* DH5 α diketahui dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37° C. Hasil transformasi optimal menggunakan sel kompeten *E. coli* DH5 α diperoleh jika kejutan panas dilakukan dari suhu 0° C ke suhu 42° C selama 90 detik. Kejutan panas merupakan tahap penting dalam transformasi. Kemungkinan molekul DNA asing yang telah menempel pada dinding sel kompeten terintroduksi ke dalam sitoplasma dengan pemberian kejutan panas (Brown 1995). Sel transforman yang telah diberikan kejutan panas dikultur pada medium pengayaan SOC tanpa ampisilin agar sel cepat pulih dan plasmid dapat mengekspresikan gen resistensi antibiotik (Ausubel *et al.* 1995).

Kultur *E. coli* DH5 α hasil transformasi disebar di atas medium SOB agar mengandung ampisilin. Koloni tumbuh pada medium ampisilin hanya sel bakteri yang berhasil mentransformasi plasmid pYES2/CT karena plasmid membawa sifat resistensi ampisilin terhadap sel. Kontrol positif dan negatif berupa sel kompeten tanpa penambahan DNA disertakan dalam transformasi. Seluruh sel

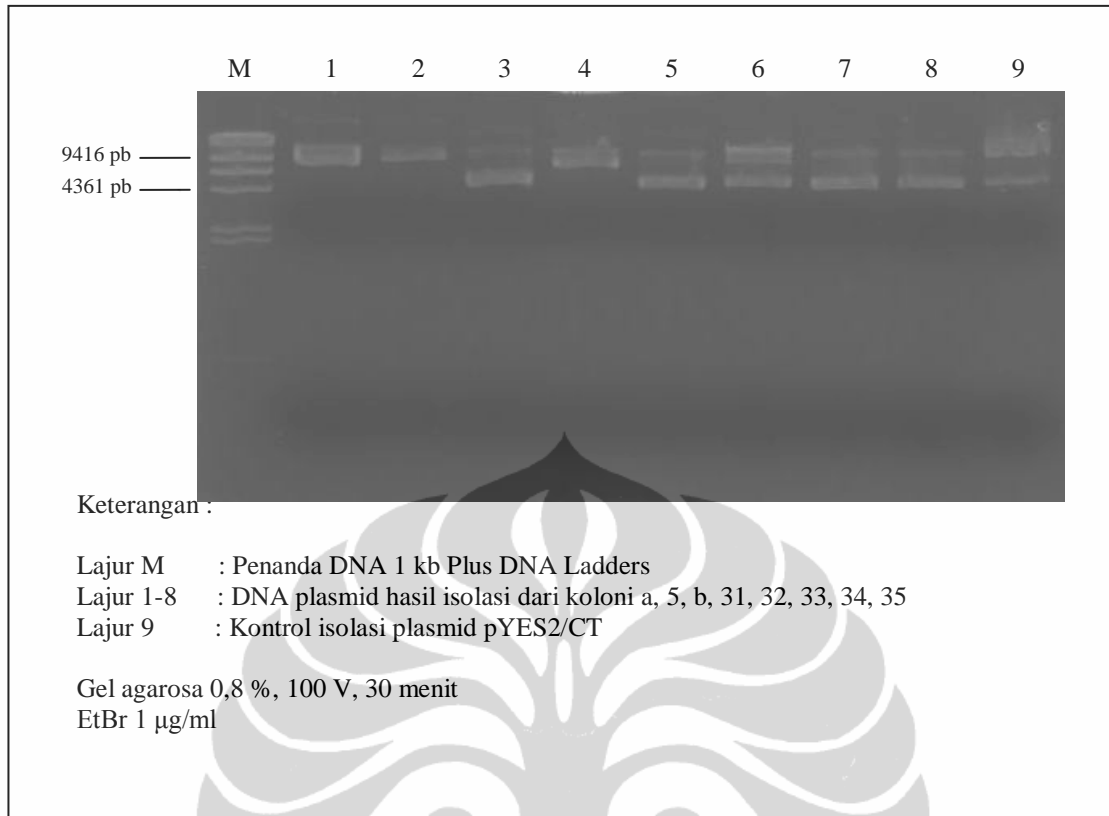
tumbuh pada kontrol positif, sedangkan tidak terdapat pertumbuhan pada kontrol negatif. Kontrol positif disebar diatas medium SOB tanpa ampisilin untuk melihat kemampuan tumbuh sel kompeten. Kontrol negatif disebar pada medium ampisilin untuk melihat kemungkinan terjadi kontaminasi pada sel kompeten atau pada proses transformasi (Sambrook & Russell 2001). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sel kompeten berhasil tumbuh dengan baik pada medium SOB, serta tidak terjadi kontaminasi.

6. Seleksi dan verifikasi plasmid rekombinan pYES-GOX

6.1. Seleksi dan isolasi kandidat plasmid rekombinan

Bakteri *E. coli* DH5 α yang telah ditransformasi dengan DNA rekombinan hasil ligasi, kemudian diseleksi dengan medium seleksi SOB ampisilin. Koloni yang tumbuh pada cawan hasil ligasi dengan rasio molar vektor:sisipan (1:11) berjumlah 163 koloni, pada kontrol positif ligasi 704 koloni, sedangkan tidak terdapat koloni pada kontrol negatif ligasi (Gambar 1.5.1). Enam belas kandidat koloni rekombinan dipilih secara acak dari 163 koloni yang tumbuh kemudian diisolasi dengan metode lisis alkali.

Visualisasi elektroforesis gel agarosa 0,8% menunjukkan 3 lajur terdapat pita DNA plasmid hasil isolasi dengan perbedaan pola migrasi lebih tinggi dibandingkan dengan pola migrasi pita DNA pYES2/CT (Gambar 1.6.1.1, lajur 1, 2 dan 4 yaitu koloni a, 5 dan 31).



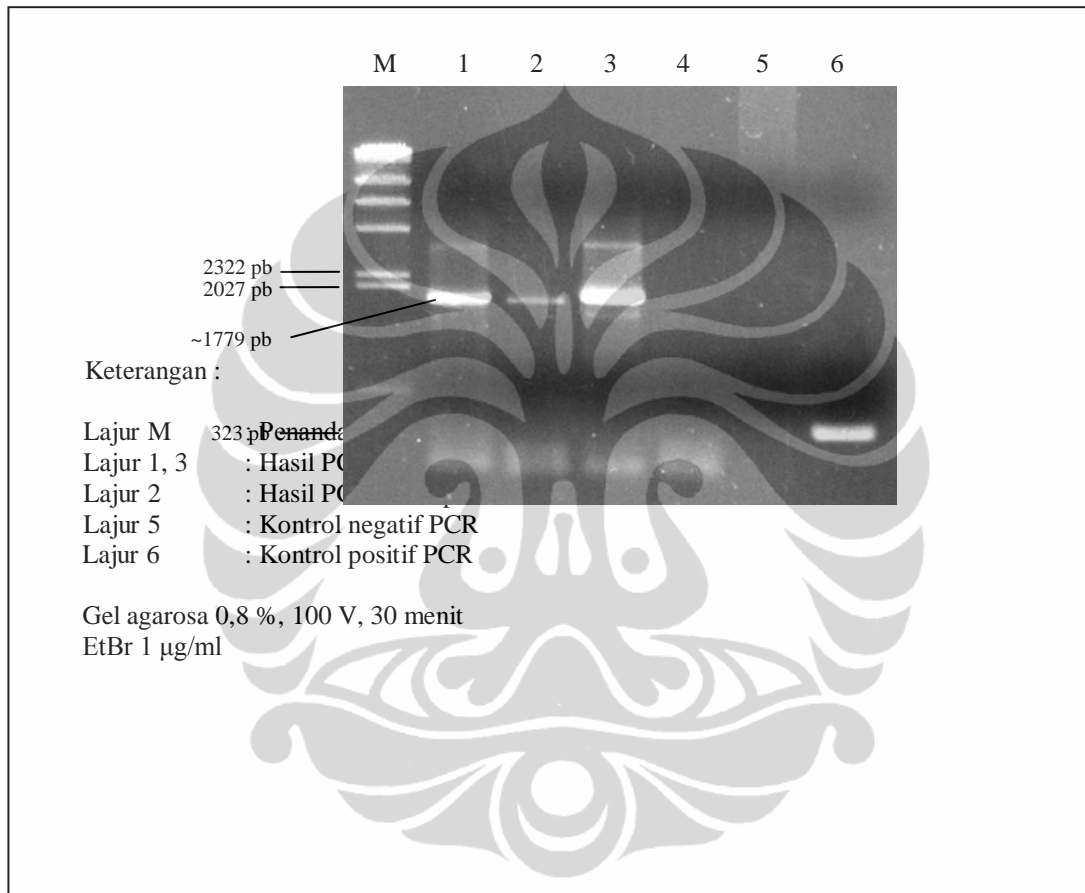
Gambar 1.6.1.1 Elektroforesis gel agarosa hasil isolasi kandidat plasmid rekombinan

Plasmid yang diisolasi dari koloni a, 5 dan 31 tersebut diduga merupakan plasmid rekombinan pYES-GOX kemudian diverifikasi lebih lanjut dengan PCR dan *single digestion*.

Plasmid rekombinan perlu dianalisis lebih lanjut setelah diisolasi untuk mengetahui ukuran yang tepat. Menurut Brown (1995), ukuran pita DNA plasmid hasil isolasi yang tepat belum dapat ditentukan sebelum melakukan *single digestion*. Plasmid hasil isolasi lainnya memiliki pita DNA dengan posisi pita utama lebih rendah daripada plasmid a, 5 dan 31 tidak dianalisis lebih lanjut karena diduga plasmid tersebut merupakan plasmid pYES2/CT tidak mengandung sisipan ataupun merupakan plasmid pYES2/CT mengalami religasi. Sebagian vektor plasmid pYES2/CT kemungkinan akan mengalami religasi karena proses digesti berlangsung kurang sempurna. Vektor juga dapat mengalami ligasi dengan molekul vektor lainnya sehingga membentuk vektor dimer (Dale & von Schantz 2007).

6.2. Verifikasi plasmid rekombinan

Verifikasi kandidat koloni yang membawa plasmid rekombinan pYES-GOX yaitu koloni 5 dan 31 dilakukan dengan metode PCR. Hasil elektroforesis verifikasi plasmid 5 dan 31 dengan PCR menunjukkan pita DNA gen GOX berukuran sekitar 1.779 pb (Gambar 1.6.2.1, lajur 1).

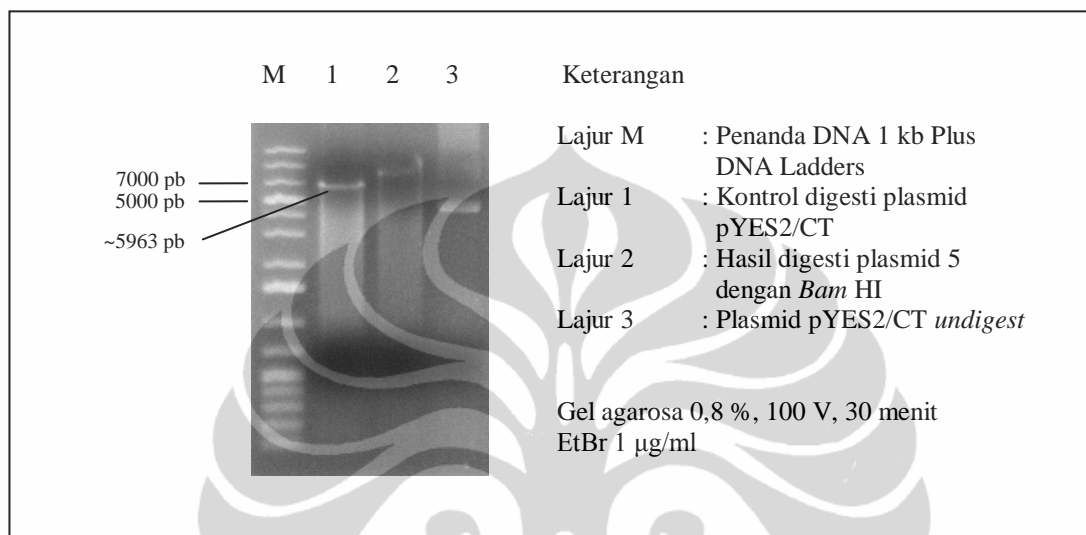


Gambar 1.6.2.1 Elektroforesis gel agarosa hasil verifikasi PCR DNA plasmid rekombinan

Hasil produk PCR tampak kurang spesifik, karena selain pita DNA berukuran 1.779 pb juga terbentuk *unexpected band*. Hal tersebut dapat disebabkan karena primer tidak menempel secara spesifik pada DNA cetakan. Untuk mengatasi hal tersebut perlu dilakukan optimasi suhu penempelan primer pada cetakan plasmid 5. Hasil kontrol positif dan negatif PCR menunjukkan

bahwa reaksi PCR plasmid rekombinan berlangsung baik dan tidak terjadi kontaminasi (Gambar 1.6.2.1, lajur 5 dan 6).

Selanjutnya dipilih koloni 5 untuk verifikasi dengan *single digestion Bam* HI. Verifikasi plasmid 5 dengan *single digestion Bam* HI menunjukkan pita DNA linear tunggal berukuran 7.742 pb (Gambar 1.6.2.2, lajur 2).



Gambar 1.6.2.2 Elektroforesis gel agarosa hasil verifikasi digesti DNA plasmid rekombinan dengan *Bam* HI

Berdasarkan hasil verifikasi kandidat rekombinan dengan PCR dan *single digestion*, dapat disimpulkan bahwa plasmid koloni 5 merupakan koloni positif rekombinan membawa gen GOX.

Klona plasmid 5 diverifikasi lebih lanjut dengan metode sekuensing. Verifikasi sekuensing dilakukan untuk mengetahui apabila terjadi perubahan basa nitrogen selama proses amplifikasi dengan PCR ataupun pengklonaan dan memastikan ketepatan orientasi penyisipan gen GOX pada plasmid pYES2/CT. Hasil sekuensing berupa elektroferogram dapat dilihat pada Lampiran 1.8. Sekuens GOX dianalisis lebih lanjut dengan program BLASTN.

Hasil analisis sekuens gen GOX dengan program BLASTN menunjukkan bahwa hasil pengklonaan memiliki *similarity* 99% dengan sekuens *Aspergillus niger glucose oxidase mRNA, complete cds* (accession number J05242.1) (Lampiran 1.9). Hasil *alignment* sekuens klona yang diperoleh terhadap sekuens *Aspergillus niger glucose oxidase mRNA, complete cds* (accession number

Struktur kristal GOX dari *A. niger* meliputi residu asam amino, kofaktor FAD, residu N-asetilglukosamin, residu manosa dan molekul-molekul pelarut (Lampiran 1.12). Enzim GOX merupakan homodimer, mengandung satu ikatan kuat dengan flavin adenin dinukleotida (FAD) per monomer sebagai kofaktor. Setiap monomer GOX memiliki dua domain yang berbeda : satu domain yang terikat pada molekul FAD, dan domain lain yang mengikat substrat β -D-*glucose*. Domain yang mengikat substrat dibentuk dari segmen sekuens *non-continuous* dan ditandai oleh kantong yang dalam. Satu sisi dari kantong ini dibentuk oleh lapisan antiparalel enam β -*sheet* dengan sistem cincin flavin FAD terletak di bagian bawah kantong di sisi yang berlawanan (Hecht *et al.* 1993a).

Enzim GOX memiliki domain dari famili *Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase* (Lampiran 1.13). Domain pertama meliputi residu asam amino ke 1—143; 228—322; 531—583 sedangkan domain kedua meliputi residu asam amino ke 144—227; 323—530.

Hasil analisis menggunakan BLASTN dan DNASTAR menunjukkan bahwa penelitian pengklonaan gen GOX berhasil dilakukan. Klona rekombinan merupakan koloni bakteri *E.coli* DH5 α yang membawa vektor ekspresi pYES2/CT dengan sisipan gen GOX yang mengalami mutasi delesi pada nukleotida ke 1776 sehingga klona ini mengalami perubahan kerangka baca pada asam amino ke 582—587 (prolin, sistein, serin, glutamat, fenilalanin, stop) terhadap sekuens GOX *A. niger* NRRL-3 (serin, metionin, glutamin, stop). Mutasi delesi yang terjadi pada klona GOX berada pada domain pertama (residu asam amino ke 582). Karena mutasi berada pada domain yang tidak berfungsi untuk mengikat substrat β -D-*glucose* diharapkan enzim GOX tetap aktif (Hecht *et al.* 1993a).

Mutasi tersebut menyebabkan gen GOX tidak terekspresikan sebagai protein fusi dengan *polyhistidine* sehingga protein yang terekspresi tidak dapat dipurifikasi menggunakan histidin epitop. Akan tetapi karena gen tersebut tepat berada pada ORF maka plasmid rekombinan pYES-GOX dapat diekspresikan pada *Sacharomyces cereviceae* untuk memperoleh protein rekombinan GOX spesifik sebagai bahan dasar pembuatan biosensor glukosa.

KESIMPULAN

Gen GOX dari *Aspergillus niger* telah berhasil diklona ke dalam *Escherichia coli* DH5 α dengan menggunakan vektor pYES2/CT. Hasil analisis sekuens menunjukkan bahwa klona GOX berada pada *Open Reading Frame* yang tepat dan terdapat mutasi delesi pada nukleotida ke 1767 sehingga klona merupakan mutasi *frameshift* dimulai pada asam amino ke 582—587 terhadap sekuens GOX *A. niger* strain NRRL-3 yang menjadi referensi pengklonaan. Mutasi delesi terdapat pada domain yang tidak berfungsi untuk mengikat substrat β -D-*glucose* sehingga enzim GOX diperkirakan akan tetap aktif. GOX yang terklona ke dalam pYES2/CT dapat diekspresikan, namun tidak akan terekspresikan sebagai protein fusi GOX-His₆. Hasil BLASTN tetap menunjukkan homologi yang tinggi terhadap sekuens GOX strain *A. niger* lainnya seperti sebesar 99% homologi dengan sekuens *Aspergillus niger glucose oxidase* mRNA complete cds (*accession number* J05242.1).

SARAN

Perlu dilakukan pengujian ekspresi GOX rekombinan ke dalam *Saccharomyces cerevisiae*. Diharapkan di masa datang klona GOX rekombinan dapat berfusi dengan *polyhistidine* sehingga proses purifikasi dapat dilakukan dengan metode histidin kromatografi untuk memperoleh GOX rekombinan dengan kemurnian tinggi.

DAFTAR ACUAN

- Abd-Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*. **2**(5): 91—95 hlm.
- Applied Biosystems. 2000. *Automated DNA sequencing: Chemistry guide*. Applera Corporation, Foster City: 246 hlm.
- Atun, M. 2010. *Diabetes Melitus*. Kreasi Wacana, Bantul: v + 150 hlm.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, L.M. Albright, D.M. Coen, A. Varki & K. Jamsen. 1995. *Current protocol in molecular biology*. 2nd ed. John Wiley & Sons Inc, Massachusetts: xxiv + 1.01—9.17.3 hlm.
- Brown, T.A. 1995. *Gene cloning: An introduction*. 3rd ed. Chapman & Hall, Manchester: vii + 333 hlm.
- Crognale, S., V. Pulci, V. Brozzoli, M. Petruccioli & F. Federici. 2006. Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**(6): 1230—1235 hlm.
- Cullen, D. 2007. The genome of an industrial workhorse. Sequencing of the filamentous fungus *Aspergillus niger* offers new opportunities for the production of specialty chemicals and enzymes. *Nature Biotechnology*. **25**(2): 189—190 hlm.
- Dale, J.W. & M. von Schantz. 2007. *From genes to genomes : Concepts and applications of DNA technology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester: xii + 360 hlm.
- Davis, L.G., W.M. Kuehl & J.F. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwalk: xiv + 777 hlm.
- Desriani. 2003. PQQGDH (*Piroloquinoline Quinone Glucose Dehidrogenase*) sebagai biosensor glukosa pada pengobatan diabetes mellitus. *Disertasi*. Program Pascasarjana/S3, Institut Pertanian Bogor. 7 hlm.
- Fermentas. 2006. *Restriction enzymes*. Fermentas, 20 Harbour Drive: 2 hlm.
- Frederick, K.R., J. Tung, R.S. Emerick, F.R. Masiarz, S.H. Chamberlain, A. Vasavada & S. Rosenberg. 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*.

- Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *Biological chemistry*. **265**(7): 3793—3802 hlm.
- Hall, B. 2001. *Phylogenetic trees made easy*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland: xii + 179 hlm.
- Hecht, H.J., H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid & D. Schomburg. 1993a. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. **229**(1): 153—172 hlm.
- Hecht, H.J., D. Schomburg, H. Kalisz & R.D. Schmid. 1993b. The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. *Biosensors & Bioelectronics*. **8**(3-4): 197—203 hlm.
- Invitrogen. 2003. *pYES2/CT, pYES3/CT, and pYC2/CT yeast expression vectors with C-terminal tags and auxotrophic selection markers*. Invitrogen Corp., California: 31 hlm.
- Invitrogen. 2004. *AccuPrime™ Pfx SuperMix usage information*. Invitrogen Corp., California: 4 hlm.
- Invitrogen. 2005. *Catalog 2005 : Life sciences research products and services*. Invitrogen Corp., California: xv + 736 hlm.
- Kramer, M.F. & D.M. Coen. 1998. The polymerase chain reaction. *Dalam*: Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.M. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Sthrel (eds.). 1998. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York: 15.0.3—15.1.15.
- Kriechbaum, M., H.J. Heilmann, F.J. Wientjes, M. Hahn, K.D. Jany, H.G. Gassen, F. Sharif & G. Alaeddinoglu. 1989. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *Elsevier Science Publishers Biomedical Division*. **255**(1): 63—66 hlm.
- Langdon, M., K. Park & J. Lee. 2003. AccuPrime™ Pfx SuperMix: The robust high-fidelity PCR platforms. *Focus*. **25**(3): 18—21.
- Mozaz, S.R., M.P. Marco, M.J. Lopez de Alda & D. Barcelo. 2004. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Applied Chemistry*. **76**(4): 723—752 hlm.

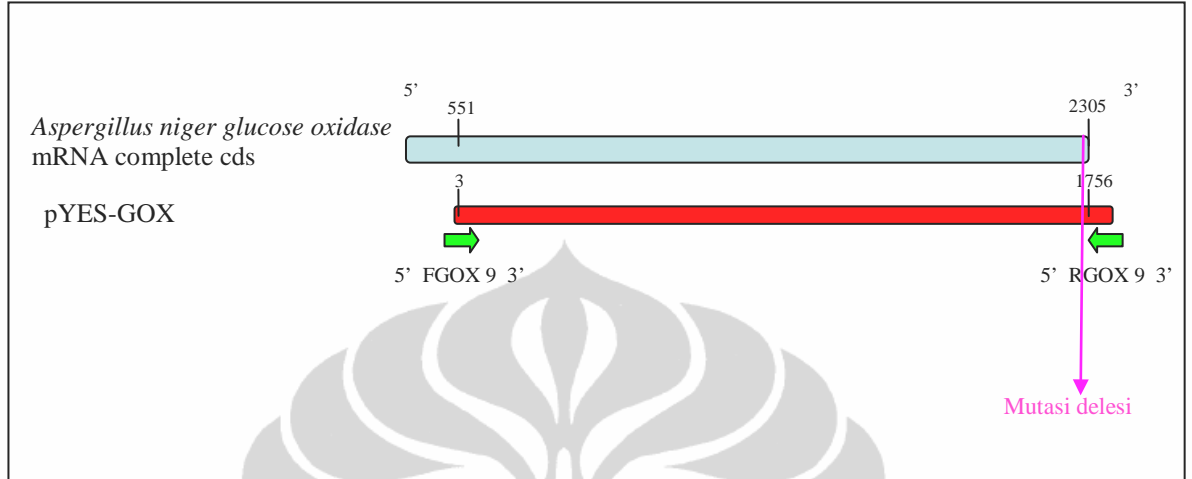
- Parakarn, J. 1999. Measuring DNA concentration. 4 hlm.
<http://www.msu.ac.th/bio-dept/measure-DNA.htm>, 10 Oktober 2008, pk.
10.15 WIB.
- Promega. 2004. *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System*. Promega Corp.,
Madison: 11 hlm.
- Promega. 2005. Technical bulletin : *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System
instructions for use of products A9280, A9281 and A9282*. Promega Corp.,
Madison: 12 hlm.
- Promega. 2006. *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System*. Promega
Corp., Madison: 17 hlm.
- Promega. 2007. *T4 DNA ligase usage information*. Promega Corp., Madison: 2
hlm.
- Pulci, V., R. D'Ovidio, M. Petruccioli & F. Federici. 2004. The glucose oxidase
of *Penicillium variabile* P16: gene cloning, sequencing and expression.
Applied Microbiology. **38**(3): 233—238 hlm.
- Queen-Baker, J. 2000. *The transformation lab : Experiment using E. coli and
pFluoroGreen*. MdBioLab. 19 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*.
Volume 1—3. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York:
xxvii + 18.136 + A.14.1 + R.22 + I.44 hlm.
- Smith, R., D. Kephart & G. Kobs. 1997. PCR core system : Complete reagent
systems for DNA amplification. *Promega Notes Magazine*. **62**: 5—8 hlm.
- Winfrey, M.R., M.A. Rott & A.T. Wortman. 1997. *Unraveling DNA: Molecular
biology for the laboratory*. Prentice Hall, Upper Saddle River: xxviii + 369
hlm.
- Witarto, A.B. 2000. From bench to business: The story of glucose sensor.
Proceedings of the 9TH Scientific Meeting (Temu Ilmiah TI-IX PPI 2000).
5—8 hlm.
- Witt, S., M. Singh & H.M. Kalisz. 1998. Structural and kinetic of nonglycosylated
recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in
Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(4): 1405—
1411 hlm.

Zhiming Tu., Guangyuan He, K.X. Li, M.J. Chen, Junli Chang, Ling Chen, Qing Yao, D.P. Liu, Huan Ye, Jiantao Shi & Xuqian Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. **8**(1): 114—120 hlm.

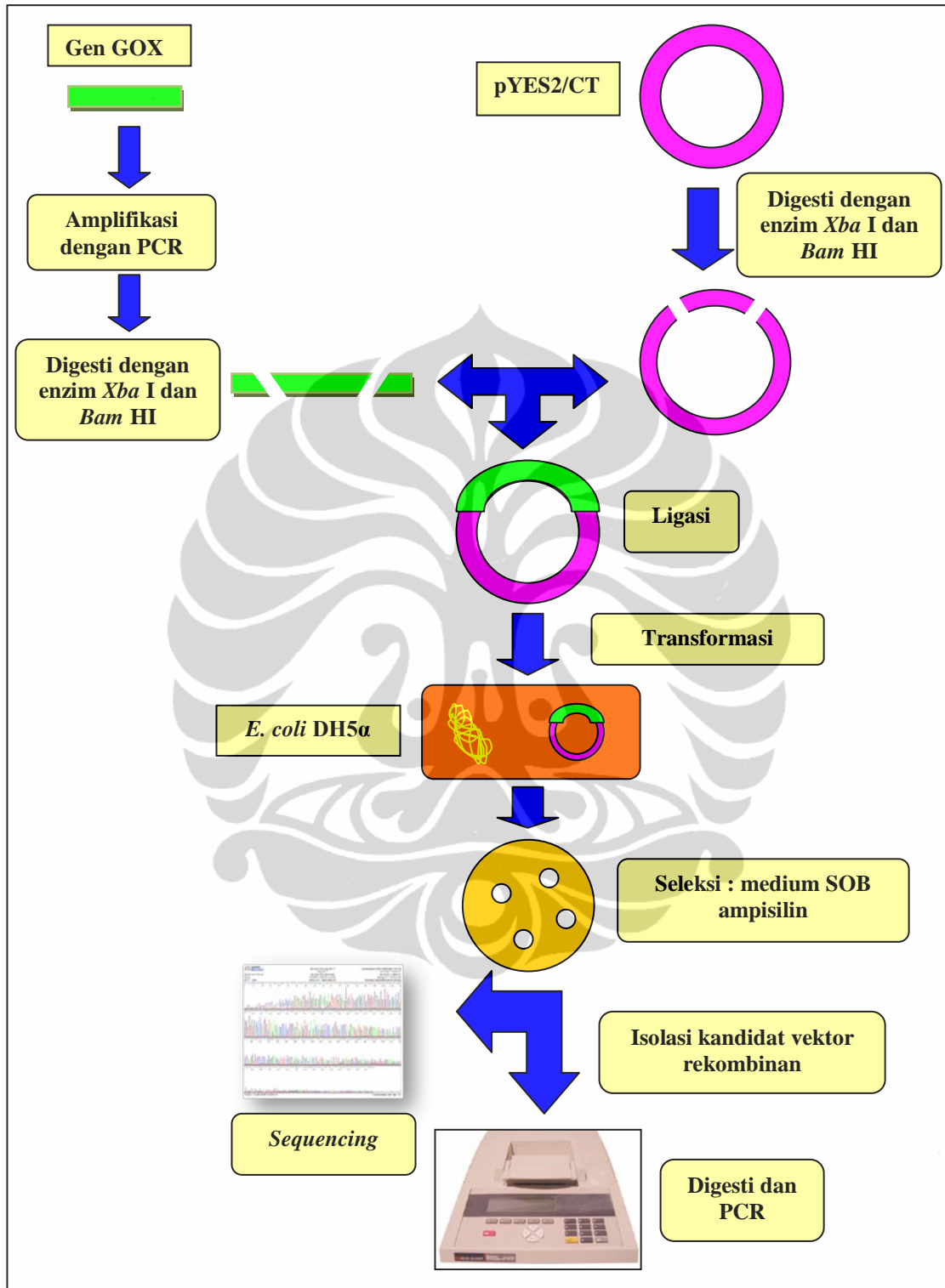


LAMPIRAN

Lampiran 1.1 Letak primer pada gen *glucose oxidase* (GOX)



Lampiran 1.2 Bagan cara kerja pengklonaan gen GOX ke dalam *E. coli* DH5a



Lampiran 1.3 Komposisi bahan kimia, cara pembuatan larutan atau *buffer*

No	Larutan / <i>buffer</i>	Komposisi dan cara pembuatan
1	Larutan stok ampisilin 100 mg/ml	Sebanyak 0,30 g ampisilin sigma 50g/ml ditambahkan larutan NaOH 1M tetes demi tetes hingga terlarut sempurna lalu ditambahkan air akuades hingga volume mencapai 3 ml. Larutan ini disterilisasi dengan cara disaring melalui <i>membrane filter</i> 0,22 mikron.
2	Larutan stok kalsium klorida 1M	Sebanyak 14,702 g CaCl ₂ dilarutkan dalam air akuades hingga volume akhir mencapai 100 ml Larutan ini disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, 20 menit.
3	KCl 250 mM	Sebanyak 1,86 g KCl dilarutkan dalam 100 ml akuades lalu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, 20 menit.
4	Gel agarosa 0,8% (b/v)	Sebanyak 0,8 g agarosa dilarutkan dalam 100 ml TAE 1x, lalu dipanaskan hingga mendidih dan homogen. Larutan dituang ke dalam cetakan gel yang telah dipanaskan <i>comb</i> . Setelah gel mengeras, <i>comb</i> diangkat sehingga terbentuk <i>well</i> (sumur). Gel diletakkan dalam ruang elektroforesis dan direndam larutan TAE 1x.
5	Larutan MgCl ₂ :CaCl ₂ (80 mM:20mM)	Sejumlah 1,6 MgCl ₂ 0,5 M dan 0,4 ml CaCl ₂ 0,5 M dicampurkan dengan 8 ml akuades steril. Larutan disterilisasi dengan filter bakteri 0,22 nm.

6	Larutan CaCl ₂ 0,1 M	Sejumlah 0,4 ml CaCl ₂ 0,5 M ditambahkan 1,6 ml akuades steril, kemudian disterilisasi dengan filter
7	Buffer stok TAE (<i>Tris-asetat Ethylenediamine Tetracetate</i>) 50X dan 1X	Sebanyak 242 g Tris basa, 100 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) dan 57,1 ml asam asetat glacial ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 1.000 ml. Untuk buffer TAE 1X, sebanyak 200 ml TAE 50 X ditambahkan akuades hingga 1.000 ml.
8	Etidium bromida (EtBr)	Sebanyak 20 µl etidium bromida (10 mg/ml) ditambahkan ke dalam 200 ml akuades.
9	EDTA 0,5 M	Sebanyak 186,1 g Na.EDTA dilarutkan ke dalam 800 ml akuades. Lalu ditambahkan 20 g NaOH. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga volume larutan mencapai 1.000 ml. pH larutan ditepatkan pada 8, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 20 menit.
10	Glukosa 1 M	Sebanyak 18 g glukosa ditambahkan akuades hingga volume 100 ml, kemudian disterilisasi dengan filtrasi membran 0,22 mikron.
11	Magnesium klorida 2 M	Sebanyak 40,6 g MgCl ₂ .6H ₂ O dilarutkan dalam 80 ml akuades, kemudian ditambahkan akuades hingga volume total 100 ml. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 20 menit.
12	SDS 10%	Sebanyak 100 g SDS (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) dilarutkan dalam 900 ml akuades, kemudian dipanaskan pada suhu 68° C. pH

		disesuaikan menjadi 7,2 dengan penambahan HCl, kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 1000 ml.
13	Tris-HCl 1 M pH 8,0	Sebanyak 121,1 g Tris basa dilarutkan dalam 800 ml akuades, kemudian ditambahkan 42 ml HCl pekat. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga volume mencapai 1.000 ml. pH larutan diukur (pH 8,0) kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 20 menit.
14	Buffer <i>loading</i> 6x	Bromofenol biru 0,25% (v/v) dalam akuades ditambah dengan sukrosa 40% (v/v) dalam akuades.
15	Larutan alkalin lisis I	50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), dan 10 mM EDTA dilarutkan dalam akuades hingga volume mencapai 10 ml, kemudian disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm. Larutan disimpan pada suhu 4° C.
16	Larutan alkalin lisis II	0,2 N NaOH dan 1% SDS dicampur dengan akuades hingga volume akhir 10 ml. Larutan ditempatkan pada suhu ruang dan segera digunakan.
17	Larutan alkalin lisis III	Sebanyak 60 ml 5 M potasium asetat dan 11,5 ml asam asetat glasial dicampur dengan 28,5 ml H ₂ O hingga larutan homogen kemudian diautoklaf selama 15 menit, suhu 121° C dengan tekanan 2 atm. Larutan disimpan pada suhu 4° C.

18	Rnase A 10 mg/ml	Sebanyak 10 mg <i>Ribonuclease A</i> dilarutkan ke dalam 1 ml <i>ultra pure water</i> hingga larutan homogen. Larutan disimpan pada suhu -20° C
19	Dapar stok TE10X (pH 7,6)	Sebanyak 100 µl Tris-Cl 0,5 M (pH 7,6) dan 10 µl EDTA 0,5 M (pH 8,0) ditambahkan <i>ultra pure water</i> hingga volume total mencapai 10 ml. Larutan disterilisasi dengan menggunakan <i>membrane filter</i> 0,22 µm.
20	Larutan A	1 ml Tris HCl 10 mM, 0,02 ml EDTA 100 mM, 0,5 ml SDS 0,5% (pH 8,0).
21	Larutan B	50 mM sodium asetat pH 4,5.

Sumber : (Sambrook & Russell 2001).

Lampiran 1.4 Pembuatan medium

1. Medium cair SOB

Medium SOB dibuat dengan mencampurkan 20 g *bacto tryptone*, 5 g *yeast extract*, serta 0,5 g NaCl, dalam akuades hingga volume akhirnya 1.000 ml.

Larutan diaduk sampai larut dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 5 ml larutan KCl 0,5 M. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit, dan tekanan 2 atm. Sebelum digunakan, medium terlebih dahulu ditambahkan 5 ml larutan MgCl₂ 2 M steril.

2. Medium padat SOB

Pembuatan medium SOB padat sama dengan pembuatan medium SOB cair, namun sebelum disterilisasi sebanyak 15 g *agar bacteriological* ditambahkan ke dalam larutan. Medium SOB padat yang masih panas dan berbentuk cair dituangkan ke dalam cawan petri sekitar 15 ml dan dibiarkan mengeras selama kira-kira 30 menit.

3. Medium SOC

Bacto tryptone 10 g, *yeast extract* 5 g, NaCl 0,5 g, 10 ml KCl 250 mM dan ditambahkan akuades hingga 900 ml, lalu dicampur dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. pH diukur hingga bernilai 7,0. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 15 menit. 5 ml MgCl₂ 2 M dan 20 ml glukosa 1 M ditambahkan secara aseptis.

4. Medium cair YPD

Sebanyak 1 g *yeast extract* dan 2 g *peptone* dilarutkan dalam akuades hingga volumenya mencapai 90 ml dengan cara diaduk menggunakan alat *magnetic stirrer*. Setelah larutan homogen, larutan lalu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 20 menit. Larutan ditambahkan 10 ml glukosa 20%.

5. Medium padat YPD

Pembuatan medium padat YPD sama dengan pembuatan medium cair YPD, tetapi ditambah sebanyak 2 g *agar bacteriological* sebelum disterilisasi. (Sambrook & Russell 2001).

Lampiran 1.5 Analisis konsentrasi DNA sisipan gen GOX dan vektor plasmid pYES2/CT yang telah didigesti dengan *Bam* HI dan *Xba* I serta dipurifikasi dengan perangkat lunak BIO1D

Title : ligasi 2

Comments :

Date : 04/21/09

Time : 10:17:24

Image name : J:\IM002484.TIF

```

*****
***
*   Lane   *   Number *   Volume *   Height *   Area   * %vol   *   MW-RF
*-----*
*   1     *   1     *   26501 *   137   *   255   * 100.000 * 23.130
*   *     *   2     *   25610 *   137   *   255   *  96.638 *  9.416
*   *     *   3     *   26848 *   138   *   255   * 101.309 *  6.557
*   *     *   4     *   33349 *   148   *   306   * 125.841 *  4.361
*   *     *   5     *   30979 *   689   *   255   * 116.897 *  2.322
*   *     *   6     *   28344 *   146   *   255   * 106.954 *  2.027
*   *     *   7     *   26120 *   119   *   306   *  98.562 *  0.564
*-----*
*   2     *   1     *   26463 *   207   *   250   *  99.857 *  5.399
*-----*
*   3     *   1     *   87842 *   388   *   416   * 331.467 *  1.840
*****
***

```

$$\text{Konsentrasi DNA} = \frac{a \times \text{ng penanda DNA} \times b}{c \times \mu\text{l DNA}}$$

Keterangan :

a = ukuran fragmen penanda λ DNA/*Hind* III yang mirip dengan fragmen DNA sampel

b = densitas fragmen DNA sampel terhadap fragmen penanda λ DNA/*Hind* III yang mirip dengan fragmen DNA sampel (dilakukan dengan bantuan software Bio1D)

c = jumlah total pasangan basa penanda λ DNA/*Hind* III

(lanjutan)

$$\text{GOX} = \frac{23.130 \times 250 \times (331,467/100)}{48.502 \times 3}$$

$$= 131,727072 \text{ ng}/\mu\text{l DNA}$$

$$\text{pYES2/CT} = \frac{23.130 \times 250 \times (99,857/100)}{48.502 \times 3}$$

$$= 39,6838001$$

(Sumber : Parakarn 1999).



Lampiran 1.6 Perhitungan rasio molar reaksi ligasi

$$\text{ng sisipan} = \frac{\text{ng vektor} \times \text{ukuran sisipan (kb)}}{\text{ukuran vektor (kb)}} \times \frac{\text{perbandingan molar sisipan}}{\text{vektor}}$$

$$131,727072 \times 30 \text{ ul} = \frac{(39,6838001 \times 29 \text{ ul}) \times 1779}{5963} \times \frac{X}{1}$$

$$3951,81216 = 343,338409 X$$

$$X = 11,5099623$$

Perbandingan vektor dengan insert untuk ligasi = 1 : 11

(Sumber : Promega 2007).

Lampiran 1.7 Nilai efisiensi transformasi sel kompeten

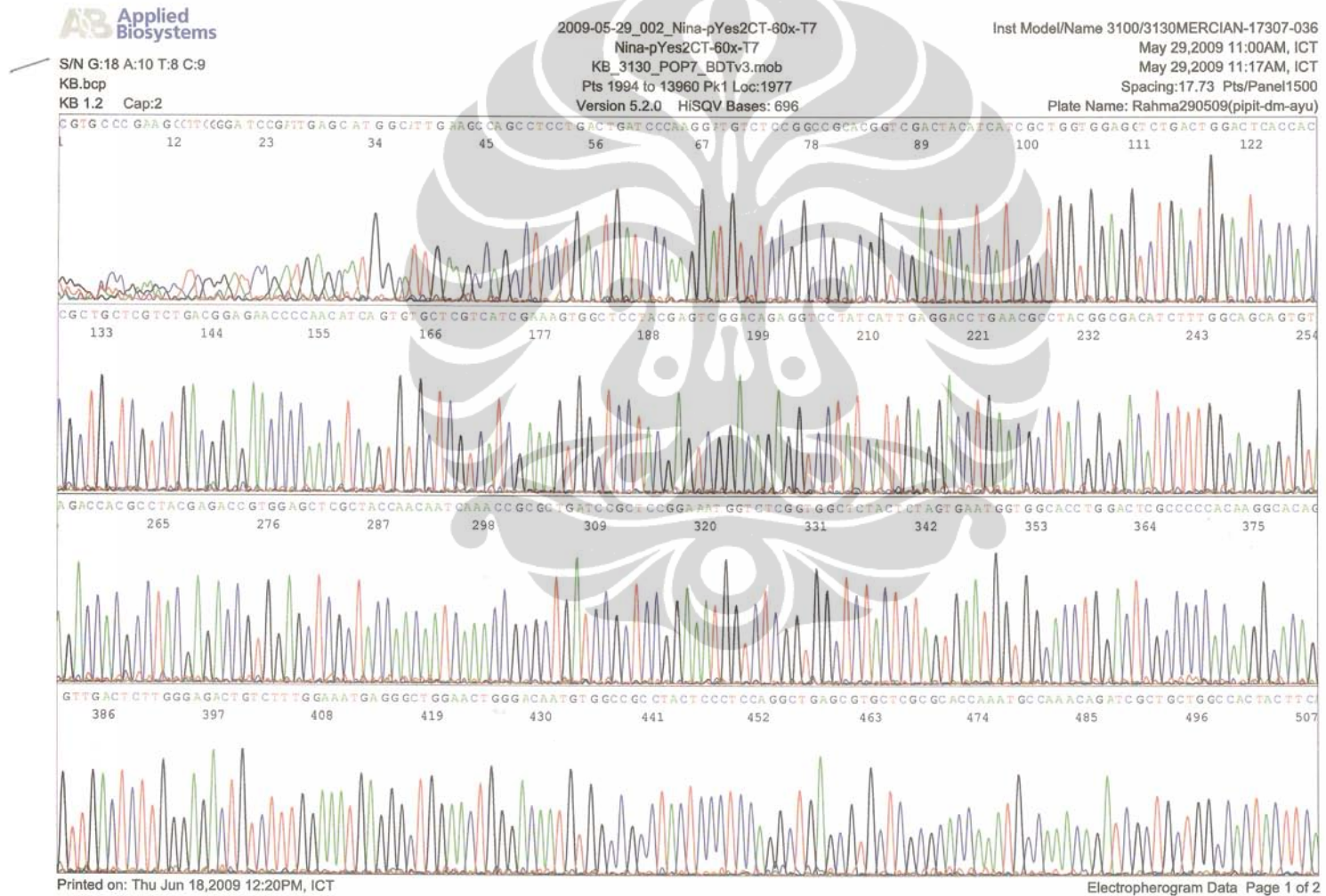
1. Efisiensi transformasi pada saat ligasi

$$\text{Efisiensi transformasi} = \frac{\text{jumlah koloni} \times \text{volume kultur transformasi}}{\text{konsentrasi plasmid} \times \text{volume kultur yang disebar}}$$

$$\text{Efisiensi transformasi} = \frac{5984 \times 400 \mu\text{l}}{0,05 \times 100 \mu\text{l}} = 4,8 \times 10^5 \text{ cfu}/\mu\text{g}$$

(Sumber : Queen-Baker 2000).

Lampiran 1.8 Elektroferogram hasil sekuensing klon 5

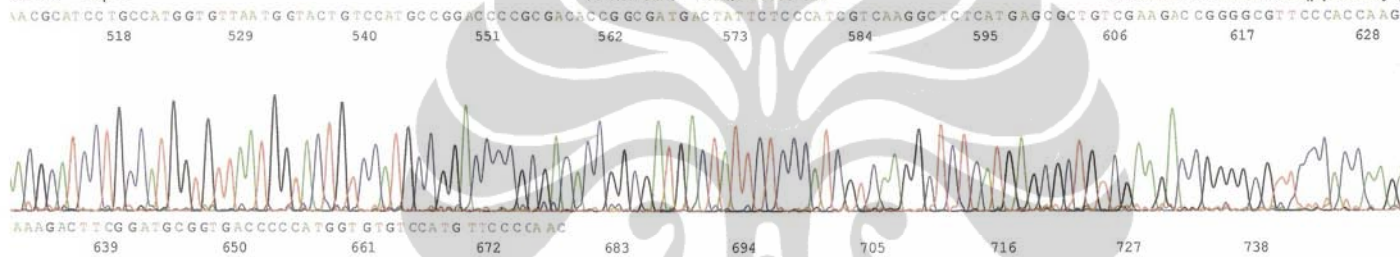


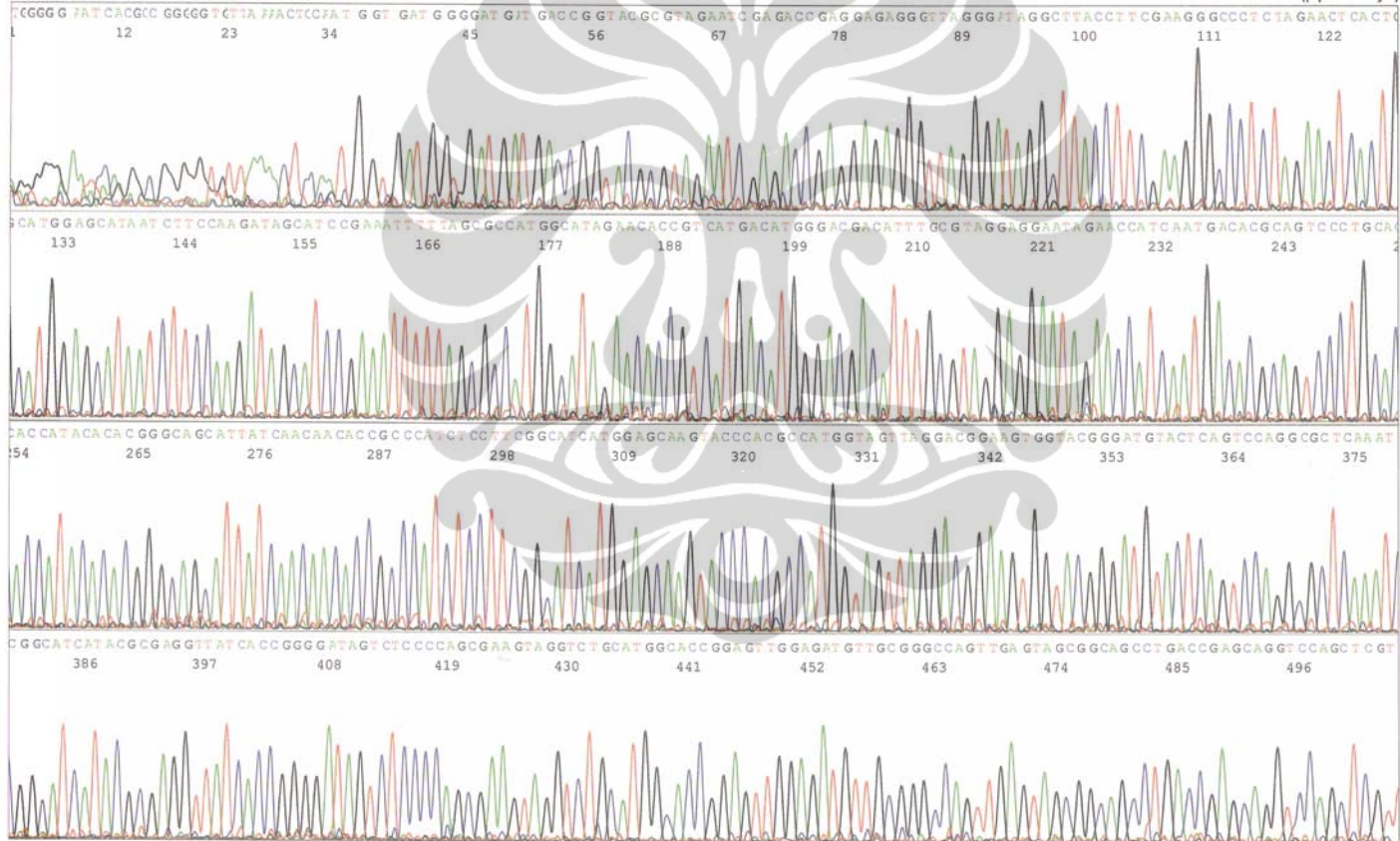


S/N G:18 A:10 T:8 C:9
KB.bcp
KB 1.2 Cap:2

2009-05-29_002_Nina-pYes2CT-60x-T7
Nina-pYes2CT-60x-T7
KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Pts 1994 to 13960 Pk1 Loc:1977
Version 5.2.0 HiSQV Bases: 696

Inst Model/Name 3100/3130MERCIAN-17307-036
May 29,2009 11:00AM, ICT
May 29,2009 11:17AM, ICT
Spacing:17.73 Pts/Panel1500
Plate Name: Rahma290509(pipit-dm-ayu)





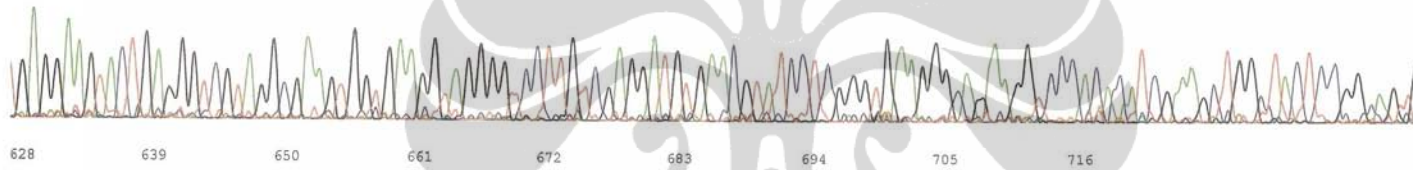
Applied Biosystems

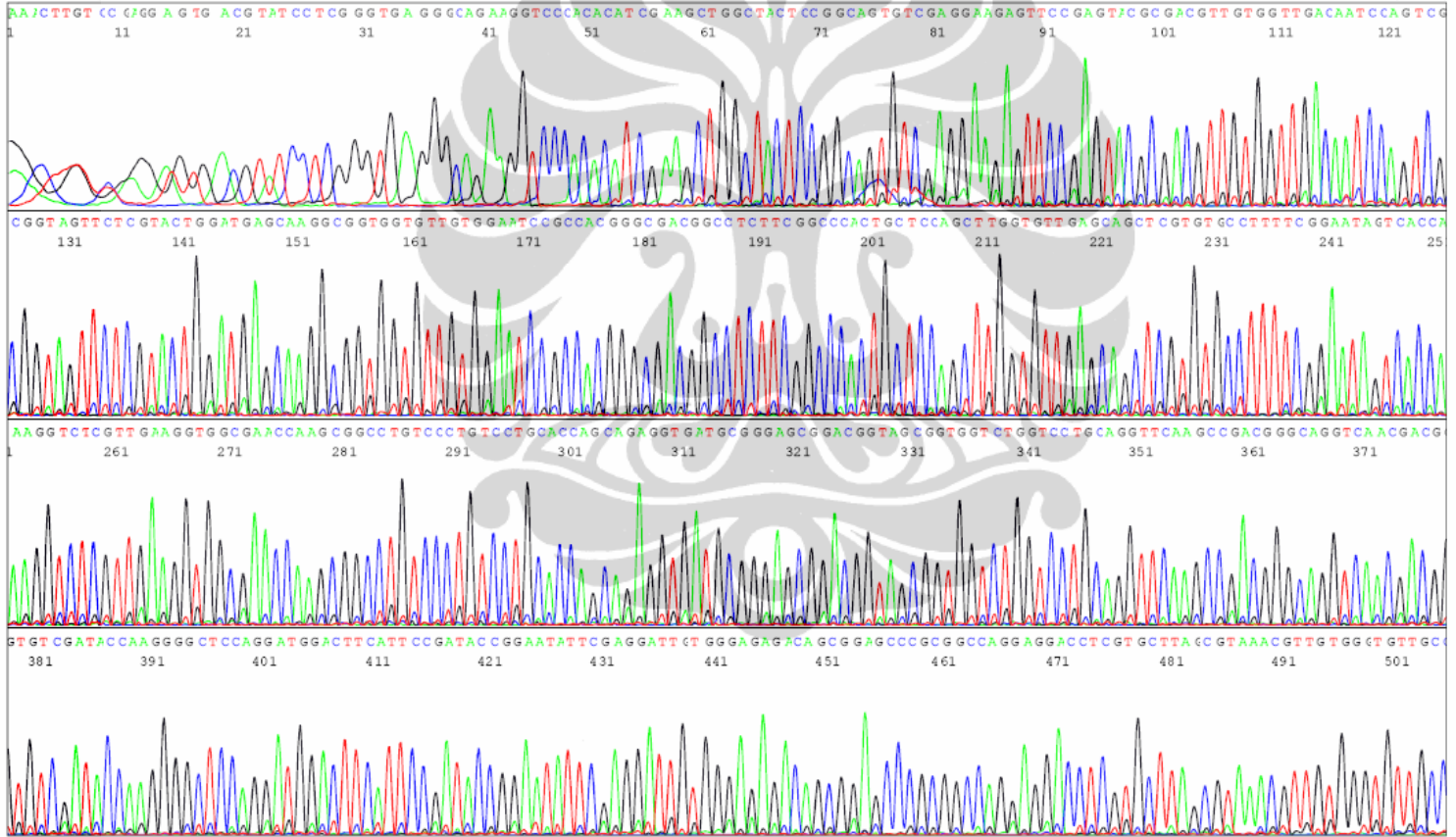
S/N G:14 A:9 T:7 C:6
KB.bcp
KB 1.2 Cap:3

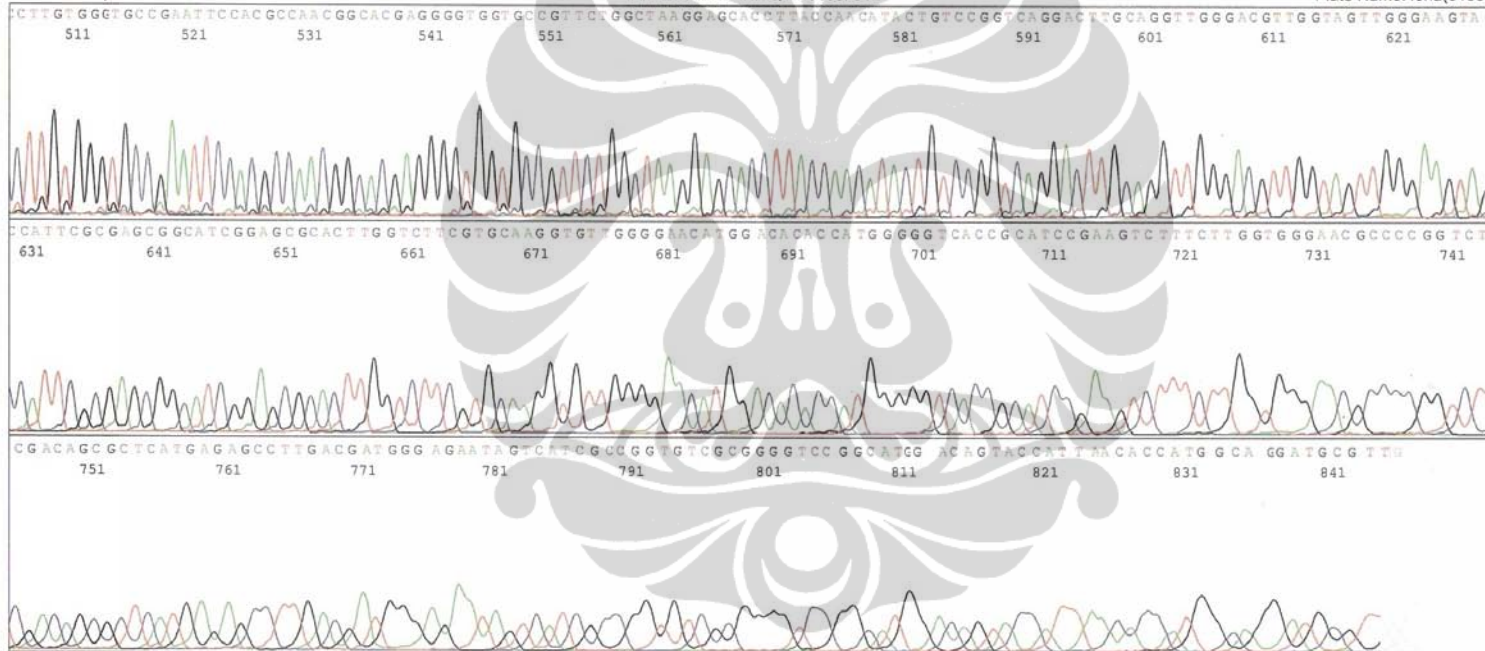
2009-05-29_003_Nina-pYes2CT-60x-cyc1
Nina-pYes2CT-60x-cyc1
KB_3130_POP7_BDTv3.mob
Pis 2122 to 13960 Pk1 Loc:2105
Version 5.2.0 HISQV Bases: 654

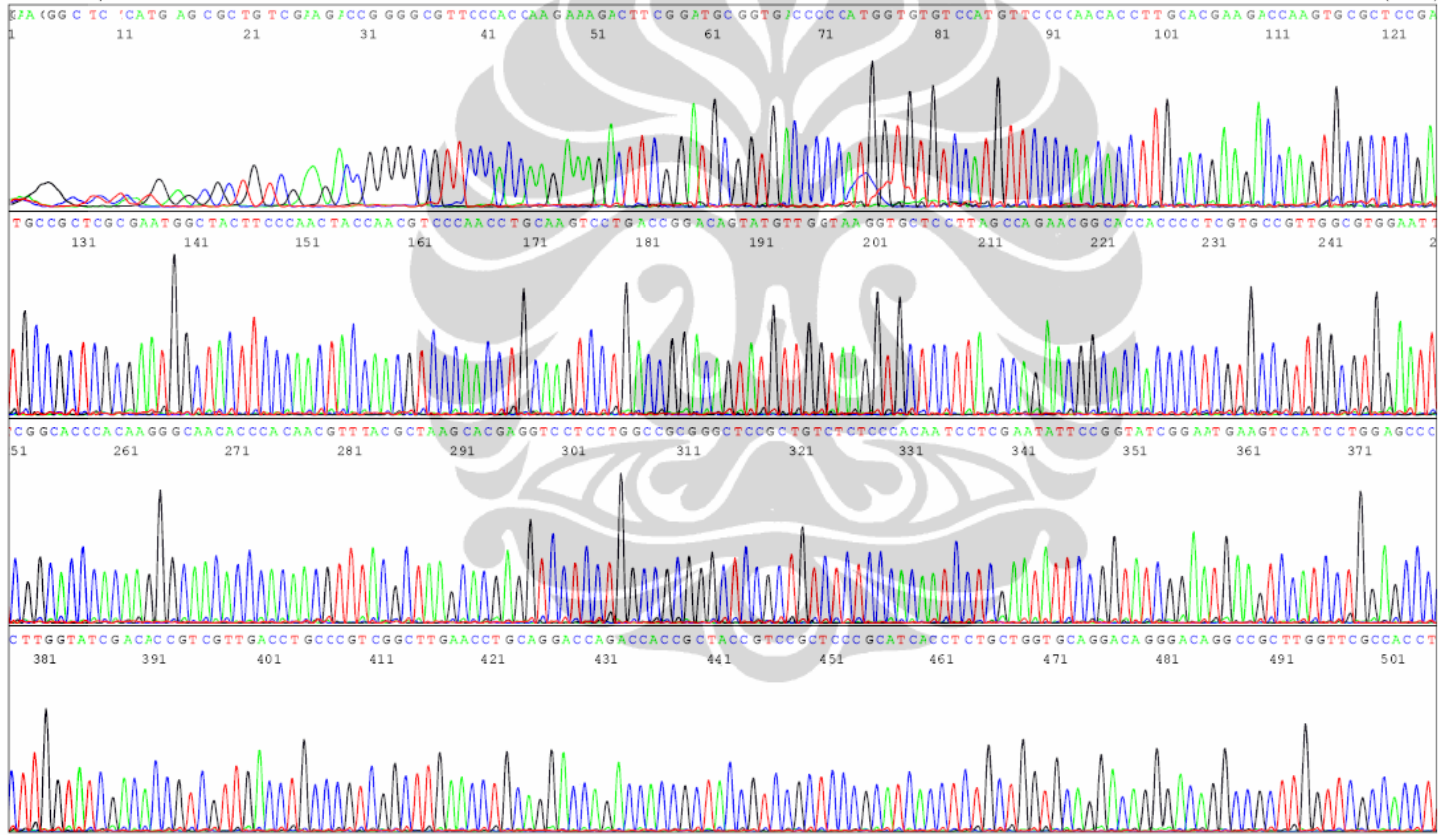
Inst Model/Name 3100/3130MERCIAN-17307-036
May 29,2009 11:00AM, ICT
May 29,2009 11:17AM, ICT
Spacing:17.64 Pts/Panel1500
Plate Name: Rahma290509(pipit-dm-ayu)

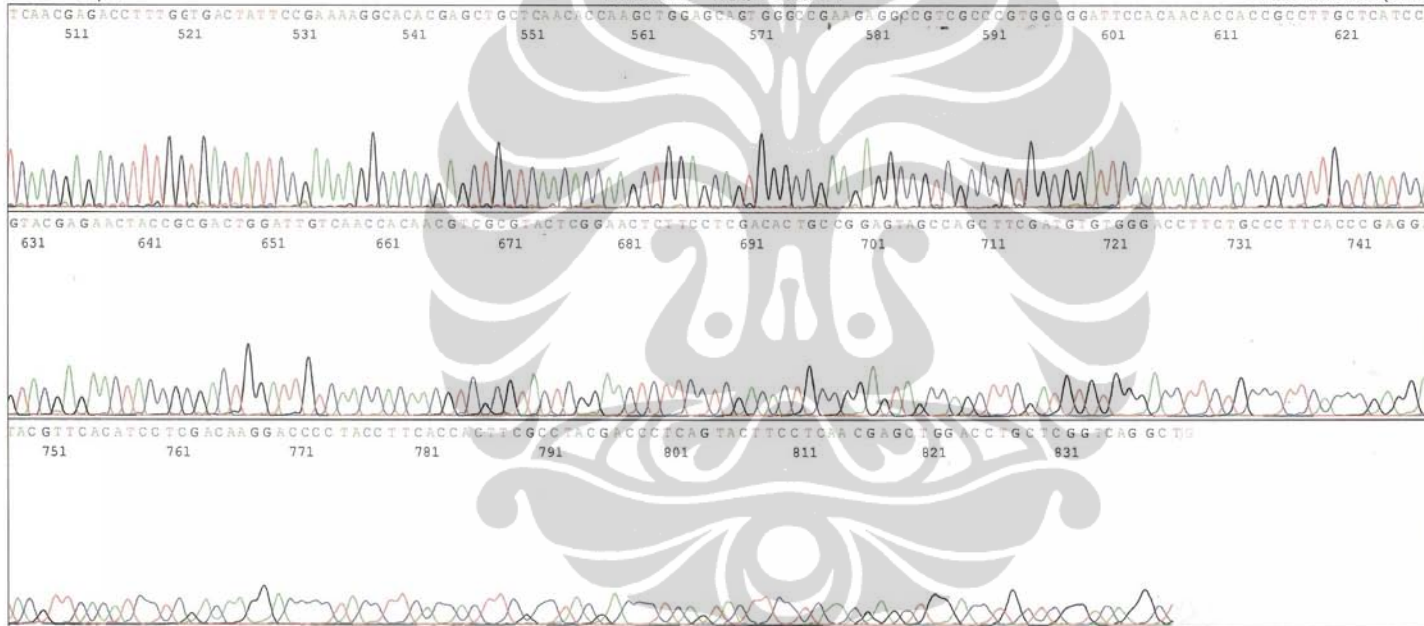
TGA GGAA GTACT G AG GGTCG TAGGC GAA GT GGT GAA GGTA GGG TCCT T GTC GAGG AT GT GAA GTA TCC TCG GGT GA AGG GCA GAAG GTCCACACATCG AAGCTGGCTACTCCGGCAGTG
507 518 529 540 551 562 573 584 595 606 617













Lampiran 1.9 Hasil Analisis BLASTN

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
J05242.1	A.niger glucose oxidase mRNA, complete cds	3229	3229	99%	0.0	99%	
X16061.1	Aspergillus niger gox gene for glucose oxidase (EC 1.1.3.4)	3229	3229	99%	0.0	99%	
EU532181.1	Aspergillus niger clone pPIC9GO+sigA glucose oxidase gene, partial cds	3225	3225	99%	0.0	99%	
AJ305345.1	Expression vector pEUKA4-gox1	3225	3225	99%	0.0	99%	
EU532182.1	Aspergillus niger clone pPIC9GO-sigG glucose oxidase gene, partial cds	3223	3223	99%	0.0	99%	
AF234246.2	Aspergillus niger glucose oxidase (GO2) gene, complete cds	3129	3129	99%	0.0	98%	
AM269993.1	Aspergillus niger contig An01c0470, complete genome	3073	3073	99%	0.0	98%	
XM_001389825.1	Aspergillus niger CBS 513.88 glucose oxidase precursor (goxC) partial mRNA	3070	3070	99%	0.0	98%	
FJ979866.1	Aspergillus niger strain Z-25 glucose oxidase gene, complete cds	2483	2483	99%	0.0	92%	
DQ661005.1	Aspergillus niger strain BT18 glucose oxidase gene, partial cds	2444	2444	98%	0.0	92%	
AY803992.1	Aspergillus niger glucose oxidase gene, partial cds	2442	2442	98%	0.0	92%	
DQ836361.1	Aspergillus niger strain A9 glucose oxidase (GOD) gene, partial cds	2409	2409	98%	0.0	91%	
AJ294936.1	Aspergillus niger ggox gene for glucose oxidase	1430	1430	98%	0.0	81%	
X56443.1	A.niger god gene for glucose oxidase (N-term.)	58.4	58.4	1%	1e-04	100%	

Lampiran 1.10 *Alignment* sekuens pYES-GOX hasil sekuensing terhadap *A. niger*
glucose oxidase mRNA complete cds

```

>  gb|J05242.1|ASNGLUOA A.niger glucose oxidase mRNA, complete cds
Length=2788

Score = 3229 bits (1748), Expect = 0.0
Identities = 1753/1755 (99%), Gaps = 1/1755 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 3 GAGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGT 62
      |||
Sbjct 551 GAGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGT 610

Query 63 CGACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGACTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGA 122
      |||
Sbjct 611 CGACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGACTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGA 670

Query 123 GAACCCCAACATCAGTGTGCTCGTATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGTCC 182
      |||
Sbjct 671 GAACCCCAACATCAGTGTGCTCGTATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGTCC 730

Query 183 TATCATGAGGACCTGAACGCCTACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTA 242
      |||
Sbjct 731 TATCATGAGGACCTGAACGCCTACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTA 790

Query 243 CGAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGATCCGCTCCGGAATGGTCT 302
      |||
Sbjct 791 CGAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGATCCGCTCCGGAATGGTCT 850

Query 303 CGGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGA 362
      |||
Sbjct 851 CGGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGA 910

Query 363 CTCTTGGGAGACTGTCTTTGAAATGAGGGCTGGAAGTGGGACAATGTGGCCGCTACTC 422
      |||
Sbjct 911 CTCTTGGGAGACTGTCTTTGAAATGAGGGCTGGAAGTGGGACAATGTGGCCGCTACTC 970

Query 423 CCTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACAAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTT 482
      |||
Sbjct 971 CCTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACAAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTT 1030

Query 483 CAACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGACCCCGCGACACCGGCGA 542
      |||
Sbjct 1031 CAACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGACCCCGCGACACCGGCGA 1090

Query 543 TGACTATTCTCCCATCGTGAAGGCTCTCATGAGCGCTGTGGAAGACCGGGCGTTCAC 602
      |||
Sbjct 1091 TGACTATTCTCCCATCGTGAAGGCTCTCATGAGCGCTGTGGAAGACCGGGCGTTCAC 1150

Query 603 CAAGAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCA 662
      |||
Sbjct 1151 CAAGAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCA 1210

Query 663 CGAAGACCAAGTGCCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGTACTTCCCAACTACCAACGTCC 722
      |||
Sbjct 1211 CGAAGACCAAGTGCCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGTACTTCCCAACTACCAACGTCC 1270

Query 723 CAACCTGCAAGTCTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCAC 782
      |||
Sbjct 1271 CAACCTGCAAGTCTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCAC 1330

Query 783 CACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTA 842
      |||
Sbjct 1331 CACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTA 1390

Query 843 CGCTAAGCACGAGGTCTCTGCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATA 902
      |||

```

Sbjct 1391 CGCTAAGCACGAGGTCCTCCTGGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATA 1450

Query 903 TTCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCGTTGACCT 962
 |||
 Sbjct 1451 TTCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCGTTGACCT 1510

Query 963 GCCCGTCGGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACCGCTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTC 1022
 |||
 Sbjct 1511 GCCCGTCGGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACCGCTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTC 1570

Query 1023 TGCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTGGTGA 1082
 |||
 Sbjct 1571 TGCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTGGTGA 1630

Query 1083 CTATTCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGC 1142
 |||
 Sbjct 1631 CTATTCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGC 1690

Query 1143 CGTCGCCCCTGGCGGATTCCACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCG 1202
 |||
 Sbjct 1691 CGTCGCCCCTGGCGGATTCCACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCG 1750

Query 1203 CGACTGGATTGTCAACCACAACGTCGCGTACTCGGAACTCTTCTCGACACTGCCGGAGT 1262
 |||
 Sbjct 1751 CGACTGGATTGTCAACCACAACGTCGCGTACTCGGAACTCTTCTCGACACTGCCGGAGT 1810

Query 1263 AGCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTTCACATCCTCGA 1322
 |||
 Sbjct 1811 AGCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTTCACATCCTCGA 1870

Query 1323 CAAGGACCCCTACCTTCAACCACTTCGCCTACGACCCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGA 1382
 |||
 Sbjct 1871 CAAGGACCCCTACCTTCAACCACTTCGCCTACGACCCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGA 1930

Query 1383 CCTGCTCGGTGAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCAT 1442
 |||
 Sbjct 1931 CCTGCTCGGTGAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCAT 1990

Query 1443 GCAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTT 1502
 |||
 Sbjct 1991 GCAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTT 2050

Query 1503 GAGCGCCTGGACTGAGTACATCCCGTACCCTTCCGTCCTAACTACCATGGCGTGGGTAC 1562
 |||
 Sbjct 2051 GAGCGCCTGGACTGAGTACATCCCGTACCCTTCCGTCCTAACTACCATGGCGTGGGTAC 2110

Query 1563 TTGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGG 1622
 |||
 Sbjct 2111 TTGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGG 2170

Query 1623 TGTGCAGGGACTGCGTGTGATGTTCTATTCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATGT 1682
 |||
 Sbjct 2171 TGTGCAGGGACTGCGTGTGATGTTCTATTCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATGT 2230

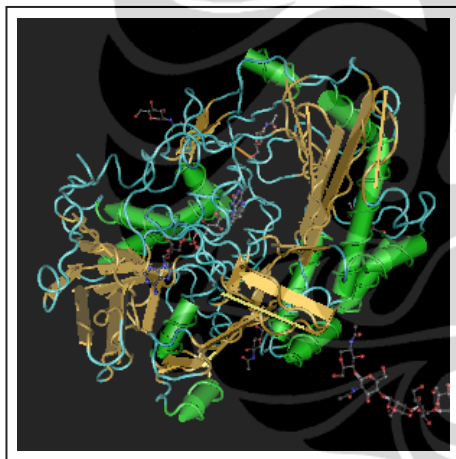
Query 1683 CATGACGGTGTCTATGCCATGGCGTAAAAATTTCCGATGCTATCTTGGAAAGATTATGC 1742
 |||
 Sbjct 2231 CATGACGGTGTCTATGCCATGGCGTAAAAATTTCCGATGCTATCTTGGAAAGATTATGC 2290

Query 1743 T-CCATGCAGTGAGT 1756
 |||
 Sbjct 2291 TTCCATGCAGTGAGT 2305

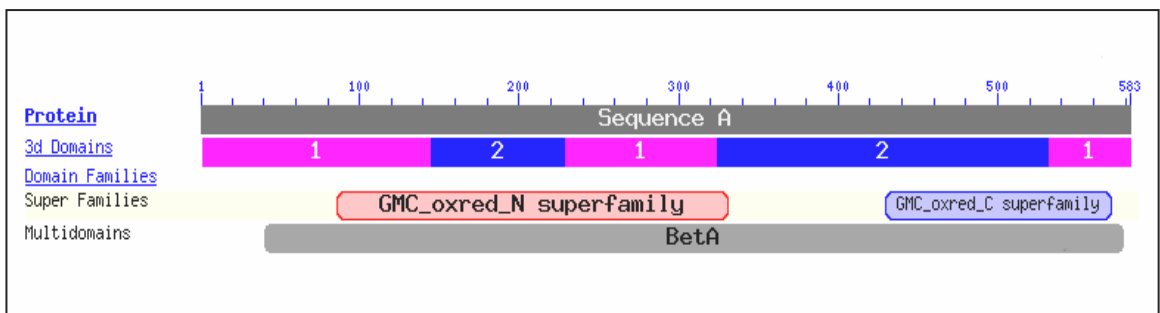
Lampiran 1.11 Hasil analisis sekuens klona GOX yang mengalami mutasi dibandingkan dengan gen GOX dari *A. niger* NRRL-3

	ala	ile	leu	glu	asp	tyr	ala	ser	met	gln	stop		
NRRL-3 :	GCT	ATC	TTG	GAA	GAT	TAT	GCT	TCC	ATG	CAG	TGA		
	(596)										(606)		
	ala	ile	leu	glu	asp	tyr	ala	pro	cys	ser	glu	phe	stop
GOX :	GCT	ATC	TTG	GAA	GAT	TAT	GCT	CCA	TGC	AGT	GAG	TTC	TAG
	(575)												(587)

Lampiran 1.12 Struktur kristal *Glucose Oxidase* (Protein Data Base ID: 1GAL)



Lampiran 1.13 Hasil analisis domain klona GOX



Lampiran 1.14 Poster publikasi Perhimpunan Peneliti Bahan Alam (PERHIPBA).
11—12 Agustus 2009, Badan Penerapan Pengkajian Teknologi
(BPPT), Jakarta.




Cloning of the Glucose Oxidase Gene from *Aspergillus niger* within *Saccharomyces cerevisiae* Expression Vector pYES2/CT for Cancer Gene Therapy Application

Nina Hastuti¹, Sabar Pambudi², Wibowo Mangunwardoyo¹, Vanny Narita²

¹Departemen of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, University of Indonesia, Depok, Indonesia
²Center for Pharmaceutical and Medical Technology, Agency for the Assessment and Application of Technology (BPPT), Jakarta, Indonesia

ABSTRACT

Glucose oxidase (GOX) have been used in cancer therapy, food industry, and medical application such as glucose sensing system. This enzyme catalyzes the oxidation of β-D-glucose to D-glucono-δ-lactone and hydrogen peroxide (H₂O₂) using molecular oxygen as an electron acceptor. H₂O₂ produced by GOX is effective for cancer gene therapy and preventing tumor growth in mice. In this research, GOX gene from *Aspergillus niger* was cloned in *Escherichia coli* DH5α within pYES2/CT as a yeast *Saccharomyces cerevisiae* expression vector. *Aspergillus niger* genomic DNA was isolated and amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) to get a specific GOX gene fragment. The amplified GOX gene cassette and pYES2/CT vector were double-digested with *Bam*H1 and *Xba*1. Subsequently digested GOX gene cassette and vector were *in vitro* ligated. PCR and digestive confirmation resulted in 3 verified clones named pYES2-GOX. GOX gene within the construct was sequenced at the 5' and 3' ends using T7 and CYC1 primers and checked for its open reading frame. The clones were then transformed into *S. cerevisiae* INVSC1 using the LiAc method. In conclusion, GOX gene from *A. niger* was successfully cloned in *E. coli* DH5α within pYES2/CT vector and transformed into *S. cerevisiae* INVSC1. In the future, this recombinant GOX protein will be expressed and purified for further use in cancer gene therapy and other applications.

Keywords : Cancer, cloning, Glucose oxidase, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Glucose oxidase (GOX) have been used in cancer therapy, food industry, and medical application such as glucose sensing system. This enzyme catalyzes the oxidation of β-D-glucose, with molecular oxygen, via D-glucono-δ-lactone to D-gluconic acid and hydrogen peroxide (H₂O₂) (Frederick *et al.*, 1990). H₂O₂ produced by GOX is effective for cancer gene therapy and preventing tumor growth in mice bearing not only ascites tumor but also solid tumor (Higuchi *et al.*, 1991). The commercial enzyme is mainly produced from selected strains of *Aspergillus niger* as a by-product in the industrial fermentation of gluconic acid (Pulci *et al.*, 2004).

Method

In this research, GOX gene from *Aspergillus niger* was cloned in *Escherichia coli* DH5α within pYES2/CT as a yeast *Saccharomyces cerevisiae* expression vector. *Aspergillus niger* genomic DNA was isolated and amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) to get a specific GOX gene fragment. The amplified GOX gene cassette and pYES2/CT vector were double-digested with *Bam*H1 and *Xba*1. Subsequently digested GOX gene cassette and vector were *in vitro* ligated. GOX gene within the construct was sequenced at the 5' and 3' ends using T7 and CYC1 primers and checked for its open reading frame.

Result

PCR, digestive, and sequencing confirmation resulted in 3 verified clones named pYES2-GOX.



Figure 1. A. DH5α colonies containing pYES2-GOX candidates. B. Recombinant pYES2-GOX verification by PCR (Lane 1) Marker; (Lane 2) pYES2-GOX 1; (Lane 3) pYES2-GOX 2; (Lane 4) pYES2-GOX 3; (Lane 5) pYES2-GOX 4; (Lane 6) negative control PCR process (without gene pYES2-GOX); (Lane 7) positive control PCR process (with DNA positive control).



Figure 2. Recombinant pYES2-GOX 1 verification by *Bam*H1 (Lane 1) Marker; (Lane 2) pYES2/CT; (Lane 3) pYES2-GOX 1; (Lane 4) undigest pYES2/CT



Figure 3. DNA sequencing of pYES2-GOX 1 using T7 and CYC1 primers



Figure 4. Transformation pYES2-GOX 1 into *S. cerevisiae* INVSC1

Discussion

PCR, digestion, and sequencing verification of recombinant pYES2-GOX candidates showed that pYES2-GOX 1 contain the cloned GOX gene. PCR confirmation showed the expected 1,779 bp band of amplified GOX gene cassette. The single digestion confirmation also showed the expected 7,742 bp band of recombinant pYES2-GOX 1, while the single digestion of empty pYES2/CT vector resulted in the expected 5,963 band. The DNA sequencing result showed that the GOX gene was inserted in pYES2/CT vector. Finally, transformation was successfully performed resulting in stable recombinant *S. cerevisiae* colony. The efficiency of transformation recombinant into *S. cerevisiae* is $5,8 \times 10^3$ cfu/μg.

Conclusion

In conclusion, GOX gene from *A. niger* was successfully cloned in *E. coli* DH5α within pYES2/CT vector. The confirmed pYES2/CT containing GOX was transformed into *S. cerevisiae* INVSC1. In the future, this recombinant GOX protein will be expressed and purified for further use in cancer gene therapy and other applications.

References

Frederick, K.R., J. Tung., R.S. Emerick., F.R. Masiazar., S.H. Chamberlain., A. Vasavada & S. Rosenberg. 1990. Glucose Oxidase From *Aspergillus niger*. Cloning, Gen Sequence, Secretion From *Saccharomyces cerevisiae* and Kinetic Analysis of a Yeast-derived Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. **265** (7): 3793—3802.
Higuchi, Y., S. Shoin & S. Matsukawa. 1991. Enhancement of the Antitumor Effect of Glucose Oxidase by Combined Administration of Hydrogen Peroxide Decomposition Inhibitors Together with an Oxygenated Fluorocarbon. *Cancer science*. **82** (8): 942—949.
Pulci, V., R. D'Ovidio., M. Petruccioli & F. Federici. 2004. The glucose oxidase of *Penicillium variable* P16: gene cloning, sequencing and expression. *Applied Microbiology*. **38**(?): 233—238.

Makalah 2

EKSPRESI GEN *GLUCOSE OXIDASE* (GOX) *Aspergillus niger* PADA VEKTOR pYES2/CT DALAM *Saccharomyces cerevisiae* UNTUK APLIKASI BIOSENSOR GLUKOSA

Nina Hastuti

ninahastuti41@yahoo.com

ABSTRACT

Glucose oxidase (GOX) enzyme has been applied as a raw material glucose biosensor. GOX enzyme catalyses the oxidation of β -D-glucose into D-glucono- δ -lactone and hydrogen peroxide (H_2O_2) using oxygen as an electron acceptor. Previously, GOX gene from *Aspergillus niger* was successfully cloned into *Saccharomyces cerevisiae* expression vector, pYES2/CT. The purpose of this study was to express recombinant GOX gene in *S. cerevisiae* INVSc1. Recombinant plasmid pYES2/CT containing GOX gene was successfully transformed into *S. cerevisiae* INVSc1 using the LiAc method. Then the total proteins were extracted using various protocols with glass beads lyses method as the optimal extraction technique. The recombinant protein was induced by of 2, 4 and 8% galactose inducer. However induced expression of this protein was not significantly observed, although it was shown that recombinant GOX protein was likely to be present in the supernatant phase. Based on glucose liquid assay and a preliminary glucose biosensor analysis, the recombinant GOX protein induced with 8% galactose for 48 hours had a higher activity than commercial GOX. In the future, further improvements need to be done to obtain optimal recombinant GOX protein expression.

Keywords : *Aspergillus niger*, *Expression*, *Glucose biosensors*, *Glucose oxidase*, *Saccharomyces cerevisiae*

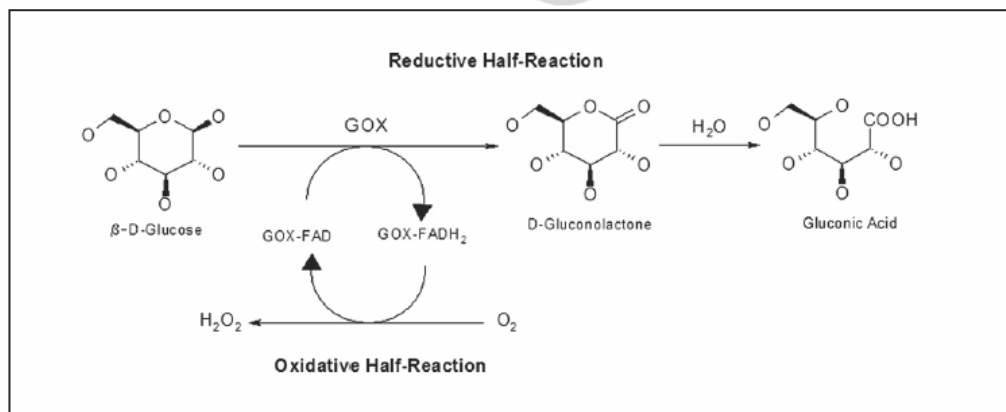
PENDAHULUAN

Peningkatan kebutuhan masyarakat terhadap sensor glukosa dengan akurasi tinggi, kecepatan pengukuran relatif cepat serta ukuran yang kecil mendorong berkembangnya penelitian mengenai enzim *glucose oxidase* (GOX) sebagai bahan baku sensor glukosa. Sensor glukosa secara umum merupakan alat

pengukur atau sensor digunakan untuk mengetahui kadar glukosa dalam darah. Ketika perangkat analisis sensor ini menggabungkan bahan biologis baik terikat kuat atau terintegrasi di dalam transduser fisikokimia atau *transducing microsystem*, sistem ini dikenal dengan istilah biosensor glukosa (Mozaz *et al.* 2004).

Enzim paling umum digunakan dalam biosensor glukosa adalah enzim *glucose dehydrogenase* dan *glucose oxidase* (GOX) (Yamaguchi *et al.* 2007). Enzim tersebut mengandung kelompok redoks yang mengkatalisis reaksi biokimia. *Glucose oxidase* (β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) mengkatalisis reaksi oksidasi dari β -D-glucose menjadi D-glucono-1,5-lactone dan hidrogen peroksida (H_2O_2), menggunakan molekul oksigen. GOX merupakan protein dimer dengan berat molekul 160 kDa, mengandung satu ikatan kuat flavin adenine dinucleotide (FAD) per monomer sebagai kofaktor. Enzim tersebut merupakan glikosilat, dengan kandungan karbohidrat sebesar 16% (Hecht *et al.* 1993).

Reaksi GOX dapat dibagi menjadi tahap reduktif dan oksidatif (Gambar 2.1). Setengah reaksi reduktif, GOX mengkatalisis oksidasi dari β -D-glucose menjadi glucono-1,5-lactone kemudian menjadi asam glukonat. Flavine adenine dinucleotida (FAD) dari GOX tereduksi menjadi $FADH_2$. Setengah reaksi oksidatif merupakan reaksi reoksidasi oleh oksigen untuk menghasilkan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida dipecah oleh enzim katalase untuk menghasilkan air dan oksigen (Simpson 2007).



Gambar 2.1 Skema reaksi enzim *glucose oxidase* (GOX) [Sumber: Simpson *et al.* 2007].

Enzim GOX pertama kali diisolasi dari *Aspergillus niger* dan dapat juga diisolasi dari sejumlah genus *Aspergillus* dan *Penicillium* (Luque *et al.* 2004). GOX telah digunakan sebagai bahan dasar untuk sensor glukosa pada kit deteksi glukosa (Frederick *et al.* 1990). Enzim β -D *glucose oxidase* biasanya digunakan bersama-sama dengan peroksida dan suatu senyawa berwarna. Dengan adanya oksigen, akan dihasilkan asam glukonat dan hidrogen peroksida akan diuraikan oleh peroksidase. Adanya senyawa berwarna memudahkan untuk mengukur aktivitas enzim dan konsentrasi glukosa secara tidak langsung dengan bantuan spektrofotometer (Suhartono 1989).

Gen GOX telah banyak diekspresikan ke dalam berbagai spesies mikroorganisme misalnya ekspresi ke dalam *Escherichia coli* (Witt *et al.* 1998), *Pichia pastoris* (Yamaguchi *et al.* 2007; Crognale *et al.* 2006) dan *Saccharomyces cerevisiae* (Frederick *et al.* 1990). Menurut Witt *et al.* (1998), ekspresi gen GOX ke dalam *E. coli* menggunakan vektor ekspresi pPAGOX, diinduksi dengan panas menghasilkan kuantitas protein yang besar, didapat protein dengan berat molekul 60 kDa, terkumpul di dalam *inclusion bodies*.

Penelitian mengenai gen GOX yang diekspresikan ke dalam *P. pastoris* telah banyak dilakukan. Yamaguchi *et al.* (2007) melaporkan gen GOX berasal dari *A. niger* berhasil diekspresikan ke dalam *P. pastoris* menggunakan vektor ekspresi pGAPZ α C mempunyai ukuran 1489—1882 bp. Rekombinan GOX membentuk fusi dengan polihistidin dengan berat molekul 75—100 kDa. Crognale *et al.* (2006) juga berhasil mengekspresikan gen GOX ke dalam *P. pastoris* menggunakan vektor ekspresi pPICZ α A. Rekombinan GOX diinduksi dengan promotor alkohol oksidase (AOX1 promoter) menghasilkan protein dengan berat molekul 82 kDa diaplikasikan untuk teknologi biosensor glukosa.

Malherbe *et al.* (2003) berhasil mengekspresikan gen GOX dari *A. niger* ke dalam *S. cerevisiae* menggunakan vektor ekspresi Yip5. Rekombinan GOX tersebut diaplikasikan untuk produksi minuman anggur dengan kadar alkohol rendah. Frederick *et al.* (1990) melaporkan ekspresi gen GOX ke dalam *S. cerevisiae* menggunakan vektor ekspresi pSGO-2 dan p@GO-1 mendapatkan hasil optimal. Protein didapatkan memiliki berat molekul 75—80 kDa.

Rekombinan GOX tersebut diaplikasikan untuk pengembangan teknologi biosensor glukosa.

Yeast shuttle vector pYES2/CT merupakan salah satu plasmid dapat digunakan untuk mengekspresikan protein GOX. Vektor pYES2/CT termasuk plasmid dengan jumlah kopi tinggi. Vektor tersebut dirancang untuk ekspresi protein rekombinan dalam *S. cerevisiae*. Vektor pYES2/CT berukuran 5.963 pb, mengandung promotor *GAL 1* agar dapat dilakukan induksi dengan galaktosa pada ekspresi protein hasil pengklonaan (Invitrogen 2003).

Gen resisten ampisilin juga terdapat dalam vektor pYES2/CT sehingga dapat diaplikasikan pada medium penapisan ampisilin. *URA3 gene* sebagai *auxotrophic marker* digunakan sebagai tanda penapisan pada medium tanpa urasil pada proses transformasi *yeast*. Vektor pYES2/CT juga mempunyai *2 μ origin* untuk mempertahankan keberadaannya dalam episom dan menghasilkan replikasi dengan jumlah kopi sebanyak 10—40 kopi/sel dan *f1 origin* untuk mempertahankan untai tunggal DNA (Invitrogen 2003).

Penelitian sebelumnya dalam tesis ini telah berhasil didapatkan klon gen GOX berasal dari *A. niger* di dalam vektor ekspresi *S. cerevisiae* INVSc1 pYES2/CT. Optimalisasi ekstraksi protein dan induksi di dalam *S. cerevisiae* INVSc1 akan dilakukan. Selanjutnya pengujian fungsional menggunakan *glucose assay* dan biosensor. Tujuan penelitian adalah melakukan ekspresi dari gen GOX rekombinan di dalam *S. cerevisiae* INVSc1. Diharapkan GOX tersebut dapat diproduksi dengan kuantitas dan kualitas yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk biosensor glukosa.

METODOLOGI

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB I), Badan Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (BPPT), PUSPIPTEK Serpong, selama 11 bulan (April 2009 - Maret 2010).

BAHAN DAN ALAT

Strain dan Plasmid

Plasmid yang digunakan adalah vektor ekspresi *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen) yang mengandung klon GOX dari *Aspergillus niger*. Plasmid ini dinamakan pYES-GOX.

Medium

Medium cair *yeast peptone dextrose* (YPD cair), medium padat (YPD agar), medium minimal (MM cair) dan (MM agar).

Larutan dan *buffer*

Larutan dan *buffer* yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 2.3.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian : *agar bacteriological* [Oxoid], agarosa [Fermentas], akuades, *ammonium persulfate* (APS) [Sigma], asam asetat [Merck], 30% *Acrylamide/Bis Solution* [Bio-Rad], *Bovine Serum Albumine* (BSA) [Sigma], *coomassie brilliant blue R-250* [Bio-Rad], *destain solution* [Bio-Rad], *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) [Sigma], *distilled water ultrapure* [Gibco], *6x loading dye* [Promega, Fermentas], Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) [Sigma], galactose [Sigma], glycine [Bio-Rad], glucose [Sigma], metanol [Sigma], Phosphate Buffer Saline (PBS) [Sigma], penanda 1 Kb DNA Ladder [Fermentas], Pepton [Sigma], prestained protein molecular weight marker [Fermentas], Sodium Dodesil Sulfat (SDS) [Sigma], TEMED (N, N, N', N' tetramethylethylenediamine) [Promega], Tris Base [Promega], Tween-20 [Bio-Rad], unstained protein molecular weight marker [Fermentas], yeast drop out [Sigma], yeast extract [Oxoid], yeast Nitrogen Base [Sigma], Sephadex G-100 [Pharmacia Fine

Chemicals], sodium fosfat monobasic [Sigma], sodium fosfat monobasic [Sigma], gliserol [MP Biomedicals], PMSF [Sigma], acid washed glass beads [Sigma], feroceen [Aldrich], peroxidase from horseradish [Sigma], 4-aminoantipyrin [Sigma].

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian : Erlenmeyer [Iwaki, Schott Durant], gelas beaker [Schott Durant], tabung mikrosentrifus 1,5 ml [Axygen], pipette tips [Axygen], pipet mikro 0,2—2,0 μ l; 2-20 μ l; 20-200 μ l; 100--1000 μ l [Bio-Rad], gelas ukur 100 ml [Iwaki], tabung falcon 15 ml dan 50 ml [Iwaki, Corning], jarum tanam bulat (ose), tabung reaksi [Pyrex], cawan petri [Petriq], *UV table combi-light* [Vilber Lourmat], monitor [Rainbow CCTV], *printer box* [Sony], *photo documentation* [Vilber Lourmat], timbangan 0,02 – 210 gram [AND GF- 200], aluminium foil [Bagus], pH meter [Thermo], *vortex* [Bio-Rad], *water bath shaker* [Jeio Tech], rotary shaker [Heidolph], alat heat block [VMR], *wrap plastic* [Klinpak], *hot plate* dan *magnetic stirrer* [Ika[®] RH-KT/C], *Pipette Pump* [Bel art Alla], *centrifuge* [Sorvall & Beckman], *microcentrifuge* [Sorvall], *microwave oven* [General Electric], *apparatus electrophoresis* [Bio-Rad], kertas parafilm [Iwaki Novix-II], *timer* [Jpn CBM], *syringe* [Terumo]; membran *filter* bakteri 22 μ m dan 45 μ m [Corning]; kotak es [Marina Cooler]; sarung tangan karet [Sensi gloves], kertas label [Tom and Jerry]; spidol permanen [Snowman]; botol semprot alkohol; masker; kertas tisu; plastik tahan panas; spatula, kamera digital [Nikkon], *laminar air flow cabinet* [ESCO], lemari asam [ESCO], bunsen elektrik [Flamingo], *deep freezer* -80° C [Angelantoni Scientifica], inkubator 37° C [Sanyo], autoklaf [Tomy], mesin pembuat es [Hoshizaki & NordCap], spatel *drygalsky* [Iwaki Pyrex], oven [Bicasa Termostatica], spektrofotometer [Shimadzu UV-160A & Thermo], kuvet silika [Bio-Rad], Sub-Cell[®] GT Agarose gel electrophoresis system [Bio-Rad], perangkat gel documentation [Vilber LourMat], dan perangkat komputer analisis elektroforesis [Intel, Applied Biosystems], kertas saring, lemari pendingin [LG & Toshiba], *coloumn*, potensiostat galvanostat PG580 [Uniscan instruments] .

CARA KERJA

Skema cara kerja dapat dilihat pada Lampiran 2.1.

Pembuatan medium

Cara pembuatan medium pada Lampiran 2.2.

Pembuatan larutan dan *buffer*

Cara pembuatan larutan dan *buffer* pada Lampiran 2.3.

Transformasi dalam *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1

Transformasi dilakukan berdasarkan metode Invitrogen (2003). Sebanyak satu koloni *S. cerevisiae* INVSc1, diinokulasi ke dalam 10 ml medium cair YPD, diinkubasi dalam *shaking water bath incubator* pada suhu 30° C, kecepatan 150 rpm, selama 12—16 jam. Kultur yang telah diinkubasi ditentukan OD₆₀₀. Berdasarkan nilai OD₆₀₀ = 2,39 A, sebanyak 10,44 µl kultur dimasukkan ke dalam 25 ml medium YPD. Inkubasi inokulum dilanjutkan pada suhu 30° C, kecepatan 150 rpm, selama 16 jam. Sebanyak 20 ml kultur disentrifugasi dengan kecepatan 11500 rpm sehingga diperoleh pelet. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan meresuspensi 40 ml TE 1X. Suspensi pelet disentrifugasi kembali dengan kecepatan 11500 rpm. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi kembali dengan 2 ml 1XLiAc/0,5XTE, kemudian sel diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.

Selanjutnya, suspensi pelet diambil 100 µl, dicampur dengan 1 µg pYES2C/T rekombinan atau pYES2/CT utuh dan 100 µg *denatured sheared salmon sperm DNA*. Campuran tersebut ditambahkan 700 µl 1XLiAc/40%PEG-3350/1XTE dan dikocok hingga homogen. Campuran diinkubasi pada suhu 30° C selama 30 menit. Setelah diinkubasi ditambahkan 38 µl DMSO, dikocok sampai homogen. Campuran dilakukan kejutan panas (*heat shock*) pada 42° C selama 7

menit dilanjutkan sentrifugasi selama 10 detik. Pelet diresuspensi dengan 1 ml TE 1X, suspensi disentrifugasi kembali, resuspensi pelet diulangi kembali dengan 50 µl TE 1X. Sebanyak 100 µl hasil resuspensi pelet disebar ke cawan petri mengandung *minimal medium*. Sebagai kontrol untuk proses transformasi adalah *yeast* yang disebar ke cawan petri berisi medium YPD (kontrol positif) dan disebar ke cawan petri yang berisi *minimal medium* (kontrol negatif).

Isolasi Plasmid Rekombinan dari *Saccharomyces cerevisiae*

Isolasi plasmid pYES2/CT rekombinan dari *S. cerevisiae* dilakukan menggunakan *RPM Yeast Plasmid Isolation Kit* berdasarkan prosedur Q-BIOgene (2006). Sebanyak satu koloni khamir diinokulasi ke dalam 3 ml *minimal medium* cair, diinkubasi dalam *shaking water bath incubator* pada suhu 30° C, kecepatan 150 rpm, selama 12—16 jam.

Yeast lysis matrix dimasukkan ke mikrotube steril. Sebanyak 1,5 ml kultur dimasukkan ke mikrotube tempat *yeast lysis matrix* yang kosong, kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4° C, supernatan dibuang. *Yeast lysis matrix* ditambahkan ke dalam pelet, selanjutnya pelet diresuspensi dengan 250 µl larutan *lysis alkaline* dan divortex selama 5 menit.

Sebanyak 250 µl larutan netralisasi ditambahkan dan divortex 30 detik, disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit pada suhu kamar. Supernatan dipindahkan ke *spin column*, selanjutnya ditambahkan 250 µl *glassmilk spin buffer* dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit, cairan yang melewati *spin column* di buang. Ke dalam *spin column* ditambahkan 500 µl *wash solution*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Cairan yang melewati *spin column* dibuang. Prosedur pencucian diulang menggunakan *wash solution* dengan volume yang sama, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. *Spin column* kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru dan steril.

DNA plasmid dielusi dengan penambahan 100 µl akuades steril. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit

pada suhu ruang. Plasmid DNA yang telah dimurnikan disimpan pada suhu -20° C. Selanjutnya plasmid hasil isolasi diverifikasi dengan metode PCR.

Optimalisasi Ekspresi Protein dengan Induksi Galaktosa

Optimalisasi ekspresi protein menggunakan induksi galaktosa dilakukan berdasarkan metode Invitrogen (2003). Sebanyak 1 koloni *S. cerevisiae* INVSc1 membawa gen rekombinan pYES-GOX diinokulasi ke dalam 15 ml *minimal medium* berisi 2% glukosa, diinkubasi selama 16 jam pada suhu 30° C, 150 rpm. Kultur yang telah diinkubasi diukur OD_{600} . Hasil perhitungan OD_{600} dipergunakan untuk menghitung jumlah inokulum yang dimasukkan ke dalam 30 ml *minimal medium* yang mengandung 2%, 4% dan 8% galaktosa (medium induksi). Kultur tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 11.500 rpm selama 5 menit pada suhu kamar, supernatan dibuang, sel diresuspensi dalam medium kemudian diinkubasi pada suhu 30° C. Variasi waktu periode induksi (24, 48, dan 72 jam), 5 ml masing-masing kultur dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi, kemudian kultur diukur OD_{600} dan disentrifugasi dengan kecepatan 11.500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang, kemudian resuspensi pelet dilakukan dengan 500 μ l akuades. Sampel dipindahkan ke tabung mikrosentrifus dan disentrifugasi pada kecepatan maksimum selama 30 detik. Supernatan dibuang. Selanjutnya dilakukan ekstraksi protein dari pelet yang diperoleh. Kontrol negatif berupa perlakuan ekspresi terhadap pYES2/CT utuh (tanpa *insert*).

Optimalisasi Ekstraksi Protein

Optimalisasi ekstraksi protein dilakukan berdasarkan tiga metode. Cara ekstraksi pertama berdasarkan Invitrogen (2003). Pelet yang diperoleh pada optimasi ekspresi protein diresuspensi dengan 500 μ l larutan *breaking buffer*, disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi kembali dengan larutan *breaking buffer* sebanyak 50 sampai 150 μ l dan ditambahkan *acid-washed glass beads*.

Kemudian suspensi pelet diaduk menggunakan vortex selama 30 detik dan diletakkan di wadah berisi es selama 30 detik. Prosedur tersebut dilakukan sebanyak 4 kali. Suspensi pelet disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dan pelet sisa ekstraksi diambil dengan hati-hati dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus baru dan steril.

Cara ekstraksi kedua berdasarkan modifikasi dari metode Invitrogen (2003). Pelet yang diperoleh pada langkah ekspresi protein diresuspensi dengan 500 μ l larutan *breaking buffer*, disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi kembali dengan larutan *breaking buffer* sebanyak 50 sampai 150 μ l, kemudian suspensi pelet dihancurkan dengan sonikasi selama 5 detik dan diletakkan di dalam kotak es selama 5 detik. Prosedur ini dilakukan sebanyak 20 kali pengulangan. Pelet ditambahkan *acid-washed glass beads* kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 30 detik dan diletakkan di wadah yang berisi es selama 30 detik. Prosedur tersebut dilakukan sebanyak 4 kali. Suspensi pelet disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dan pelet sisa ekstraksi diambil dengan hati-hati dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus baru dan steril.

Cara ekstraksi ketiga berdasarkan modifikasi dari metode Invitrogen (2003). Pelet yang diperoleh pada langkah ekspresi protein diresuspensi dengan 500 μ l larutan *breaking buffer*, disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi kembali dengan larutan *breaking buffer* sebanyak 50 sampai 150 μ l, kemudian suspensi pelet dihancurkan dengan sonikasi selama 5 detik dan diletakkan di dalam kotak es selama 5 detik selama 20 kali pengulangan. Suspensi pelet disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dan pelet sisa ekstraksi diambil dengan hati-hati dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus baru dan steril. Selanjutnya konsentrasi protein yang diperoleh ditentukan dengan menggunakan *Bovine Serum Albumine* (BSA) sebagai standar.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Elektroforesis hasil ekspresi protein dilakukan dengan modifikasi metode Sambrook & Russell (2001). Elektroforesis dilakukan pada kedua sisi elektroda secara bersamaan. Plat kaca piranti elektroforesis dipasang dan kedua sisinya dijepit. Gel pemisah dimasukkan ke dalam plat dan dibiarkan mengeras, kemudian gel penumpuk dimasukkan dan sisir pencetak sumur dipasang. Sisir diangkat setelah gel mengeras. *Buffer* elektroforesis yang telah diencerkan 5X dimasukkan ke dalam piranti elektroforesis bagian bawah dan diusahakan tidak ada gelembung udara, kemudian sisa *buffer* dimasukkan ke dalam piranti elektroforesis bagian atas hingga gel terendam.

Sebanyak 10 µg sampel dicampur dengan SDS *gel-loading buffer* dan dipanaskan pada 65° C selama 5 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam cetakan sumur. Sebagai kontrol adalah hasil ekstraksi protein dari *S. cerevisiae* INVSc1 yang mengandung pYES2/CT utuh dan sebagai pembanding ukuran pita ditambahkan 3 µl penanda protein ke dalam sumuran gel. Piranti dijalankan (*running*) pada tegangan listrik 200 V selama 35 menit (hingga hampir mencapai bagian bawah gel). Setelah selesai, kedua gel diangkat dan satu gel direndam dalam biru comassie selama 5 menit, selanjutnya direndam beberapa kali dalam larutan *destaining* sampai pita protein terlihat.

Glucose assay

Pengukuran *glucose assay* dilakukan dengan metode Yamaguchi *et al.* (2007). Protein hasil ekstraksi diukur konsentrasinya kemudian dimasukkan ke dalam larutan *glucose assay* (Lampiran 2.2) dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37° C. Perubahan warna yang terjadi diamati dan diukur absorbansinya pada $\lambda = 500$ nm. Sebagai kontrol adalah *glucose oxidase* komersial (kontrol positif) dan protein hasil ekstraksi pYES2/CT (kontrol negatif).

Pemisahan dan Purifikasi dengan Sephadex G-100

Pemisahan dan purifikasi hasil ekstraksi dengan sephadex G-100 dilakukan dengan metode Bailey (2002). Sephadex G-100 dilarutkan dengan 1x PBS. Sephadex yang telah dilarutkan kemudian dimasukkan ke dalam kolom (*syringe*) sepanjang 20 cm dan biarkan mengeras, gel tersebut kemudian di cuci dengan melewati 1x PBS. Setiap fraksi supernatan dilewatkan ke dalam gel yang sudah siap dan setiap fraksi ditampung untuk dikonfirmasi tingkat pemisahan proteinnya menggunakan SDS-PAGE 8%.

Pengujian Biosensor

Pengujian biosensor dilakukan dengan modifikasi metode Yuqing *et al.* (2006). Sebanyak 20 µl feroceen diteteskan diatas *working electrode* strip biosensor dan dibiarkan hingga kering. Fraksi protein hasil purifikasi yang mengandung gen target diteteskan diatas *working electrode*, dibiarkan kering kemudian ditambahkan glukosa sebanyak 10 µl diatas *working* dan *reference electrode*. Strip dimasukkan ke dalam potensiostat galvanostat untuk mengetahui ada atau tidaknya arus redoks yang dihasilkan.

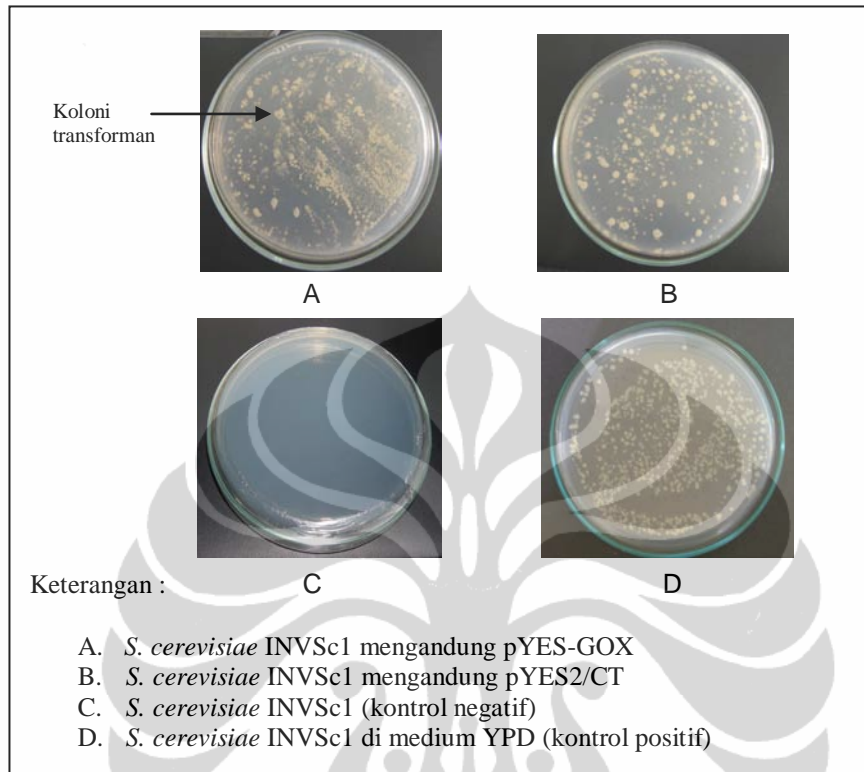
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Plasmid rekombinan pYES-GOX berhasil ditransformasi ke dalam *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 menggunakan metode LiAc

1.1. Transformasi plasmid rekombinan pYES-GOX ke dalam *S. cerevisiae* INVSc1

Hasil transformasi beserta kontrol positif dan negatif dapat dilihat pada Gambar 2.1.1.1. Transformasi plasmid pYES2/CT menghasilkan 536 koloni dan transformasi plasmid rekombinan pYES-GOX menghasilkan 292 koloni. *S. cerevisiae* INVSc1 pada minimal medium sebagai kontrol negatif tidak terdapat

koloni tumbuh, sedangkan *S. cerevisiae* INVSc1 di medium YPD sebagai kontrol positif menghasilkan 1.036 koloni.



Gambar 2.1.1.1 Hasil transformasi pYES-GOX ke dalam *S. cerevisiae* INVSc1 pada minimal medium.

Kontrol negatif sel *S. cerevisiae* INVSc1 yang tidak ditransformasi dengan pYES-GOX tidak dapat tumbuh pada medium seleksi (minimal medium). Hal ini disebabkan karena *S. cerevisiae* INVSc1 tidak mengandung gen *URA3* yang berfungsi sebagai penyeleksi pada minimal medium, sedangkan kontrol positif *S. cerevisiae* INVSc1 dapat tumbuh pada media YPD. Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses transformasi berhasil dengan baik karena tidak terjadi kontaminasi. Selain itu, medium selektif juga berfungsi dengan baik.

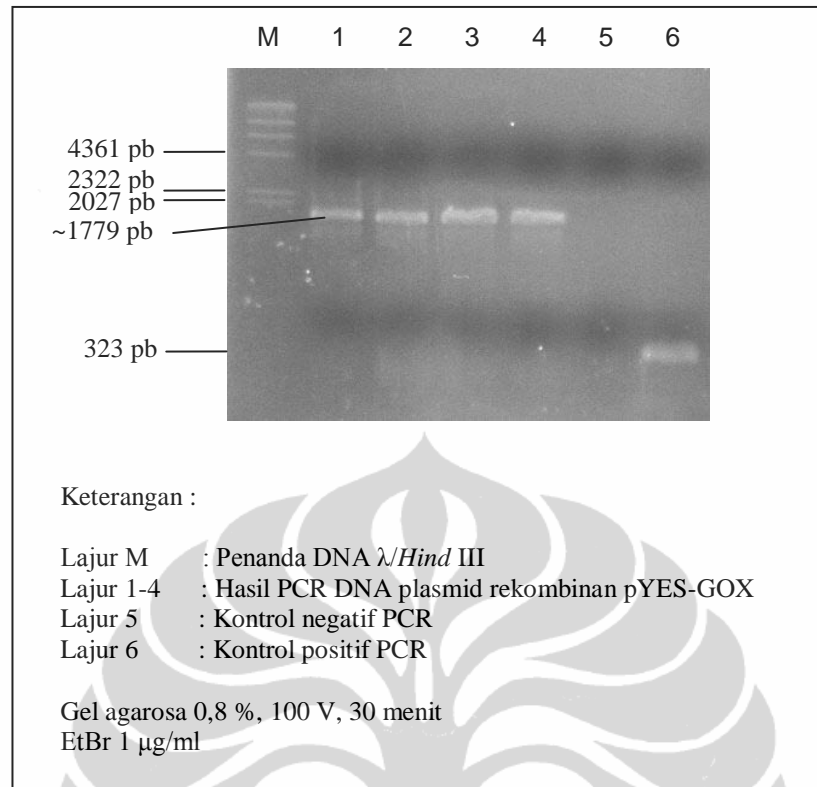
Transformasi plasmid ke dalam sel yeast dengan menggunakan Lithium Acetat (LiAc) dan Poliethylene glycol (PEG) telah banyak digunakan karena dapat menghasilkan efisiensi transformasi yang optimal. Transformasi menggunakan LiAc/PEG digunakan untuk mengintroduksi plasmid spesifik ke dalam sel yeast, bertujuan untuk memperbaiki dan menganalisis sejumlah kecil

transforman yang didapatkan dengan menggunakan metode transformasi lainnya (Gietz & Woods 2006).

Plasmid rekombinan GOX diintroduksi ke dalam *S. cerevisiae* INVSc1 melalui transformasi dengan kejutan panas (*heat shock*) dan ditumbuhkan pada medium seleksi minimal medium. Yeast *S. cerevisiae* INVSc1 diketahui dapat tumbuh dengan baik pada suhu 30° C. Hasil transformasi optimal menggunakan sel *S. cerevisiae* INVSc1 diperoleh jika kejutan panas dilakukan pada suhu 42° C selama 7 menit. Kejutan panas merupakan tahap penting dalam transformasi. Kemungkinan molekul DNA asing yang telah menempel pada dinding sel terintroduksi ke dalam sitoplasma dengan pemberian kejutan panas (Brown 1995).

1.2. Isolasi dan verifikasi plasmid rekombinan pYES-GOX dari *S. cerevisiae* INVSc1

Isolasi hasil transformasi plasmid rekombinan pYES-GOX dari *S. cerevisiae* INVSc1 dilakukan dengan menggunakan *RPM Yeast Plasmid Isolation Kit* berdasarkan prosedur Q-BIOgene (2006). Hasil isolasi kemudian diverifikasi untuk memastikan apakah hasil isolasi mengandung plamid rekombinan. Verifikasi dilakukan dengan tehnik PCR.



Gambar 2.1.2.1 Elektroforesis gel agarosa hasil verifikasi PCR DNA plasmid rekombinan pYES-GOX dari *S. cerevisiae* INVSc1

Isolasi DNA plasmid hasil transformasi dilakukan untuk menentukan apakah koloni-koloni transforman mengandung plasmid rekombinan yang diharapkan atau tidak. Keberhasilan proses isolasi dilanjutkan dengan verifikasi menggunakan PCR karena ukuran DNA *S. cerevisiae* INVSc1 kecil tidak dimungkinkan jika langsung dielektroforesis maka DNA tersebut harus diperbanyak terlebih dahulu.

Gambar 2.1.2.1 lajur 1 sampai 4 terlihat pita pada posisi sekitar 1.779 pb yang menunjukkan gen GOX. Sedangkan, pada lajur ke 5 (kontrol negatif) tidak terlihat adanya pita dan pada lajur ke 6 (kontrol positif) terlihat pita pada posisi sekitar 322 pb. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi PCR berjalan baik dan tidak terjadi kontaminasi selama proses PCR. Dari hasil ini disimpulkan bahwa koloni transformasi mengandung plasmid rekombinan pYES-GOX.

Keberhasilan proses PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), oligonukleotida primer, DNA *template*, komposisi larutan *buffer*, jumlah siklus reaksi dan enzim yang digunakan (enzim

Taq DNA polimerase) (Sambrook & Russell 2001). Proses PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94° C selama 5 menit. Denaturasi berikutnya dilakukan pada suhu 94° C selama 1 menit. Suhu denaturasi tergantung pada komposisi GC. Semakin tinggi kandungan GC, maka semakin tinggi suhu yang dibutuhkan untuk memisahkan DNA untai ganda menjadi tunggal (Kramer & Coen 1998).

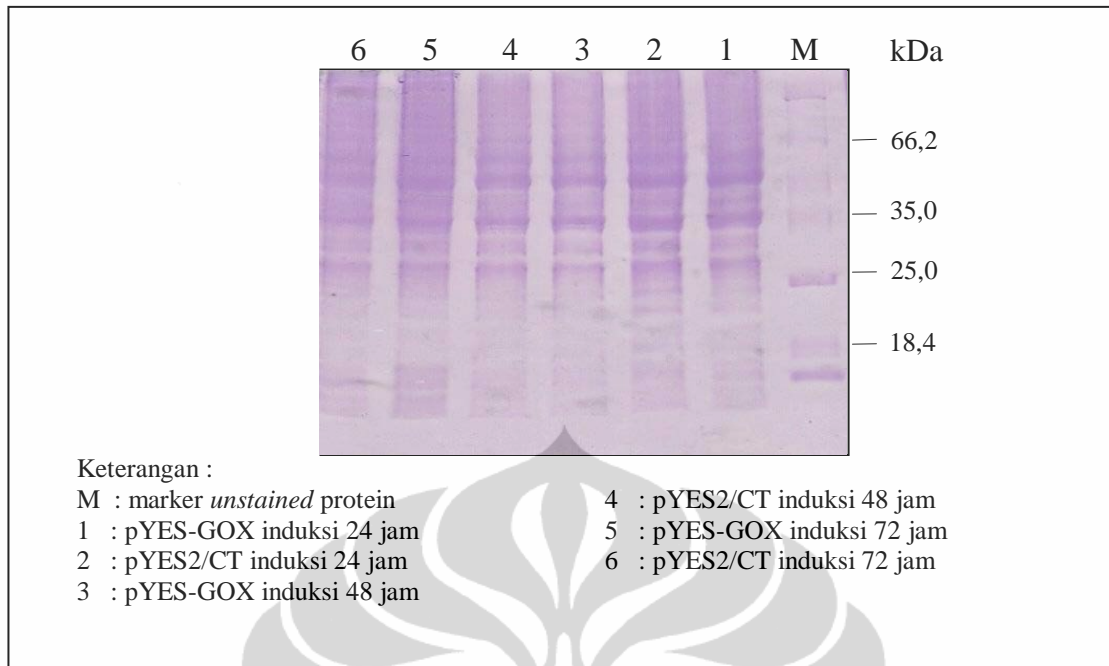
Tahap PCR selanjutnya yaitu *annealing*. Suhu *annealing* sebesar 59° C selama 1 menit dapat menghasilkan produk PCR optimal. Hasil optimasi suhu *annealing* tersebut masih berada dalam kisaran suhu *annealing* menurut Invitrogen (2004), yaitu 55—65° C. Hasil PCR yang optimal juga dipengaruhi oleh tahap polimerisasi. Suhu dan waktu dibutuhkan dalam tahap polimerisasi yaitu 72° C selama 2 menit dan disempurnakan pada suhu 72° C selama 5 menit. Kisaran suhu ekstensi yang dibutuhkan jika menggunakan enzim Taq polymerase adalah antara 72—78° C (Sambrook & Russell 2001).

2. Protein rekombinan GOX terekstraksi dengan baik menggunakan metode vortex dengan penambahan *glass beads*

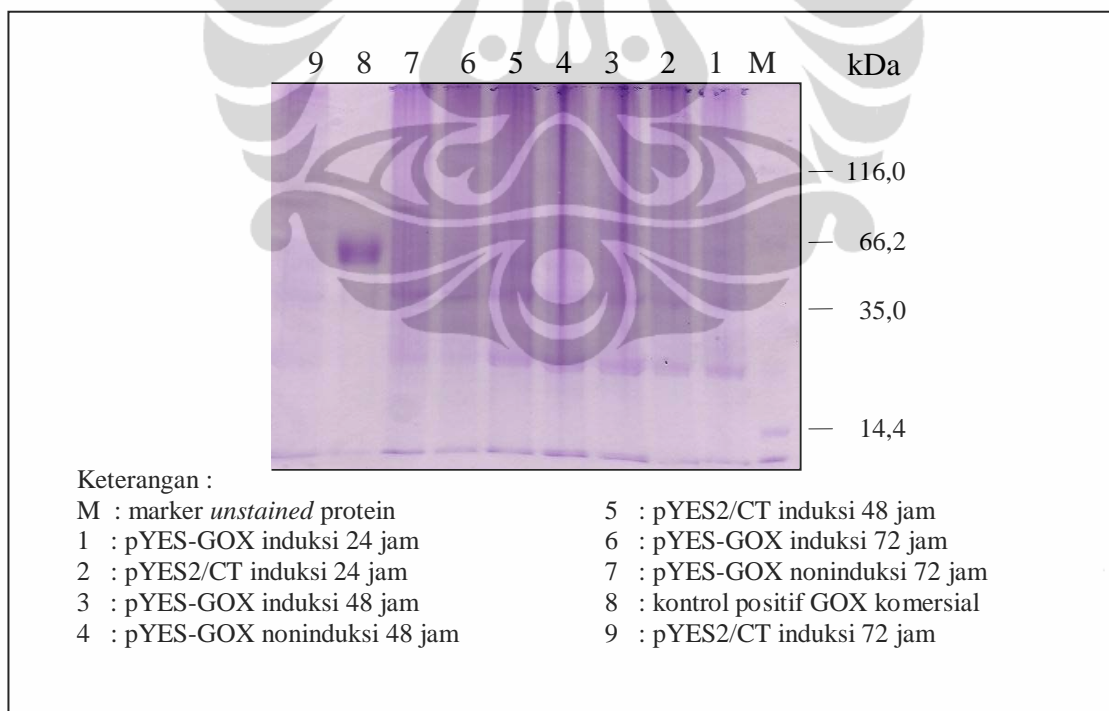
2.1. Optimalisasi metode ekstraksi protein

Ekspresi protein rekombinan pYES-GOX dilakukan dalam sistem ekspresi yeast *S. cerevisiae* INVSc1. Masing-masing variasi kadar induksi dioptimalisasi dengan tiga variasi waktu induksi yaitu 24, 48 dan 72 jam. Hasil ekstraksi diperlihatkan pada 8% SDS-Page.

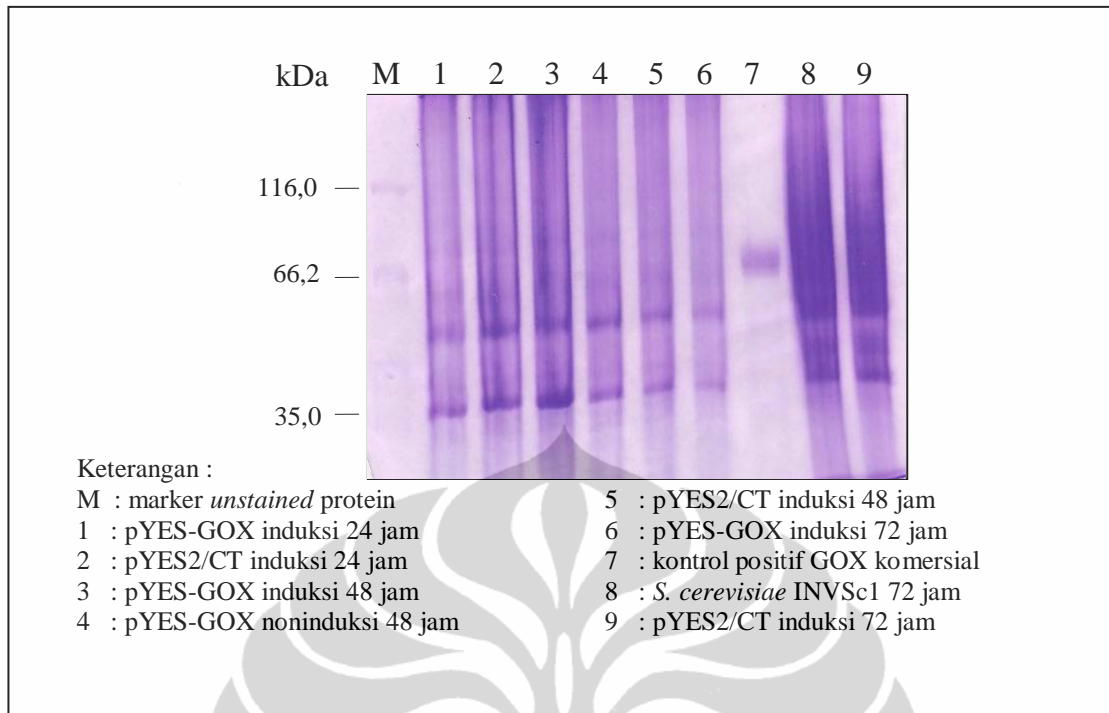
Optimalisasi cara ekstraksi protein dilakukan dengan tiga metode berbeda. Hal tersebut bertujuan untuk mendapatkan hasil protein maksimal. Metode pertama menggunakan vortex dengan penambahan *glass beads* (Gambar 2.2.1.1), metode kedua menggunakan sonikasi, vortex dengan penambahan *glass beads* (Gambar 2.2.1.2) dan metode ketiga menggunakan sonikasi (Gambar 2.2.1.3).



Gambar 2.2.1.1 Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan *glass beads*, induksi 8% galaktosa.



Gambar 2.2.1.2 Analisis SDS-PAGE metode : sonikasi, vortex dengan penambahan *glass beads*, induksi 8% galaktosa.



Gambar 2.2.1.3 Analisis SDS-PAGE metode : sonikasi, induksi 8% galaktosa.

Hasil optimalisasi metode ekstraksi protein berupa fase supernatan induksi 8% galaktosa memperlihatkan pada metode vortex dengan *glass beads* (Gambar 2.2.1.1) pita protein yang jelas di bagian atas gel sedangkan di bagian bawah gel terlihat pita protein tipis. Metode sonikasi, vortex dengan *glass beads* (Gambar 2.2.1.2) jalur 3 dan 4 terlihat pita protein *smear*, sedangkan pada metode sonikasi (Gambar 2.2.1.3) memperlihatkan pita protein *smear* pada semua jalur.

Pita protein yang terlihat *smear* (tidak fokus) menandakan kemungkinan protein mengalami degradasi atau protein belum terlisis secara sempurna sehingga hasil yang didapatkan rendah (Seidman & Moore 2000). Gambar analisis SDS-PAGE hasil optimalisasi metode ekstraksi protein keseluruhan dapat dilihat pada Lampiran 2.5.

Hasil yang didapatkan dari hasil optimalisasi metode ekstraksi protein GOX, fase supernatan, pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit adalah metode ekstraksi yang optimal yaitu metode vortex dengan penambahan *glass beads*. Pada metode ini, hanya sedikit sampel yang mengalami degradasi dan proses lisis terjadi lebih sempurna, walaupun tidak menunjukkan perbedaan ekspresi yang jelas dengan metode ekstraksi lainnya. Penggunaan vortex dengan

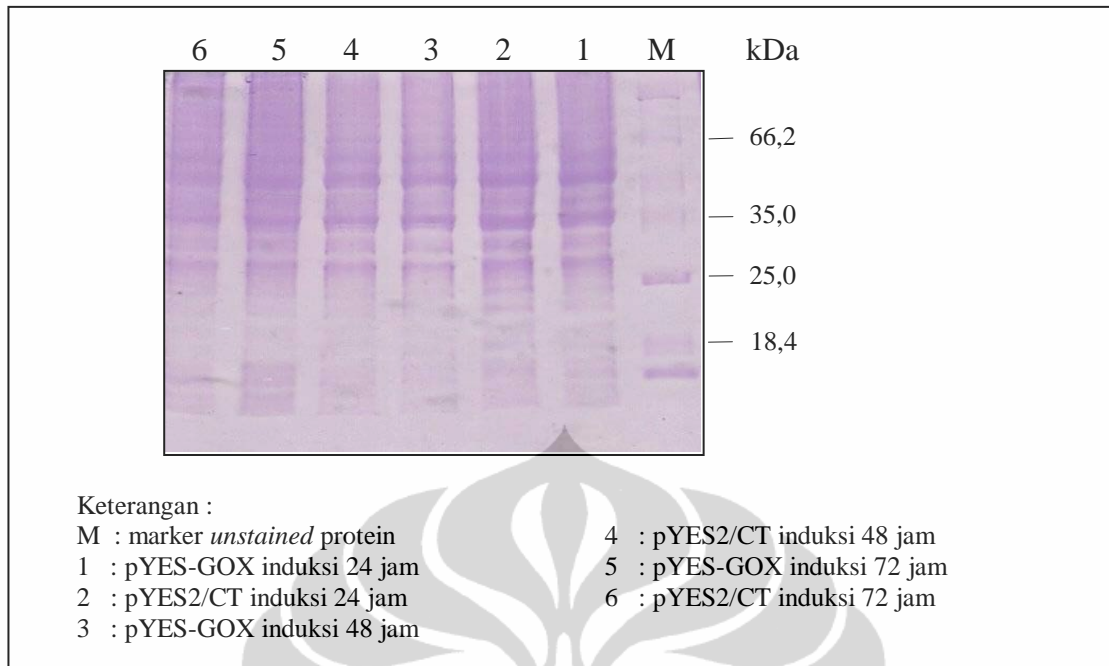
penambahan *glass beads* saat proses ekstraksi protein bertujuan untuk melisiskan sel secara sempurna (Invitrogen 2003).

Pelisisan sel dapat terjadi secara sempurna apabila sampel protein tetap berada dalam keadaan dingin untuk menghindari terjadinya denaturasi protein. Penggunaan *ice box* pada proses ekstraksi berfungsi untuk mempertahankan sistem biologi pada suhu 4° C. Protein yang diperoleh disimpan pada -80° C karena suhu dingin dapat mengurangi pertumbuhan mikroba dan juga memperlambat degradasi protein oleh enzim-enzim proteolitik (Seidman & Moore 2000).

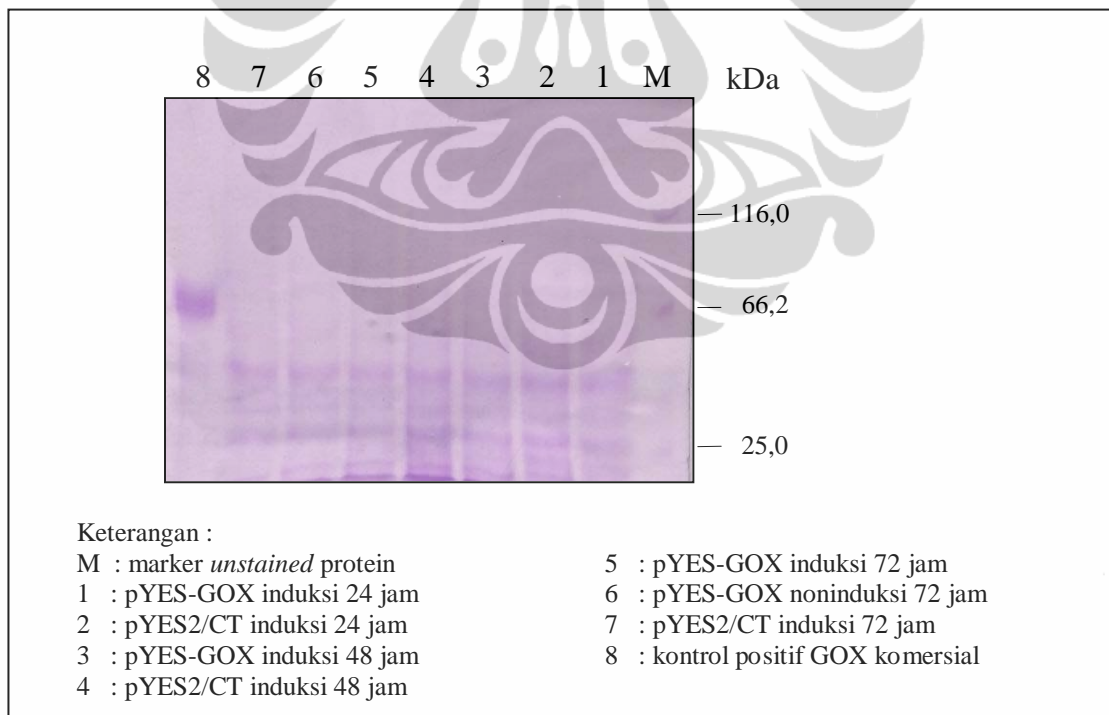
3. Protein rekombinan GOX kemungkinan besar terdapat pada fase supernatan, namun belum dapat diinduksi dengan optimal

3.1. Analisis keberadaan protein rekombinan GOX

Analisis keberadaan protein GOX dilakukan pada sampel hasil ekstraksi protein. Hasil ekstraksi protein yang didapatkan berupa supernatan (Gambar 2.3.1.1) dan pelet (Gambar 2.3.1.2) yang ditunjukkan pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit untuk fase supernatan dan pemanasan 100° C untuk fase pelet. Analisis bertujuan untuk mengetahui keberadaan protein GOX di fase supernatan atau pelet hasil ekstraksi.



Gambar 2.3.1.1 Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan *glass beads*, induksi 8% galaktosa, fase supernatan.



Gambar 2.3.1.2 Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan *glass beads*, induksi 8% galaktosa, fase pelet.

Hasil analisis letak protein menggunakan sampel hasil ekstraksi vortex dengan *glass beads* berupa fase supernatan induksi 8% galaktosa (Gambar 2.3.1.1) terlihat protein pada bagian atas gel sedangkan fase pelet (Gambar 2.3.1.2) terlihat protein pada bagian bawah gel. Protein yang berada pada bagian atas gel menandakan bahwa protein tersebut memiliki berat molekul lebih besar dibandingkan protein di bagian bawah gel. Molekul lebih kecil dapat bergerak dengan mudah di dalam gel, sedangkan molekul lebih besar hampir tidak bergerak. Molekul dengan ukuran sedang dapat bergerak di dalam gel sesuai ukurannya (Stryer 2000).

Analisis keberadaan protein GOX menunjukkan perbedaan ekspresi yang jelas antara fase supernatan dan fase pelet. Pada fase supernatan protein terekstraksi memiliki berat molekul lebih besar dibandingkan dengan protein fase pelet. Protein GOX memiliki berat molekul sekitar 66 kDa, oleh karena itu, walaupun hasil SDS-PAGE tidak memperlihatkan adanya protein spesifik berukuran 66 kDa, akan tetapi memperlihatkan fase supernatan kemungkinan mengandung protein GOX dengan berat molekul diantara 35—116 kDa. Gambar analisis SDS-PAGE keberadaan protein GOX keseluruhan dapat dilihat pada Lampiran 2.5.

Proses pelisisan sel bertujuan agar sel yeast menjadi hancur dan protein target terlepas ke dalam supernatan, namun tidak semua protein target dapat terlepas ke dalam supernatan karena masih terdapat sel yang tidak lisis sehingga protein target masih berada di fase pelet. Hal ini mungkin terjadi karena terbentuknya *inclusion bodies* yang disebabkan ekspresi berlebih dari suatu protein tertentu pada sel mikroorganisme sehingga mengganggu pelisisan sel dengan baik.

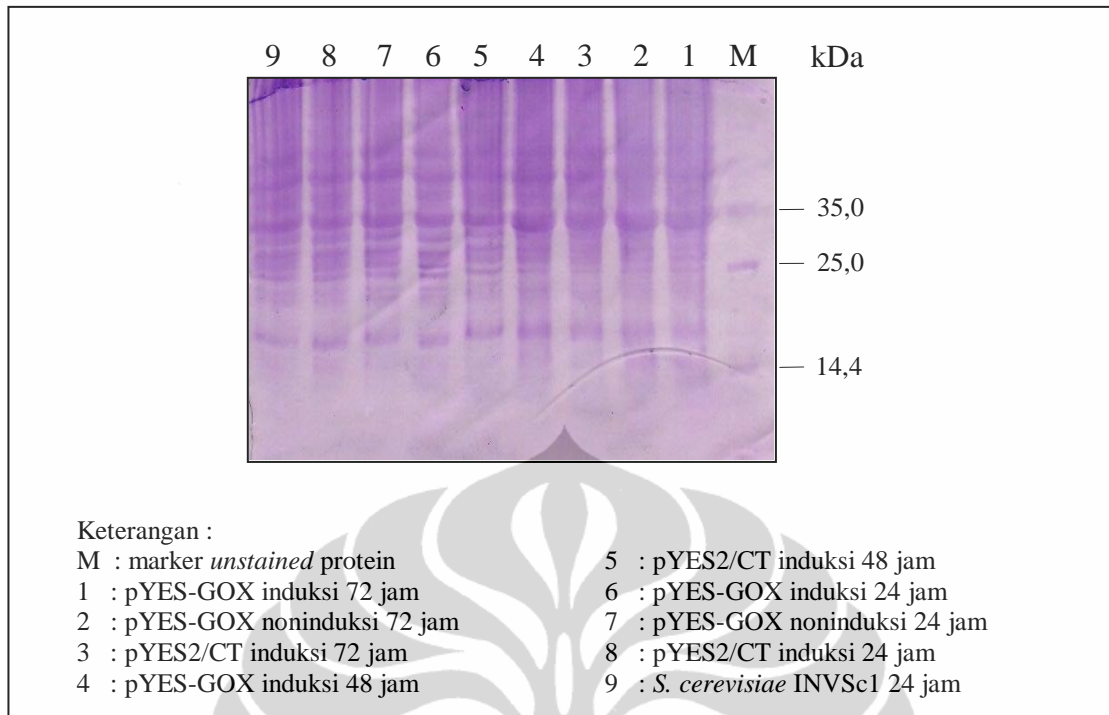
Fase supernatan hasil ekstraksi protein dilakukan pemanasan 65° C selama 5 menit dan fase pelet dilakukan pemanasan 100° C selama 5 menit sebelum sampel dimasukkan ke dalam cetakan sumur SDS-PAGE. Protein mempunyai sifat dapat membentuk ikatan hidrofobik baik dengan sesama protein maupun dengan molekul lain seperti lipid. Pemanasan sampel dapat menyebabkan melemahnya ikatan tersebut dan SDS dapat dengan mudah berikatan dengan daerah hidrofobik sehingga denaturasi protein menjadi sempurna (Stryer 2000).

Proses ekstraksi dengan menggunakan sonikator maupun vortex, sel-sel yang pecah mengandung ion-ion logam seperti Ca^{2+} dan Mg^{2+} . Ion logam tersebut dapat mempercepat pembentukan ikatan disulfida dan juga bertindak sebagai kofaktor yang diperlukan oleh enzim protease. Penambahan *chelating agen*, seperti ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) dengan konsentrasi akhir 1 mM akan mengikat ion-ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} dari larutan (Seidman & Moore 2000). Sel-sel yang pecah akan mengeluarkan enzim protease. Oleh karena itu, diperlukan agen penghambat protease untuk mencegah terjadinya degradasi protein.

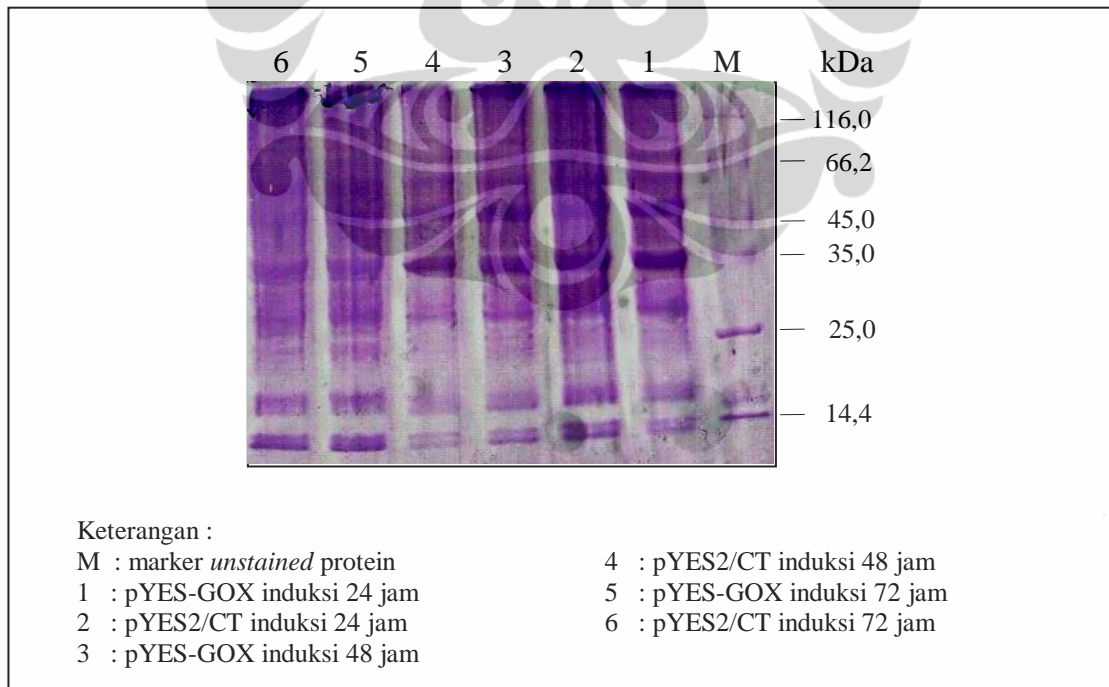
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) adalah salah satu contoh dari agen penghambat protease. Selain ditambahkan PMSF, aktifitas enzim protease dapat dikurangi dengan cara menyimpan protein pada suhu dingin dan bekerja dengan cepat ketika mengisolasi protein dari sel (Seidman & Moore 2000).

3.2. Optimalisasi konsentrasi induser

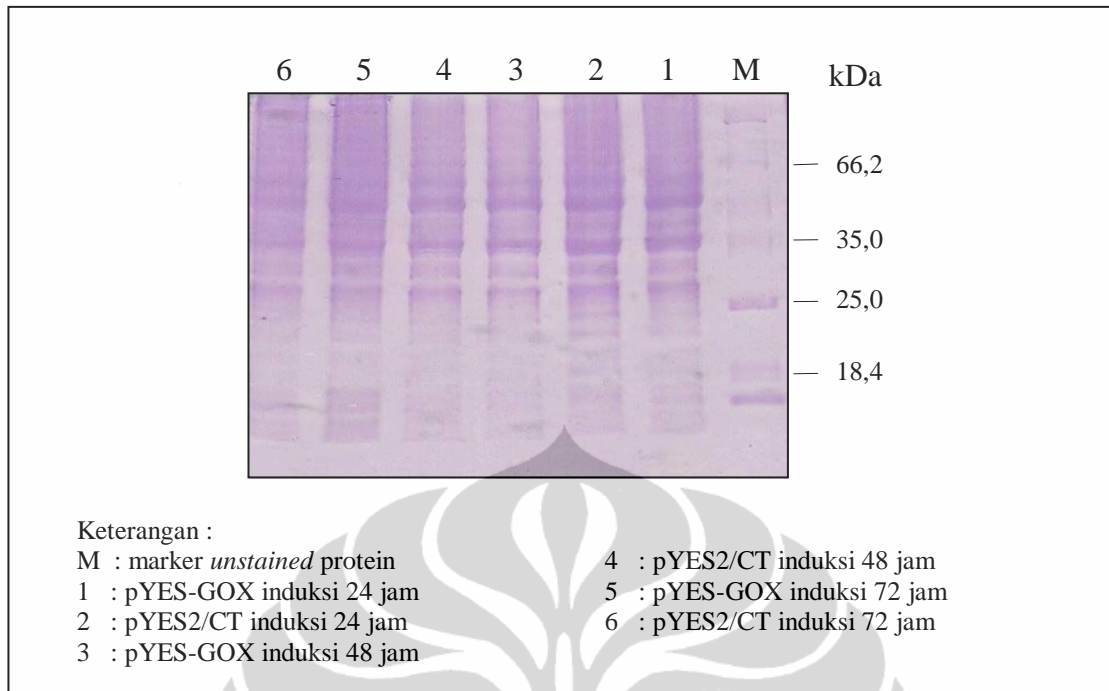
Ekspresi protein rekombinan berlangsung dengan penambahan galaktosa berperan sebagai induser ekspresi. Protein rekombinan diinduksi dengan tiga variasi konsentrasi induser yaitu dengan 2, 4 dan 8 % induksi galaktosa. Hasil optimalisasi dianalisis dengan 8% SDS-PAGE.



Gambar 2.3.2.1 Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan *glass beads*, 2% galaktosa.



Gambar 2.3.2.2 Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan *glass beads*, 4% galaktosa.



Gambar 2.3.2.3 Analisis SDS-PAGE metode : vortex dengan penambahan *glass beads*, induksi 8% galaktosa.

Hasil optimalisasi konsentrasi induser galaktosa dengan metode vortex dengan *glass beads* konsentrasi 2% galaktosa menunjukkan pita protein yang jelas di bagian atas gel sedangkan di bagian bawah gel terlihat pita protein tipis (Gambar 2.3.2.1) dan pada konsentrasi 4% galaktosa pita protein juga terlihat jelas di bagian atas dan bawah gel (Gambar 2.3.2.2). Pada konsentrasi 8% galaktosa, terlihat pita protein yang jelas pada bagian atas gel dan pita protein tipis pada bagian bawah gel (Gambar 2.3.2.3).

Hasil yang didapatkan dari hasil optimalisasi konsentrasi induser galaktosa, metode ekstraksi protein vortex dengan *glass beads* pada 8% SDS-PAGE tidak menunjukkan perbedaan yang jelas. Perbedaan yang tidak jelas pada beberapa konsentrasi induser yang berbeda kemungkinan disebabkan karena galaktosa sebagai induser menginduksi protein GOX dalam jumlah yang kecil. Ekspresi protein dalam jumlah kecil menyebabkan protein tidak terlihat jelas pada gel hasil SDS-PAGE. GOX rekombinan dapat terlihat dengan jelas setelah dilakukan proses purifikasi (Crognale *et al.* 2006).

Pemberian induser dengan konsentrasi yang berbeda-beda bertujuan untuk mendapatkan hasil ekspresi protein rekombinan pYES-GOX yang optimal. Vektor ekspresi pYES2/CT mengandung promotor *GAL 1* agar dapat dilakukan induksi dengan galaktosa pada ekspresi protein gen hasil pengklonaan (Invitrogen 2003). Gambar analisis SDS-PAGE hasil optimalisasi konsentrasi induser galaktosa keseluruhan dapat dilihat pada Lampiran 2.5.

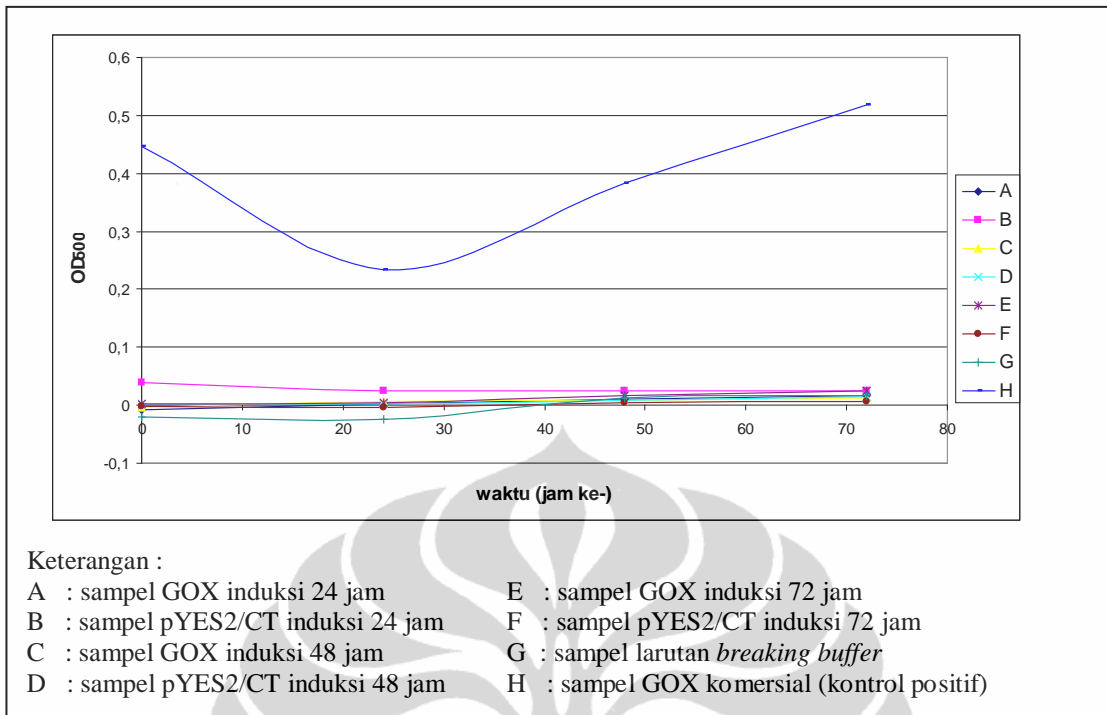
Sampel yang mengalami degradasi baik pada fase supernatan maupun fase pelet terlihat tidak fokus (*smear*) pada gel SDS-PAGE. Salah satu penyebab terjadinya pita *smear* (tidak fokus) pada semua hasil optimalisasi metode ekstraksi protein karena terjadi proteolisis protein oleh *endogenous protease*. Aktivitas proteolitik dapat dicegah dengan penambahan agen penghambat protease pada proses ekstraksi protein. PMSF adalah agen penghambat protease berfungsi untuk mencegah terjadinya degradasi protein disebabkan oleh *endogenous protease* pada proses proteolisis protein (Ausubel *et al.* 1995). Penelitian menggunakan *buffer* untuk proses ekstraksi protein berisi PMSF akan tetapi hasil SDS-PAGE masih terdapat pita *smear*, kemungkinan disebabkan karena pada saat proses ekstraksi suhu pada *ice box* tidak optimal dingin sehingga menyebabkan protein terdegradasi.

4. Protein rekombinan GOX fungsional

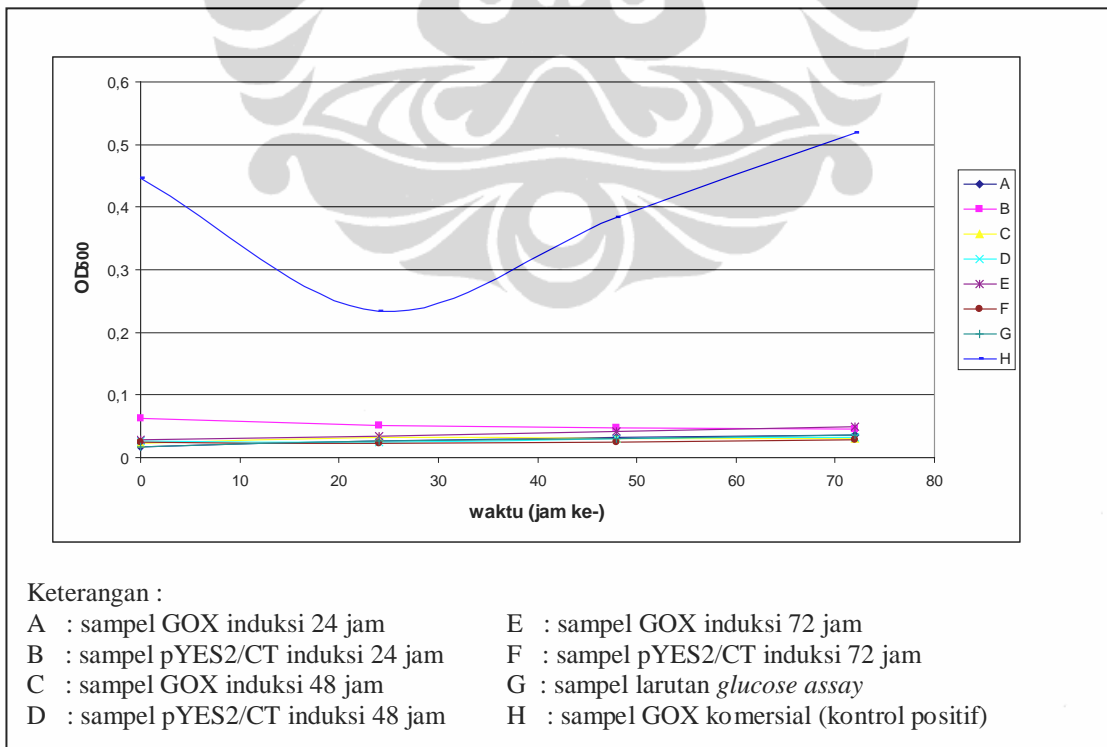
4.1. Uji *Glucose Assay*

β -D-*glucose* digunakan sebagai substrat untuk enzim GOX yang aktivitasnya diukur melalui absorbansi. Perubahan absorbansi diikuti dengan perubahan warna menjadi merah. Perubahan warna mengindikasikan adanya reaksi yang terjadi antara enzim GOX dengan glukosa.

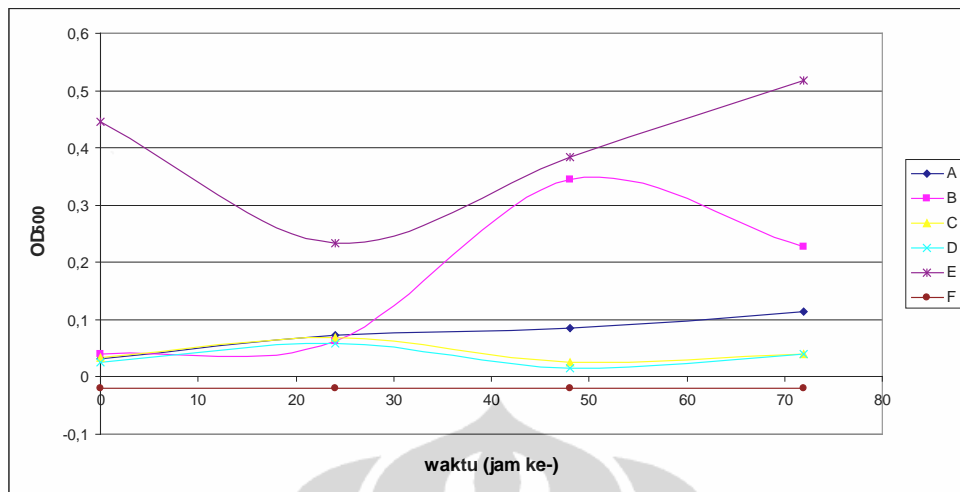
Sampel optimalisasi metode ekstraksi dan optimalisasi waktu induksi diuji menggunakan *liquid glucose assay* dan diukur dengan menggunakan absorbansi pada panjang gelombang 500 nm (OD_{500}) (Yamaguchi *et al.* 2007) (Gambar 2.4.1.1—2.4.1.4).



Gambar 2.4.1.1 Hasil *glucose assay* (OD_{500}), konsentrasi protein $5000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, induksi 4% galaktosa, blangko larutan *glucose assay*.



Gambar 2.4.1.2 Hasil *glucose assay* (OD_{500}), konsentrasi protein $5000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, induksi 4% galaktosa, blangko *breaking buffer*.

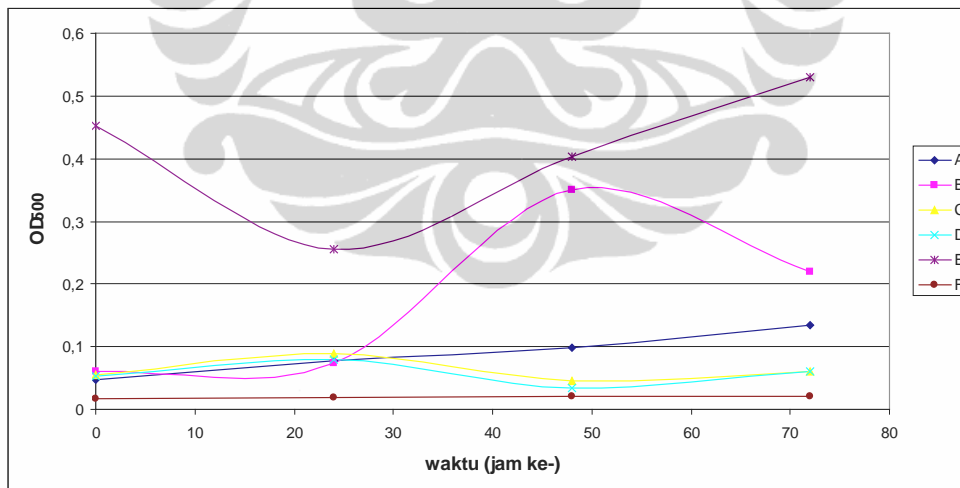


Keterangan :

- A : sampel GOX induksi 24 jam
- B : sampel GOX induksi 48 jam
- C : sampel GOX induksi 72 jam
- D : sampel pYES2/CT induksi 72 jam

- E : sampel GOX komersial (kontrol positif)
- F : sampel larutan *breaking buffer*

Gambar 2.4.1.3 Hasil *glucose assay* (OD_{500}), konsentrasi protein $5000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, induksi 8% galaktosa, blangko larutan *glucose assay*.



Keterangan :

- A : sampel GOX induksi 24 jam
- B : sampel GOX induksi 48 jam
- C : sampel GOX induksi 72 jam
- D : sampel pYES2/CT induksi 72 jam

- E : sampel GOX komersial (kontrol positif)
- F : sampel larutan *glucose assay*

Gambar 2.4.1.4 Hasil *glucose assay* (OD_{500}), konsentrasi protein $5000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, induksi 8% galaktosa, blangko *breaking buffer*.

Uji *glucose assay* konsentrasi induser 4% galaktosa (Gambar 2.4.1.1 dan 2.4.1.2), sampel kontrol positif berupa GOX komersial menunjukkan perubahan absorbansi yang jelas sampai jam ke-72, sedangkan untuk sampel GOX rekombinan induksi 24, 48 dan 72 jam tidak memperlihatkan perubahan absorbansi yang jelas sampai jam ke-72.

Pada uji *glucose assay* menggunakan konsentrasi induser 8% galaktosa (Gambar 2.4.1.3 dan 2.4.1.4), sampel kontrol positif berupa GOX komersial menunjukkan perubahan absorbansi yang jelas sampai jam ke-72. sampel GOX rekombinan induksi 48 jam memperlihatkan perubahan absorbansi yang jelas pada jam ke-48, sedangkan sampel GOX rekombinan induksi 24 jam mengalami perubahan kenaikan absorbansi yang tidak terlalu jelas pada jam ke-48. Sampel GOX rekombinan induksi 72 jam dan sampel kontrol negatif berupa pYES2/CT tidak memperlihatkan perubahan absorbansi yang jelas.

Hasil uji *glucose assay* untuk seluruh variasi konsentrasi induser menunjukkan bahwa dalam kondisi induksi 8% galaktosa selama 48 jam ekspresi protein GOX rekombinan fungsional. Ekspresi protein GOX rekombinan fungsional ditandai dengan perubahan absorbansi yang jelas (Gambar 2.4.1.3 dan 2.4.1.4) yang diikuti dengan perubahan warna larutan menjadi merah. Perubahan warna menjadi merah pada kontrol positif dimulai setelah 5 menit pertama setelah dimasukkan GOX komersial ke dalam *liquid assay* GOX, sedangkan perubahan warna pada sampel GOX rekombinan dimulai dari jam ke-24 sampai jam ke-72 inkubasi. Adanya perbedaan waktu yang dibutuhkan enzim GOX komersial dan GOX rekombinan untuk berubah warna menjadi merah kemungkinan disebabkan karena adanya perbedaan kemurnian GOX komersial dengan GOX rekombinan (Yamaguchi 2007).

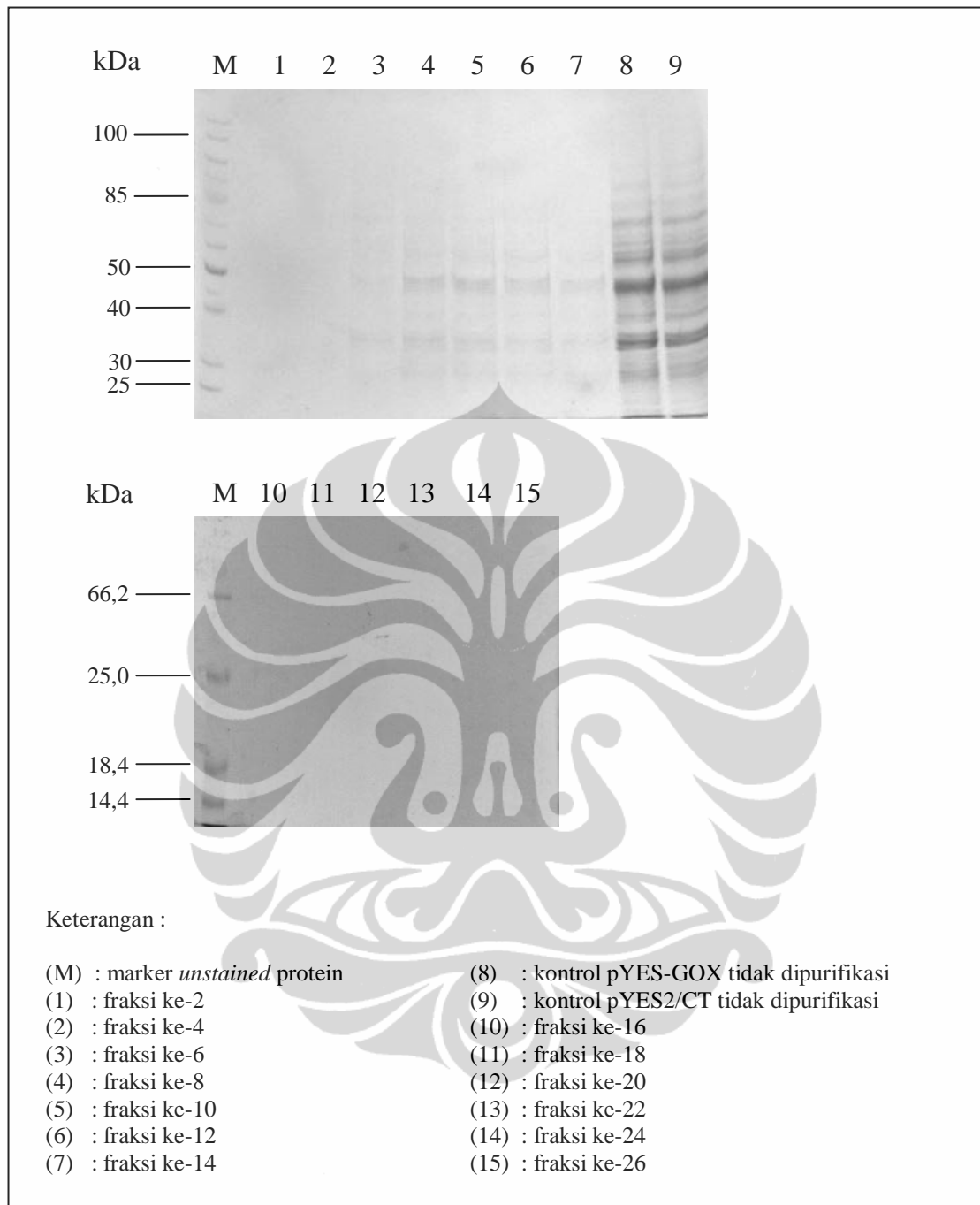
Liquid assay GOX yang telah ditambahkan sampel GOX diinkubasi pada suhu 37° C dan diukur absorbansinya pada OD₅₀₀, karena enzim GOX dapat bekerja secara optimal pada suhu 37° C (El-Sherbeny 2005). Adanya perubahan warna memudahkan untuk mengukur aktivitas enzim dan konsentrasi glukosa secara tidak langsung dengan bantuan spektrofotometer (Suhartono 1989).

4.2. Uji Strip Biosensor

4.2.1. Purifikasi menggunakan Sephadex G-100

Berdasarkan hasil *glucose assay* maka untuk mendapatkan hasil optimal maka sebelum dilakukan uji strip biosensor sampel hasil ekstraksi induksi 8% galaktosa selama 48 jam disepari proteinnya berdasarkan berat molekulnya menggunakan Sephadex G-100.

Sephadex G-100 dilarutkan dengan 1x PBS kemudian dimasukkan ke dalam kolom (*syringe*) sepanjang 20 cm dan biarkan mengeras, gel ini kemudian di cuci dengan melewati 1x PBS. Supernatan dilewatkan ke dalam gel dan setiap fraksi ditampung untuk dikonfirmasi tingkat separasi proteinnya menggunakan SDS-PAGE 8%.



Gambar 2.4.2.1a Hasil purifikasi protein pYES-GOX menggunakan sephadex G-100, fase supernatan, induksi 8% galaktosa selama 48 jam, pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit, metode ekstraksi vortex dengan penambahan *glass beads*.

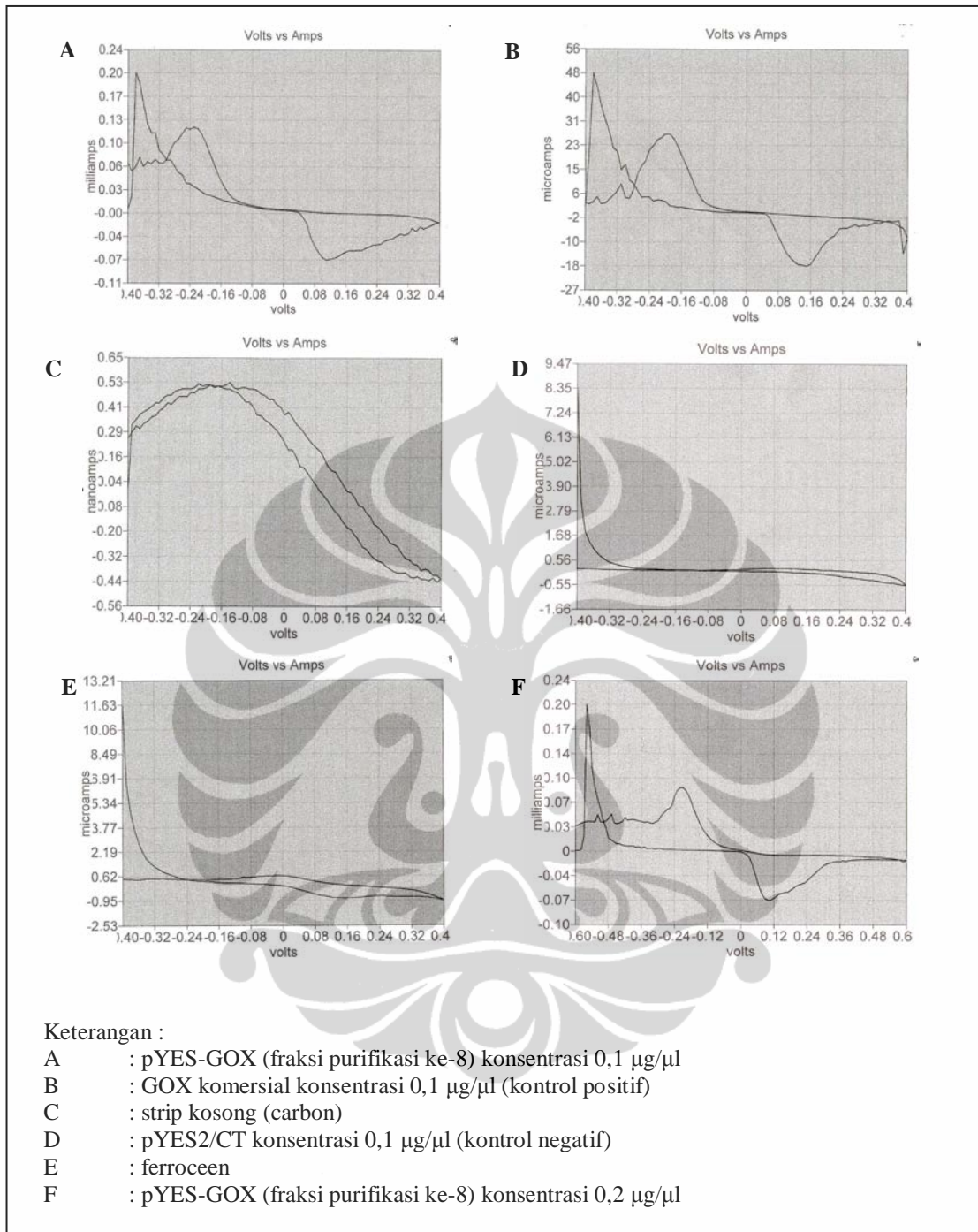
Hasil SDS-PAGE (Gambar 2.4.2.1a) menunjukkan pada fraksi ke-2 sampai ke-4 belum terlihat adanya pita protein karena kemungkinan pada fraksi-

fraksi tersebut masih merupakan pelarut PBS yang turun terlebih dahulu. Fraksi ke-6 sampai ke-14 terlihat pita-pita protein berukuran antara 30—85 kDa. Pita protein terlihat jelas pada fraksi ke-8 dan ke-10, sedangkan fraksi ke-16 sampai ke-26 pita-pita protein sudah tidak terlihat lagi.

Pita-pita protein yang terlihat pada fraksi ke-6 sampai ke-14 tidak memperlihatkan adanya pita protein spesifik (GOX) dengan ukuran sekitar 66 kDa. Hal ini mungkin disebabkan karena protein GOX terekspresi dengan konsentrasi yang sangat kecil sehingga tidak terlihat pada saat proses separasi dengan Sephadex atau GOX terekspresi dalam bentuk yang lebih rendah berat molekulnya daripada *expected band* yaitu sekitar 66 kDa, akan tetapi proses separasi berlangsung baik, ditandai dengan protein yang terelusi memiliki ukuran tidak lebih dari 100 kDa. Sephadex G-100 memiliki pori-pori yang bisa melewati protein dengan ukuran 4 sampai 100 kDa yang masih dalam kisaran ukuran protein pYES-GOX. Menurut Bailey (2002), purifikasi metode kromatografi *size exclusion* menggunakan Sephadex G-100 memiliki keuntungan yaitu dapat menghasilkan separasi yang lebih efisien dan optimal karena dapat memperkecil resiko rusaknya protein.

4.2.2. Pengujian Biosensor Glukosa

Hasil purifikasi tidak terlihat pita protein GOX spesifik berukuran sekitar 66 kDa pada sampel GOX induksi 8% glukosa yang diinkubasi 48 jam, akan tetapi pada *glucose assay* sampel tersebut menunjukkan perubahan warna yang mengindikasikan adanya reaksi yang terjadi antara enzim GOX dengan sampel glukosa, oleh karena itu dilakukan uji dengan cara meneteskan langsung protein pYES-GOX pada strip biosensor dan diukur menggunakan potensiostat galvanostat. Hasil analisis berupa cyclic voltammogram (*cyclic voltammetry*) (Gambar 2.4.2.2a).



Gambar 2.4.2.2a Hasil *cyclic voltammograms* uji strip biosensor menggunakan protein GOX.

Reaksi yang terjadi di *working electrode* antara sampel glukosa dan enzim GOX dianalisa dengan menggunakan potensiostat galvanostat. Ada atau tidaknya reaksi yang terjadi dilihat berdasarkan ada atau tidaknya *peak* pada *cyclic*

voltammograms. *Peak* menunjukkan adanya reaksi reduksi dan oksidasi (redoks) yang terjadi pada *working electrode* (Wei Yan *et al.* 2008).

Biosensor berbahan sampel ferrocen sebagai kontrol negatif digunakan untuk meyakinkan bahwa arus yang dihasilkan adalah murni aktivitas dari enzim GOX. Pada sampel ferrocen terlihat adanya arus (*peak*) sangat kecil sebesar 0,7 μ Amp. Hasil uji menunjukkan siklus arus yang berbeda dengan siklus arus dari biosensor berbahan GOX rekombinan. Jadi siklus arus yang terdapat pada biosensor berbahan GOX rekombinan murni aktivitas dari enzim GOX itu sendiri. Kontrol negatif lainnya yaitu biosensor kosong tidak memperlihatkan adanya arus redoks. Hal ini menunjukkan bahwa strip biosensor dalam keadaan baik (tidak mengandung zat-zat lain yang akan mempengaruhi arus redoks pada saat diujikan dengan sampel).

Uji biosensor menggunakan ferrocen sebagai kontrol negatif. Ferrocene berfungsi sebagai mediator transfer elektron untuk mendapatkan aktivitas GOX lebih tinggi. Mediator transfer elektron bertindak sebagai jembatan antara enzim dan elektroda dalam rangka meningkatkan deteksi reaksi enzim. GOX yang terikat dengan ferrocene menghasilkan elektron dari pusat reaksi, kemudian ferrocene akan mentransfer elektron tersebut sehingga arus yang dihasilkan dapat dideteksi (Nagata 1995).

Biosensor menggunakan sampel protein total *S. cerevisiae* INVSc1 yang mengandung pYES2/CT (kontrol negatif) konsentrasi 0,1 μ g/ μ l tidak terlihat adanya reaksi redoks (tidak ada *peak*), hal ini menunjukkan bahwa pada sampel protein total *S. cerevisiae* INVSc1 yang mengandung pYES2/CT tidak terdapat enzim GOX yang akan bereaksi dengan glukosa. Arus redoks sampel GOX komersial (kontrol positif) konsentrasi 0,1 μ g/ μ l yaitu 25 μ Amp yang menunjukkan terdapat reaksi redoks antara enzim dan sampel glukosa. Akan tetapi hasil ini lebih kecil dibandingkan dengan biosensor yang menggunakan sampel GOX rekombinan.

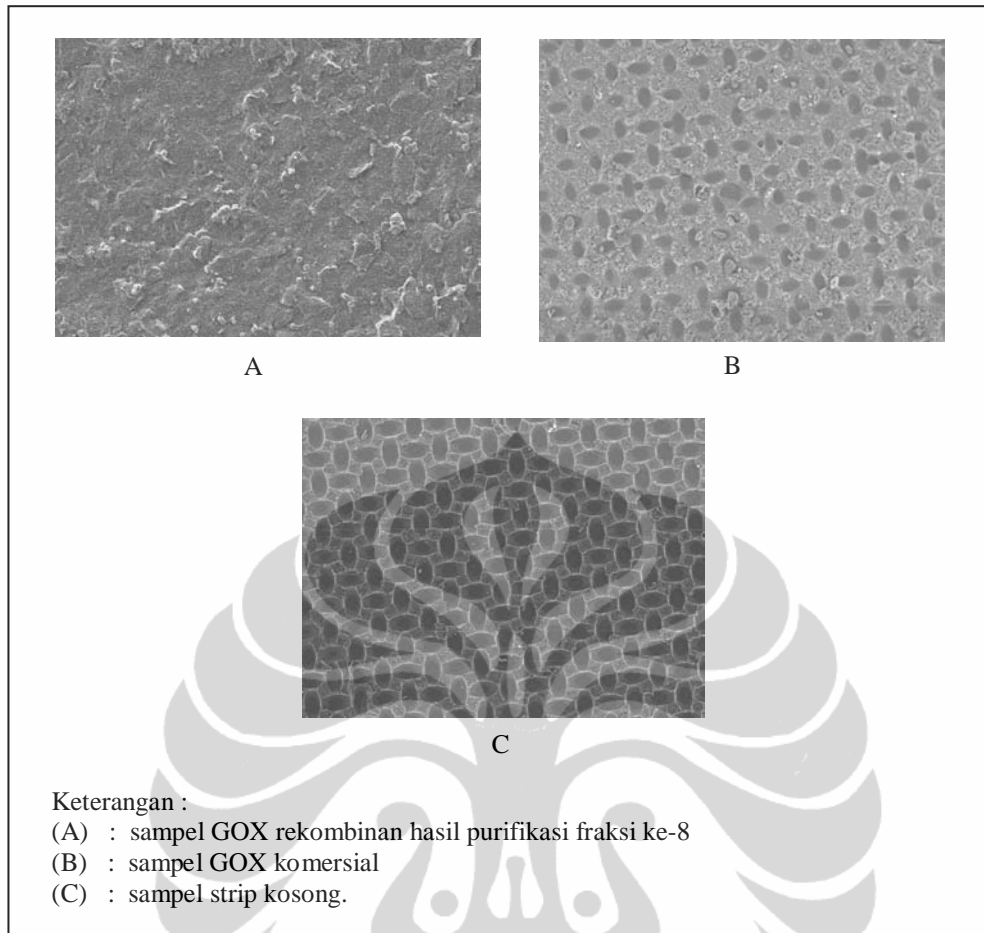
Biosensor menggunakan sampel protein pYES-GOX hasil purifikasi (fraksi ke-8) konsentrasi 0,1 μ g/ μ l terlihat adanya arus (*peak*), yang menunjukkan bahwa terdapat reaksi redoks antara enzim GOX dengan sampel glukosa. Tinggi arus redoks protein pYES-GOX hasil purifikasi yaitu 90 μ Amp. Pada sampel

protein pYES-GOX hasil purifikasi (fraksi ke-8) konsentrasi 0,2 µg/µl (konsentrasi dinaikkan menjadi 2x lipat), diharapkan arus yang terjadi menjadi lebih besar), akan tetapi arus (*peak*) yang terdeteksi terlihat lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi 0,1 µg/µl yaitu sebesar 85 µAmp. Hal ini terjadi dikarenakan *working electrode* tidak cukup luas untuk menampung sampel protein dengan konsentrasi lebih besar (volume yang ditambahkan 2x lipat atau 40 µl) sehingga *working electrode* tidak dapat kering dengan sempurna dan sampel menyebar sampai ke *reference electrode* (enzim tidak boleh menyebar sampai ke *reference electrode*) sehingga reaksi redoks yang terjadi pada strip biosensor kurang sempurna (Yuqing *et al.* 2006).

Perbedaan arus yang dihasilkan biosensor GOX rekombinan dan biosensor GOX komersial kemungkinan disebabkan karena enzim GOX komersial yang digunakan mengalami penurunan kualitas karena terlalu lama disimpan pada suhu kurang sesuai. Suhu optimum untuk menyimpan enzim agar tidak terjadi penurunan kualitas yaitu -20° C (Ausubel *et al.* 1995). Kemungkinan lainnya perbedaan aktivitas antara GOX komersial dan GOX rekombinan adalah mutasi yang terdapat pada GOX rekombinan menyebabkan lebih aktif daripada GOX komersial.

5. Analisis *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Analisis *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan untuk mengetahui gambaran permukaan elektroda yang telah diberi perlakuan enzim. Hasil analisis SEM strip biosensor ditunjukkan pada Gambar 2.5.1.



Gambar 2.5.1 Hasil analisis SEM strip biosensor, perbesaran 1000X.

Dengan menggunakan hasil analisa biosensor pada uji terdahulu [Pratondo Busono, komunikasi pribadi, 24 Februari 2010], ditunjukkan bahwa hasil SEM pada sampel GOX komersial dan sampel GOX rekombinan terlihat berbeda (Gambar 2.5.1). Pada sampel GOX komersial terlihat bahwa protein mengisi di beberapa lubang (yang merupakan carbon), sedangkan pada sampel GOX rekombinan terlihat bahwa semua lubang (carbon) terisi penuh. Menurut Yongjin Zou *et al.* (2008), biosensor yang baik apabila sampel enzim yang digunakan terdistribusi dengan baik sehingga permukaan elektroda terlihat kompak, homogen dan padat. Susunan ini dapat menguntungkan enzim untuk mempertahankan bioaktivitas enzim.

Hasil SEM memberikan kemungkinan arus redoks pada biosensor yang menggunakan GOX rekombinan lebih besar dibandingkan arus pada biosensor yang menggunakan GOX komersial, karena sampel GOX rekombinan terdistribusi

dengan baik pada permukaan elektroda yang akan meningkatkan arus redoks biosensor.

KESIMPULAN

Plasmid rekombinan pYES-GOX berhasil ditransformasi ke dalam *S. cerevisiae* INVSc1 menggunakan metode LiAc. Total protein diekstraksi menggunakan berbagai variasi metode. Metode vortex dengan penambahan *glass beads* sebagai teknik ekstraksi yang optimal. Protein rekombinan diinduksi dengan konsentrasi induser 2, 4 dan 8% galaktosa. Hasil induksi ekspresi protein tidak terlihat secara jelas, walaupun kemungkinan besar protein rekombinan GOX terdapat pada fase supernatan. Berdasarkan uji menggunakan *glucose assay*, protein rekombinan GOX induksi 8% galaktosa selama 48 jam fungsional. Protein rekombinan GOX fungsional dipurifikasi menggunakan Sephadex G-100, kemudian diuji menggunakan biosensor glukosa menunjukkan hasil yang lebih fungsional serta mempunyai aktivitas lebih tinggi dibandingkan GOX komersial.

SARAN

Beberapa perbaikan perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil ekspresi protein GOX rekombinan yang optimal antara lain optimalisasi induksi dengan penambahan variasi konsentrasi induser galaktosa dan waktu inkubasi. Protein rekombinan GOX dapat dipurifikasi menggunakan metode lainnya seperti *Ion Exchange Chromatography*. Optimalisasi metode purifikasi perlu dilakukan dengan melakukan fusi protein rekombinan GOX dengan epitop His₆ atau bahkan His₁₂, kemudian sampel protein dipekatkan menggunakan protein konsentrator. Akhirnya, protein rekombinan GOX dapat dikeringkan menggunakan metode liofilisasi untuk mencegah protein terdegradasi.

DAFTAR ACUAN

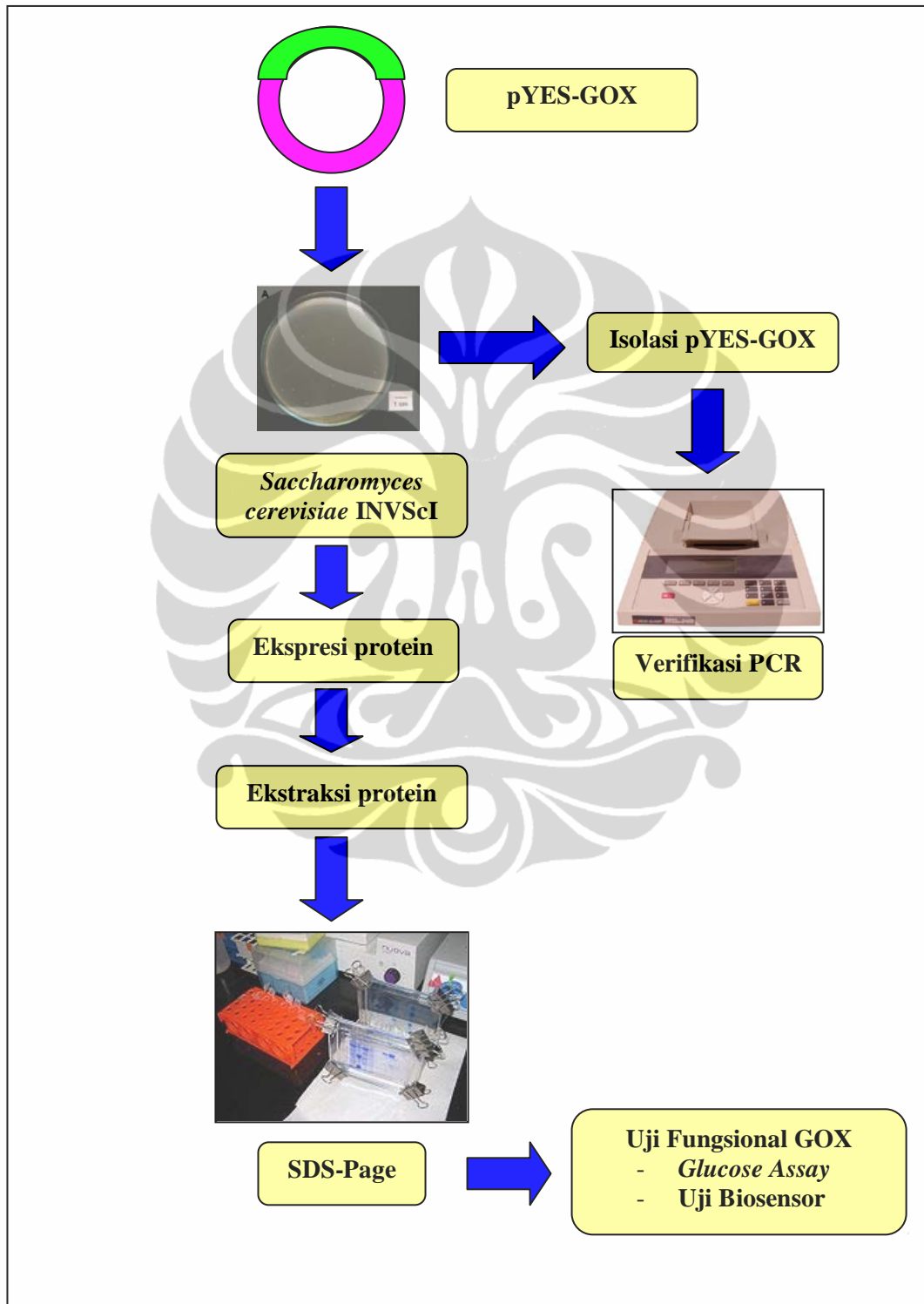
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, L.M. Albright, D.M. Coen, A. Varki & K. Jamsen. 1995. *Current protocol in molecular biology*. 2nd ed. John Wiley & Sons Inc, Massachusetts: xxiv + 1.01—9.17.3 hlm.
- Bailey, G.S. *Purification and assessment of quality of radioiodinated protein*. Dalam: Walker, J.M. 2002. *The Protein Protocols Handbook*. 2nd ed. Humana Press Inc, New Jersey: v + 1139 hlm.
- Brown, T.A. 1995. *Gene cloning: An introduction*. 3rd ed. Chapman & Hall, Manchester: vii + 333 hlm.
- Crognale, S., V. Pulci, V. Brozzoli, M. Petruccioli & F. Federici. 2006. Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**(6): 1230—1235 hlm.
- El-Sherbeny, G.A., A.A. Shindia & Y.M.M.M. Sheriff. 2005. Optimization of various factors affecting glucose oxidase activity produced by *Aspergillus niger*. *International Journal of Agriculture & Biology*. **7**(6): 953—958 hlm.
- Frederick, K.R., J. Tung, R.S. Emerick, F.R. Masiarz, S.H. Chamberlain, A. Vasavada & S. Rosenberg. 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *Biological chemistry*. **265**(7): 3793—3802 hlm.
- Gietz, R.D & R.A. Woods. *Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method*. Dalam: Xiao, W. 2006. *Methods in Molecular Biology*, vol. 313: *Yeast Protocols*. 2nd ed. Humana Press Inc, New Jersey: v + 392 hlm.
- Hecht, H.J., D. Schomburg, H. Kalisz & R.D. Schmid. 1993. The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. *Biosensors & Bioelectronics*. **8**(3-4): 197—203 hlm.

- Invitrogen. 2003. *pYES2/CT, pYES3/CT, and pYC2/CT yeast expression vectors with C-terminal tags and auxotrophic selection markers*. Invitrogen Corp., California: 31 hlm.
- Invitrogen. 2004. *AccuPrime™ Pfx SuperMix usage information*. Invitrogen Corp., California: 4 hlm.
- Kramer, M.F. & D.M. Coen. 1998. The polymerase chain reaction. *Dalam*: Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.M. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Sthrel (eds.). 1998. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York: 15.0.3—15.1.15.
- Luque, R., M. Orejas, N.I. Perotti, D. Ramon & M.E. Lucca. 2004. pH Control of the production of recombinant glucose oxidase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Microbiology*. **97**(2): 332—337 hlm.
- Malherbe, D.F., M. du Toit, R.R.C. Otero, P. van Rensburg & I.S. Pretorius. 2003. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology Biotechnology*. **61**(5-6): 502—511 hlm.
- Mozaz, S.R., M.P. Marco, M.J. Lopez de Alda & D. Barcelo. 2004. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Applied Chemistry*. **76**(4): 723—752 hlm.
- Nagata, R., S.A. Clark, K. Yokoyama, E. Tamiya & I. Karube. 1995. Amperometric glucose biosensor manufactured by a printing technique. *Analytica Chimica Acta*. **304**(2): 157—164 hlm.
- Q-BIOgene. 2006. *RPM® yeast plasmid isolation kit*. Qbiogene Inc, USA: 14 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume 1—3. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A.14.1 + R.22 + I.44 hlm.
- Seidman, L.A. & C.J. Moore. 2000. *Basic laboratory methods: Textbook and laboratory reference*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Simpson, C., J. Jordan, N.S. Gardiner & C. Whiteley. 2007. Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH. *Protein Expression and Purification*. **51**(2): 260—266 hlm.

- Stryer, L. 2000. *Biokimia*. Terjemahan dari : Biochemistry. 4th ed. Vol 1. EGC, Jakarta.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor: i + 322 hlm.
- Wei Yan., Xiaomiao Feng, Xiaojun Chen, Wenhua Hou & Jun-Jie Zhu. 2008. A super highly sensitive glucose biosensor based on Au nanoparticles-AgCl@polyaniline hybrid material. *Biosensors and Bioelectronics*. **23**(7): 925—931 hlm.
- Witt, S., M. Singh & H.M. Kalisz. 1998. Structural and kinetic of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(4): 1405—1411 hlm.
- Yamaguchi, M., Y. Tahara., A. Nakano & T. Taniyama. 2007. Secretary and continuous expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. **55**(2): 273—278 hlm.
- Yongjin Zou., Cuili Xiang., Li-Xian Sun & Fen Xu. 2008. Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol-gel. *Biosensors and Bioelectronics*. **23**(7): 1010—1016 hlm.
- Yuqing, M., C. Jianrong & W. Xiaohua. 2006. Construction of a glucose biosensor by immobilizing glucose oxidase within a poly(o-phenylenediamine) covered screen-printed electrode. *Journal of Biological Sciences*. **6**(1): 18—22 hlm.

LAMPIRAN

Lampiran 2.1 Bagan cara kerja ekspresi protein rekombinan



Lampiran 2.2 Pembuatan medium

Medium cair YPD

Sebanyak 1 g *yeast extract* dan 2 g *peptone* dilarutkan dalam akuades hingga volumenya mencapai 90 ml dengan cara diaduk menggunakan alat *magnetic stirrer*. Setelah larutan homogen, larutan lalu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 20 menit. Larutan ditambahkan 10 ml glukosa 20%.

Medium padat YPD

Pembuatan medium padat YPD sama dengan pembuatan medium cair YPD, tetapi ditambah sebanyak 2 g *agar bacteriological* sebelum disterilisasi.

Minimal Medium

Sebanyak 0,85 g *yeast nitrogen base* dan 0,7 g *drop-out* dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 90 ml dengan cara diaduk menggunakan alat *magnetic stirrer*. Setelah larutan homogen, larutan lalu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 20 menit. Larutan ditambahkan 10 ml glukosa 20%.

(Sambrook & Russell 2001).

Lampiran 2.3 Komposisi bahan kimia, cara pembuatan larutan atau *buffer*

No	Larutan / <i>buffer</i>	Komposisi dan cara pembuatan
1	Gel agarosa 0,8% (b/v)	Sebanyak 0,8 g agarosa dilarutkan dalam 100 ml TAE 1x, lalu dipanaskan hingga mendidih dan homogen. Larutan dituang ke dalam cetakan gel yang telah dipanasangkan <i>comb</i> . Setelah gel mengeras, <i>comb</i> diangkat sehingga terbentuk <i>well</i> (sumur). Gel diletakkan dalam ruang elektroforesis dan direndam larutan TAE 1x.
2	<i>Buffer</i> stok TAE (<i>Tris-asetat Ethylenediamine Tetracetate</i>) 50X dan 1X	Sebanyak 242 g Tris basa, 100 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) dan 57,1 ml asam asetat glacial ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 1.000 ml. Untuk <i>buffer</i> TAE 1X, sebanyak 200 ml TAE 50 X ditambahkan akuades hingga 1.000 ml.
3	Etidium bromida (EtBr)	Sebanyak 20 µl etidium bromida (10 mg/ml) ditambahkan ke dalam 200 ml akuades.
4	EDTA 0,5 M	Sebanyak 186,1 g Na.EDTA dilarutkan ke dalam 800 ml akuades. Lalu ditambahkan 20 g NaOH. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga volume larutan mencapai 1.000 ml. pH larutan ditepatkan pada 8, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 20 menit.
5	Glukosa 1 M	Sebanyak 18 g glukosa ditambahkan akuades hingga volume 100 ml, kemudian disterilisasi dengan filtrasi membran 0,22 mikron.

6	Galaktosa 1 M	Sebanyak 18 g galaktosa ditambahkan akuades hingga volume 100 ml, kemudian disterilisasi dengan filtrasi membran 0,22 mikron.
7	<i>Breaking buffer</i>	Dicampur 50 mM sodium phosphate pH 7,4 dengan 1 mM EDTA, 5% gliserol, 1 mM PMSF kemudian ditambahkan akuades.
8	SDS 10%	Sebanyak 100 g SDS (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) dilarutkan dalam 900 ml akuades, kemudian dipanaskan pada suhu 68° C. pH disesuaikan menjadi 7,2 dengan penambahan HCl, kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 1000 ml.
9	Tris-HCl 1 M pH 8,0	Sebanyak 121,1 g Tris basa dilarutkan dalam 800 ml akuades, kemudian ditambahkan 42 ml HCl pekat. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga volumenya mencapai 1.000 ml. pH larutan diukur (pH 8,0) kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 20 menit.
10	Buffer <i>loading</i> 6x	Bromofenol biru 0,25% (v/v) dalam akuades ditambah dengan sukrosa 40% (v/v) dalam akuades.
11	Dapar stok TE10X (pH 7,6)	Sebanyak 100 µl Tris-Cl 0,5 M (pH 7,6) dan 10 µl EDTA 0,5 M (pH 8,0) ditambahkan <i>ultra pure water</i> hingga volume totalnya mencapai 10 ml. Larutan ini disterilisasi dengan menggunakan <i>membrane filter</i> 0,22 µm.
12	Larutan dapar SDS gel	50 mM Tris Cl (pH 6,8) 1,2 ml, gliserol 2,5

	<i>loading</i> 1x	ml, 10% w/v SDS 2,0 ml, 0,5% w/v <i>bromophenol blue</i> dan akuades 3,55 ml. Disimpan pada suhu kamar.
13	APS (Amonium persulfat) 10% (harus dibuat baru)	100 mg amonium persulfat dilarutkan dalam 1 ml akuades.
14	Gel Pemisah (<i>Separating Gel</i>) 13%	Dicampur homogen akuades 2,7 ml, 30% akrilamid 4,7 ml, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 ml, 10% SDS 0,1 ml, 10 % amonium persulfat 0,03 ml dan TEMED 0,005 ml.
15	Gel Penumpuk (<i>Stacking Gel</i>) 6%	Dicampur homogen akuades 2,7ml, 30% akrilamid 1 ml, 1 M Tris (pH 6.8) 1.25 ml, 10% SDS 0,05 ml, 10 % amonium persulfat 0.025 ml dan TEMED 0.01 ml.
16	<i>Running Buffer</i> pH 8.3 10x	30.3 g Tris basa, 144.0 g glisin dan 10 g SDS dilarutkan dan dicukupkan dengan akuades hingga 1 l. Untuk penggunaan : Diencerkan 50 ml dengan 450 ml akudes. Dikocok sebelum digunakan.
17	Larutan <i>destaining</i>	Sebanyak 800 ml akuades steril dicampurkan dengan 100 ml mtanol dan 100 ml asam asetat glasial. Larutan disaring dengan kertas saring dan disimpan pada suhu ruang.
18	Larutan <i>staining</i>	Sebanyak 0,25 g <i>coomassie brilliant blue</i> dilarutkan dalam 90 ml campuran air:metanol dengan perbandingan 1:1. Larutan kemudian ditambahkan 42 ml asam asetat glasial. Larutan disaring dengan kertas saring dan disimpan pada suhu ruang.
19	LiAc 10x	Sebanyak 10.2 g litium asetat dilarutkan dengan akuades 90 ml. pH 7.5 diatur

		dengan asam asetat glasial dan dicukupkan hingga 100 ml dengan akuades. Larutan ini disterilisasi dengan menggunakan <i>membrane filter</i> 0.22 μm . Untuk LiAc 1x, dibuat dengan mengencerkan 1 bagian LiAc 10x dengan 9 bagian akuades
20	1xLiAc/0.5xTE	Sebanyak 10 ml LiAc 10x dicampur dengan 5 ml TE 10x. Dicukupkan dengan akuades hingga 100 ml. . Larutan ini disterilisasi dengan menggunakan <i>membrane filter</i> 0.22 μm .
21	1xLiAc/40%PEG-3350/1xTE	Dicampur 10 ml LiAc 10x dengan 10 ml TE 10x dan 40 g PEG-3350. Dicukupkan dengan akuades hingga 100 ml. Larutan disterilisasi dengan dengan autoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 20 menit.
22	BSA 0.5mg/ml	BSA 10 $\mu\text{g/ml}$ diambil 5 μl . Dicukupkan dengan NaCl 0.15 M hingga 1 ml.
23	NaCl 0.15 M	Sebanyak 0.8775 g NaCl dilarutkan dan dicukupkan dengan akuades hingga 100 ml.
24	<i>Liquid glucose assay</i>	Dicampur Peroxidase 1,2 IU/ml dengan 4-Aminoantipyrine 0,2 mM dan Phenol 4 mM.

Sumber : (Sambrook & Russell 2001; Invitrogen 2003).

Lampiran 2.4 Hasil *glucose assay* (OD₅₀₀)

Tabel 1. Hasil *glucose assay* (OD₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 4% galaktosa, blanko *breaking buffer*

Sampel	Waktu (jam ke-)			
	0	24	48	72
pYES-GOX induksi 24 jam	0,017	0,027	0,032	0,036
pYES2/CT induksi 24 jam	0,063	0,052	0,048	0,045
pYES-GOX induksi 48 jam	0,022	0,032	0,031	0,031
pYES2/CT induksi 48 jam	0,027	0,025	0,03	0,033
pYES-GOX induksi 72 jam	0,028	0,034	0,042	0,049
pYES2/CT induksi 72 jam	0,024	0,022	0,025	0,028
Larutan <i>glucose assay</i>	0,017	0,026	0,031	0,036
Kontrol positif	0,446	0,233	0,383	0,518

Tabel 2. Hasil *glucose assay* (OD₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 4% galaktosa, blanko larutan *glucose assay*

Sampel	Waktu (jam ke-)			
	0	24	48	72
pYES-GOX induksi 24 jam	-0,008	0,002	0,01	0,016
pYES2/CT induksi 24 jam	0,04	0,025	0,025	0,025
pYES-GOX induksi 48 jam	-0,004	0,007	0,009	0,012
pYES2/CT induksi 48 jam	0,003	0,003	0,008	0,014
pYES-GOX induksi 72 jam	0,003	0,005	0,016	0,024
pYES2/CT induksi 72 jam	-0,002	-0,003	0,005	0,007
<i>breaking buffer</i>	-0,02	-0,025	0,012	0,016
Kontrol positif	0,446	0,233	0,383	0,518

Tabel 3. Hasil *glucose assay* (OD₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 8% galaktosa, blanko *breaking buffer*

Sampel	Waktu (jam ke-)			
	0	24	48	72
pYES-GOX induksi 24 jam	0,048	0,077	0,099	0,135
pYES-GOX induksi 48 jam	0,061	0,074	0,351	0,22
pYES-GOX induksi 72 jam	0,054	0,089	0,046	0,061
pYES2/CT induksi 72 jam	0,053	0,08	0,034	0,06
Kontrol positif	0,452	0,255	0,404	0,53
Larutan <i>glucose assay</i>	0,017	0,018	0,02	0,02

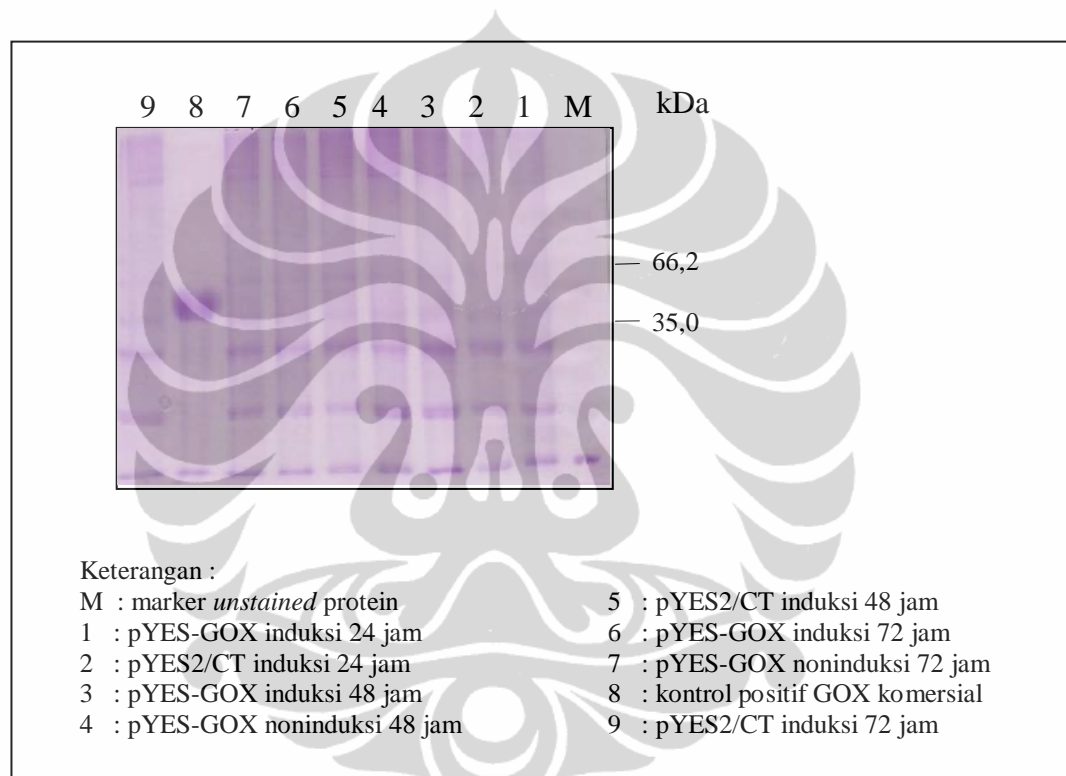
Tabel 4. Hasil *glucose assay* (OD₅₀₀), konsentrasi protein 5000 µg/µl, induksi 8% galaktosa, blanko larutan *glucose assay*

Sampel	Waktu (jam ke-)			
	0	24	48	72
pYES-GOX induksi 24 jam	0,031	0,072	0,085	0,115
pYES-GOX induksi 48 jam	0,039	0,062	0,345	0,227
pYES-GOX induksi 72 jam	0,033	0,068	0,026	0,041
pYES2/CT induksi 72 jam	0,025	0,059	0,015	0,039
Kontrol positif	0,446	0,233	0,383	0,518
<i>Breaking buffer</i>	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02

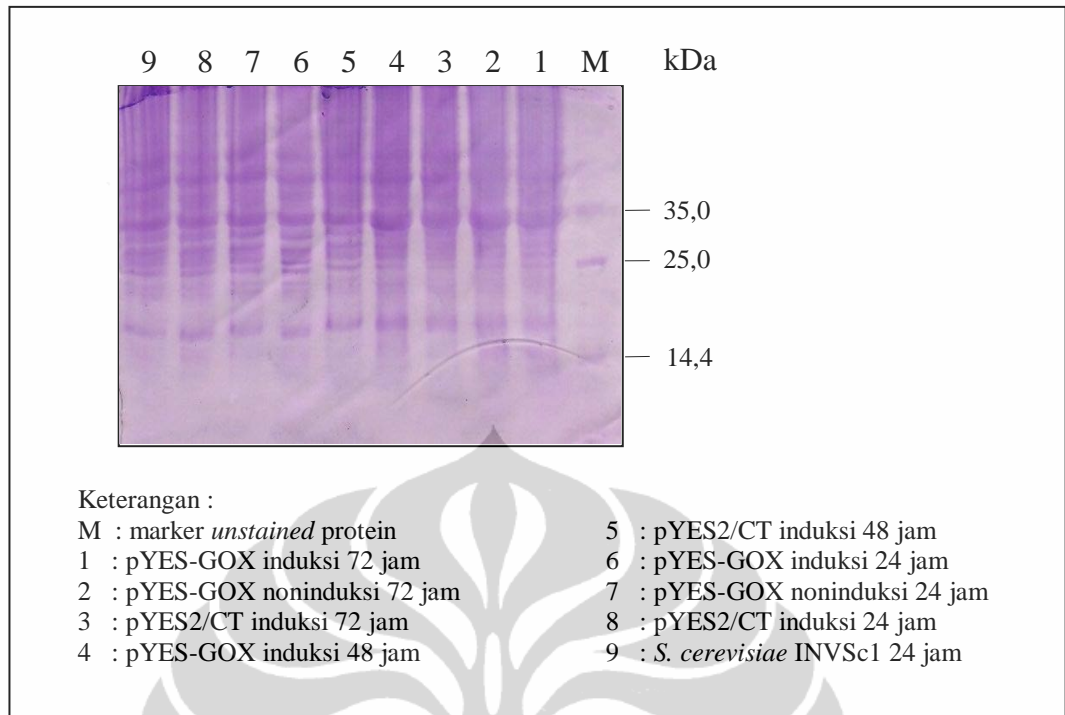
Lampiran 2.5 Analisis SDS-PAGE optimalisasi metode ekstraksi protein, keberadaan protein GOX dan optimalisasi konsentrasi induser galaktosa

A. Fase supernatan

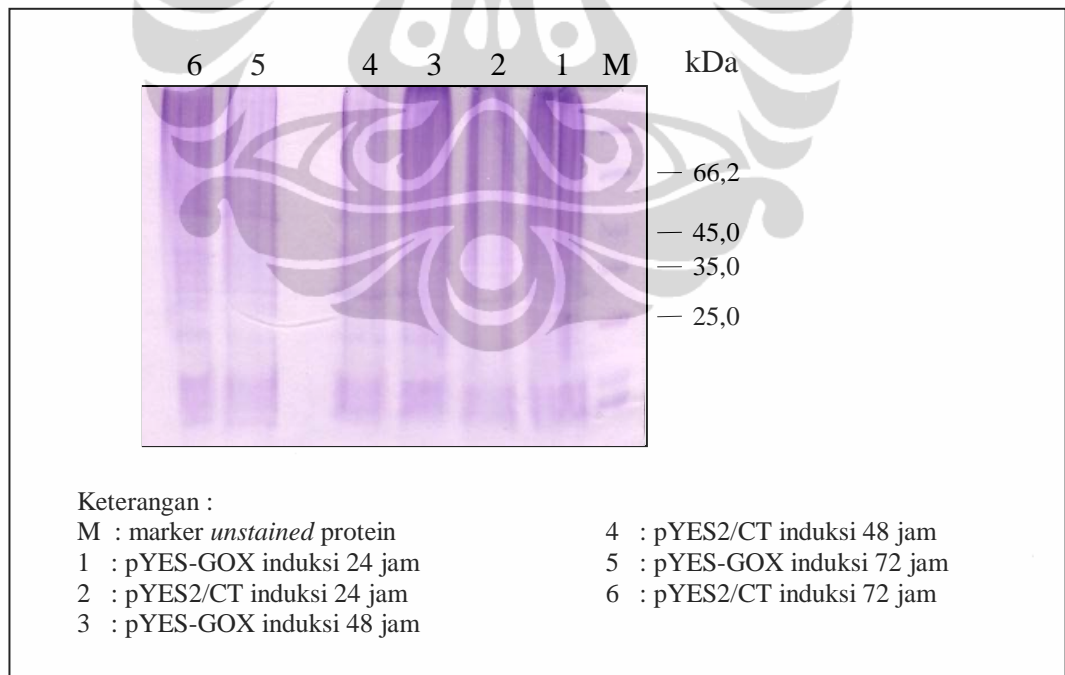
A.1. Hasil metode ekstraksi protein pYES-GOX, fase supernatan, induksi 2% galaktosa pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit.



Gambar 1. Metode : sonikasi, vortex dengan *glass beads*.

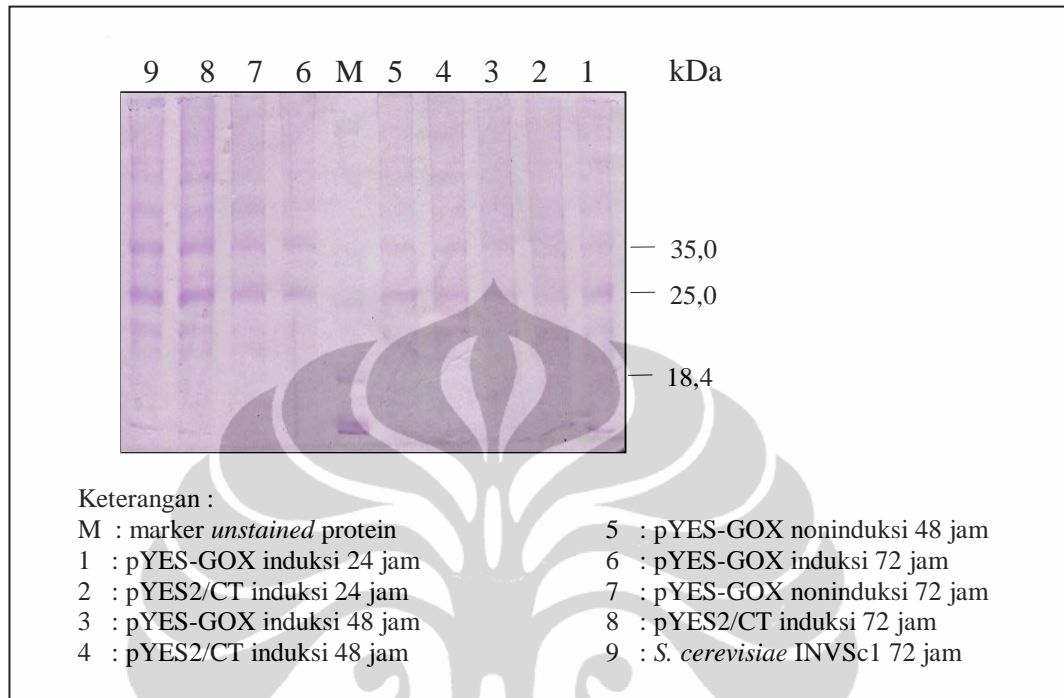


Gambar 2. Metode : vortex dengan *glass beads*.

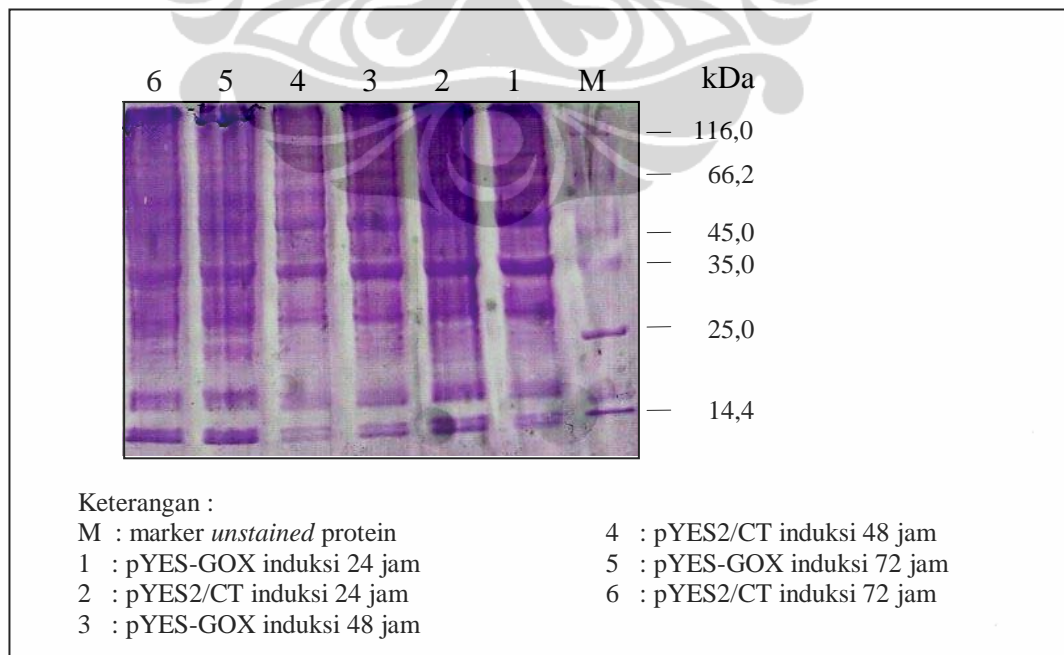


Gambar 3. Metode : sonikasi.

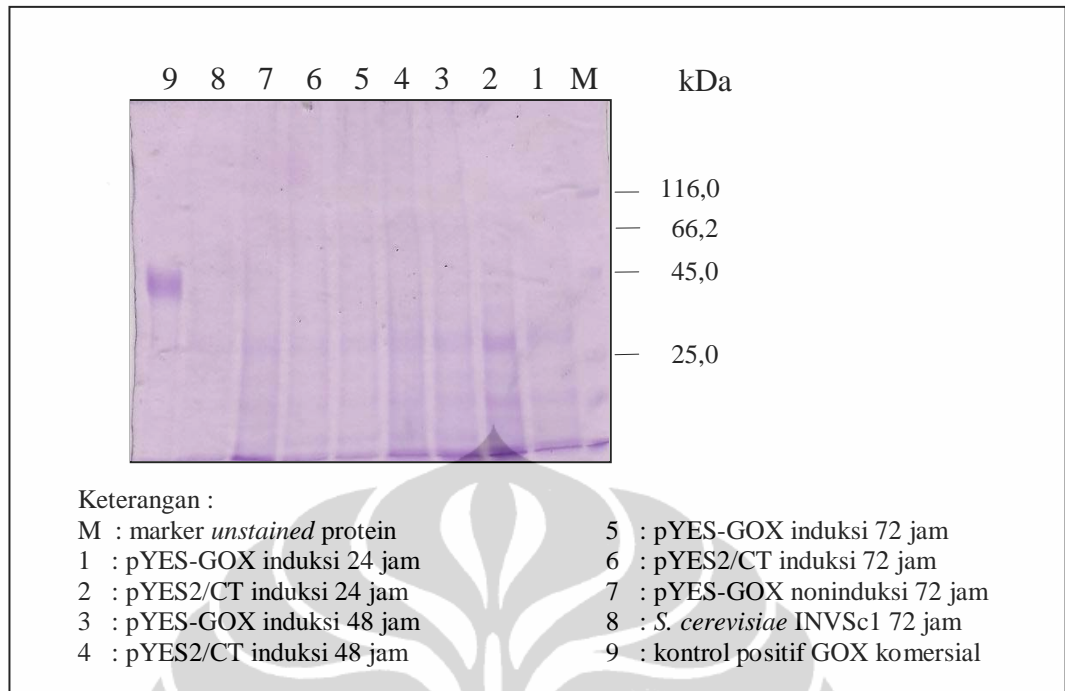
A.2. Hasil metode ekstraksi protein pYES-GOX, fase supernatan, induksi 4% galaktosa pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit.



Gambar 4. Metode : sonikasi, vortex dengan *glass beads*.

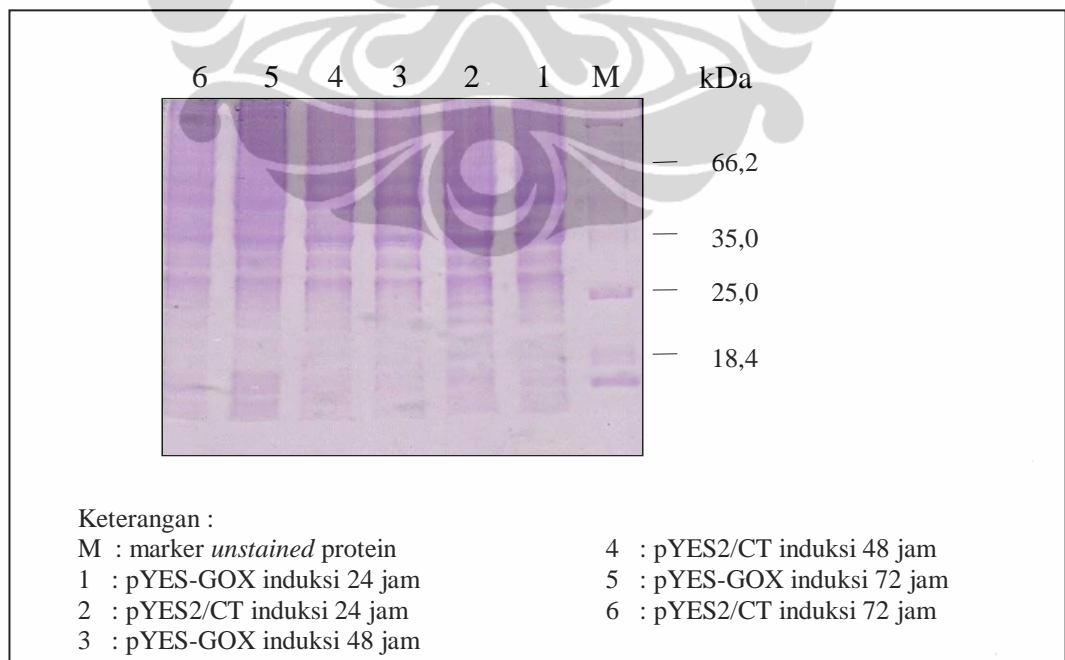


Gambar 5. Metode : vortex dengan *glass beads*.

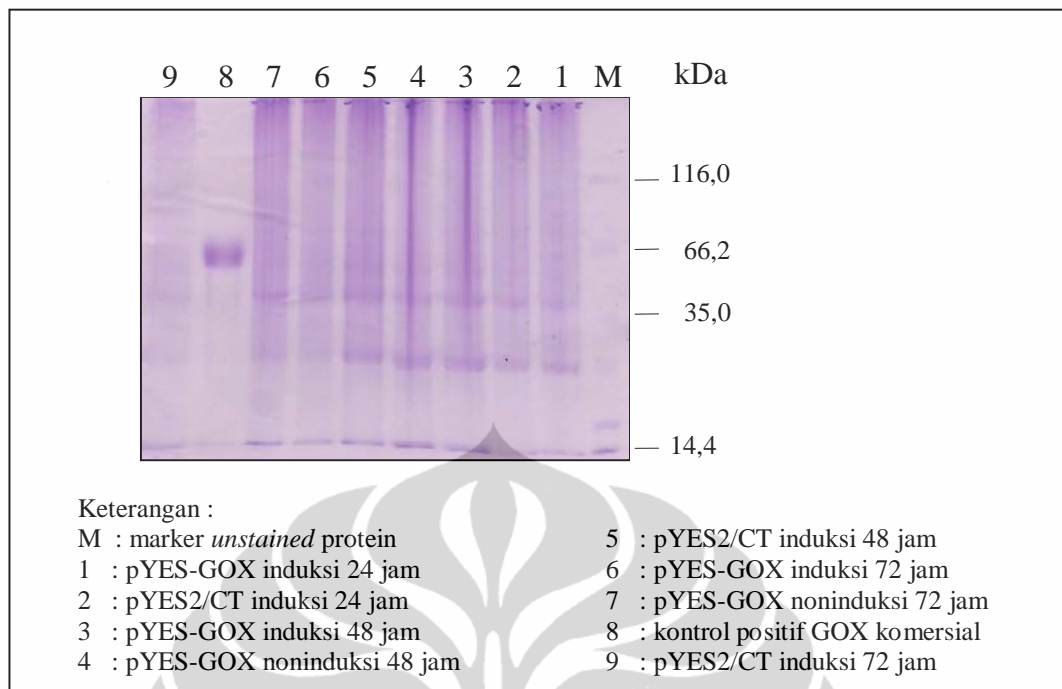


Gambar 6. Metode : sonikasi.

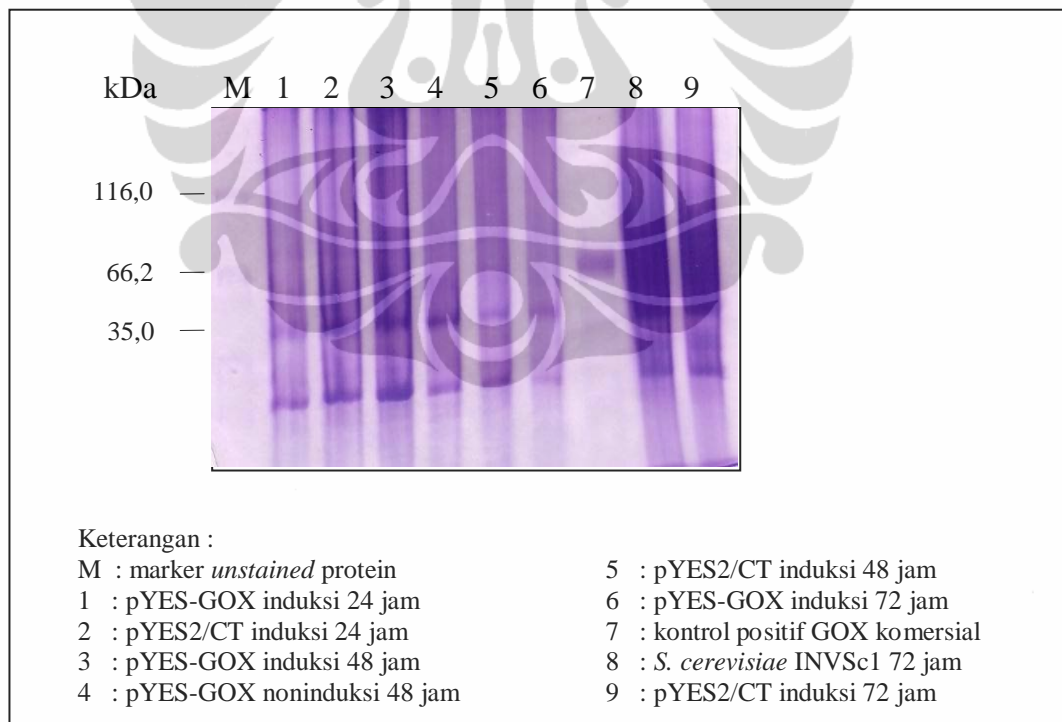
A.3. Hasil metode ekstraksi protein pYES-GOX, fase supernatan, induksi 8% galaktosa pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit.



Gambar 7. Metode : vortex dengan *glass beads*.



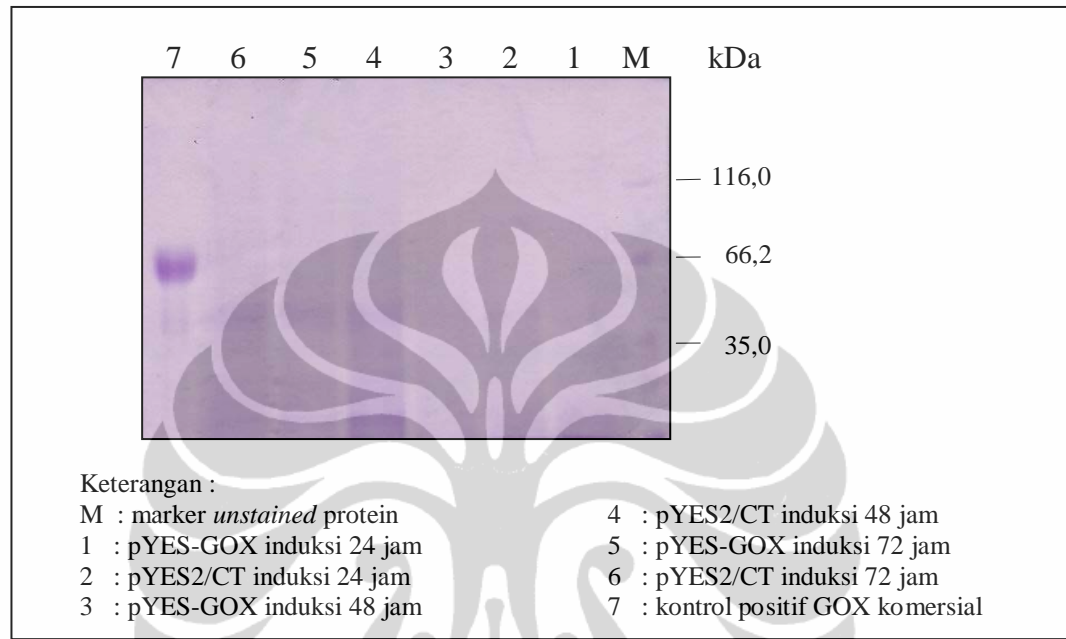
Gambar 8. Metode : sonikasi, vortex dengan *glass beads*.



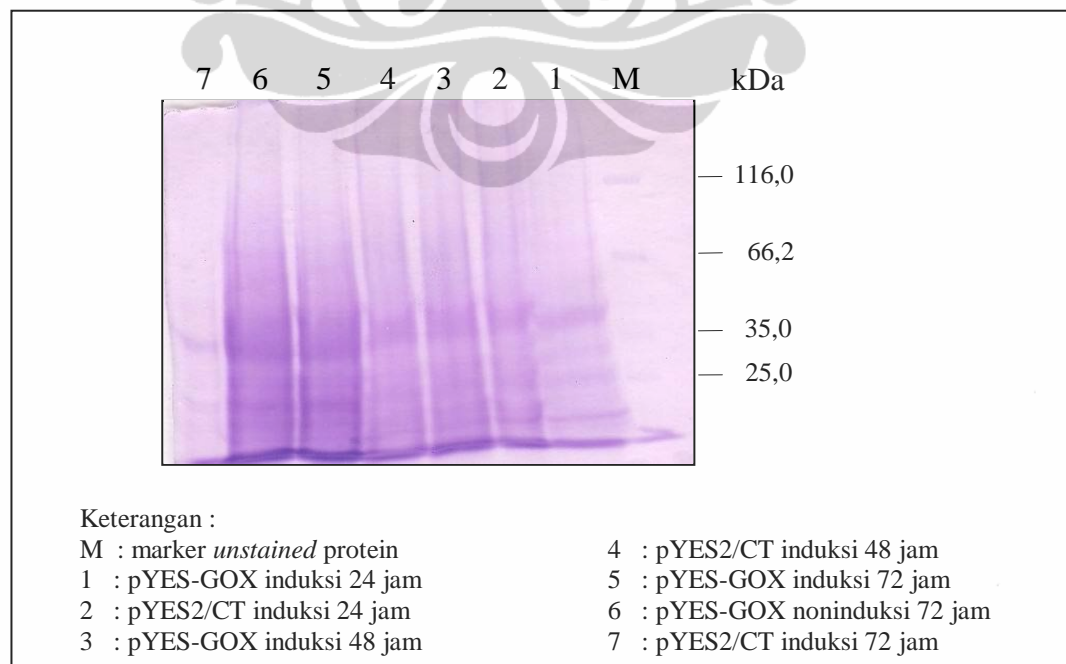
Gambar 9. Metode : sonikasi.

B. Fase Pelet

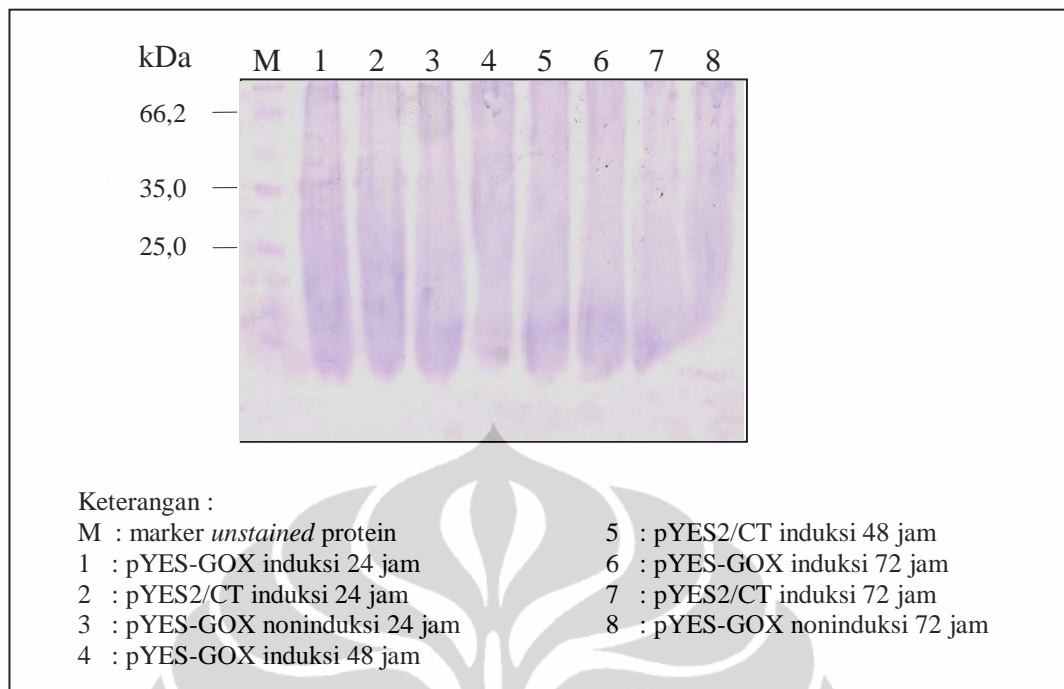
B.1. Hasil metode ekstraksi protein pYES-GOX, fase pelet, induksi 2% galaktosa pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 100° C selama 5 menit.



Gambar 10. Metode : sonikasi, vortex dengan *glass beads*.

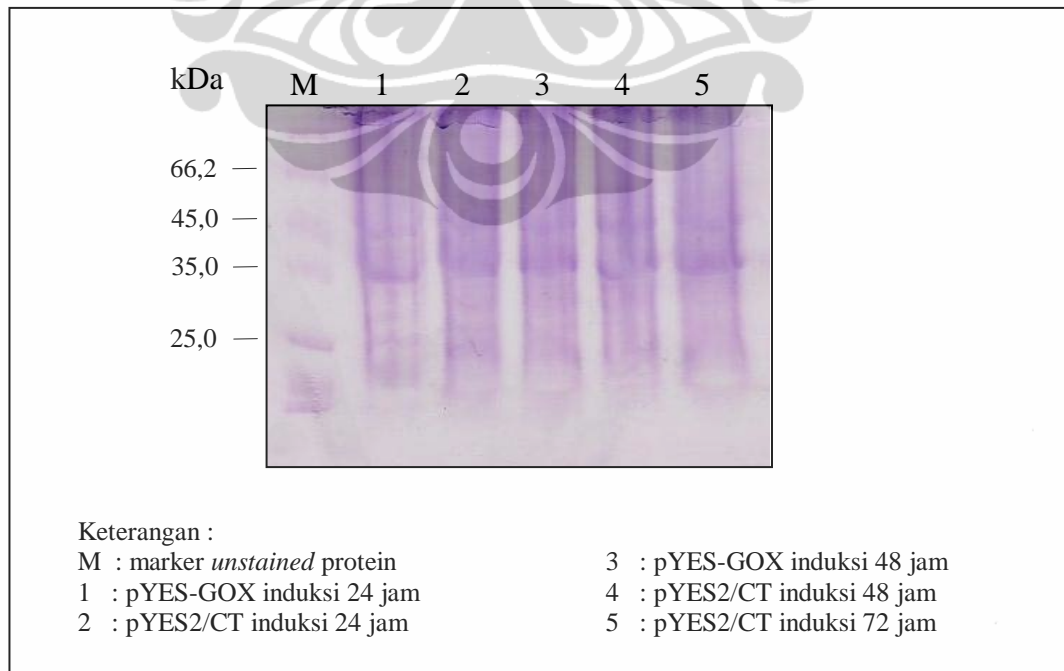


Gambar 11. Metode : vortex dengan *glass beads*.

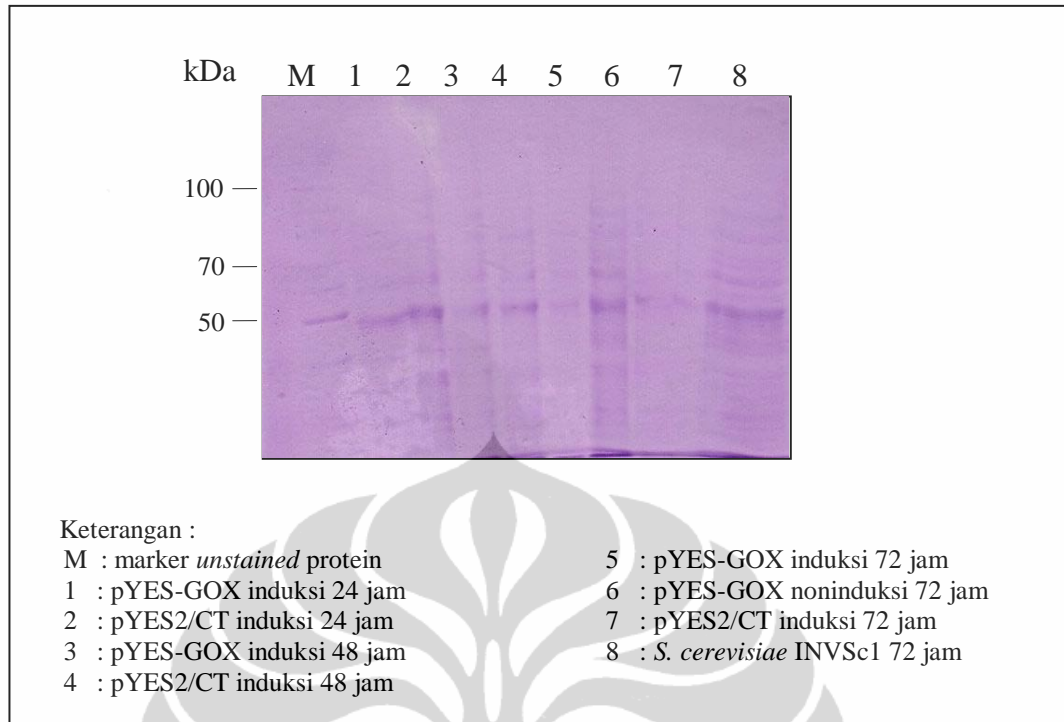


Gambar 12. Metode : sonikasi.

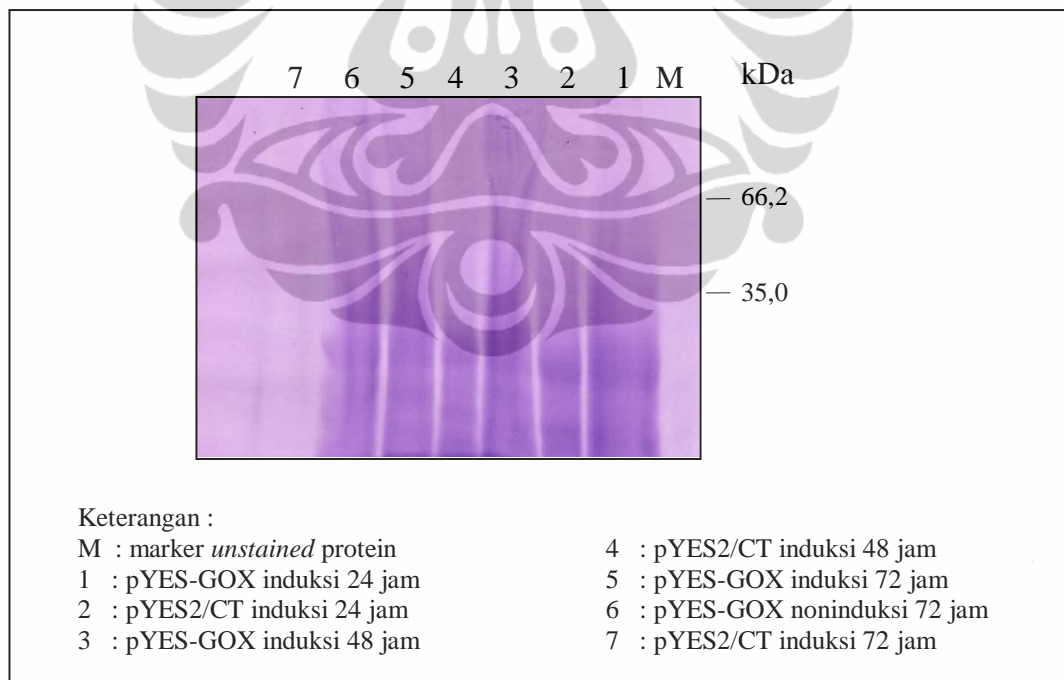
B.2. Hasil metode ekstraksi protein pYES-GOX, fase pelet, induksi 4% galaktosa pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 100° C selama 5 menit.



Gambar 13. Metode : sonikasi, vortex dengan *glass beads*.

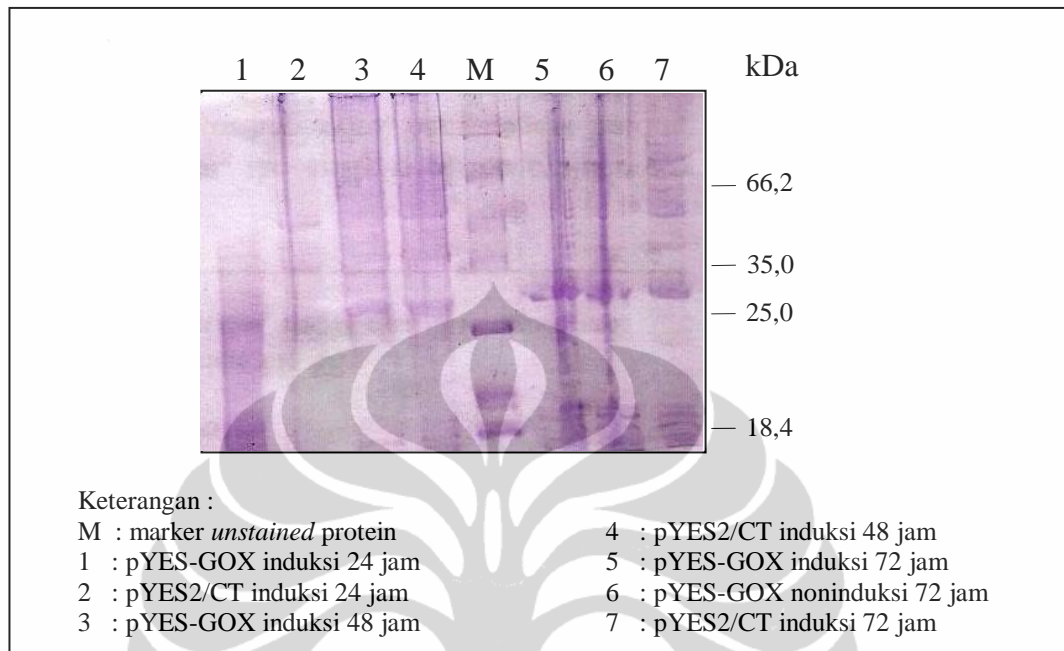


Gambar 14. Metode : vortex dengan *glass beads*.

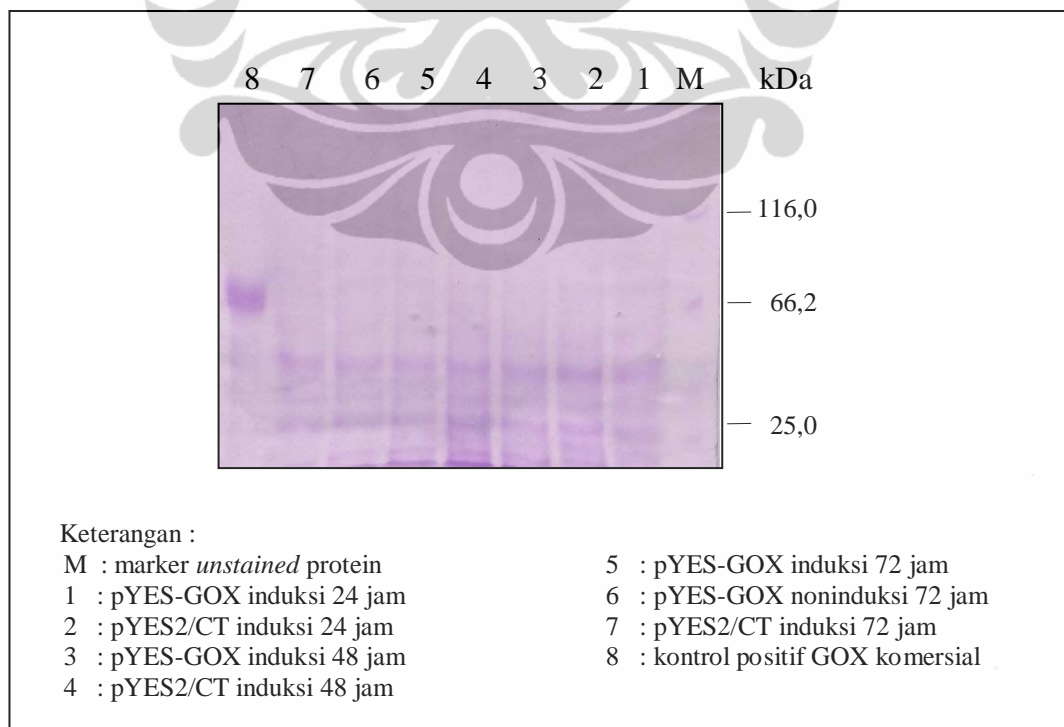


Gambar 15. Metode : sonikasi.

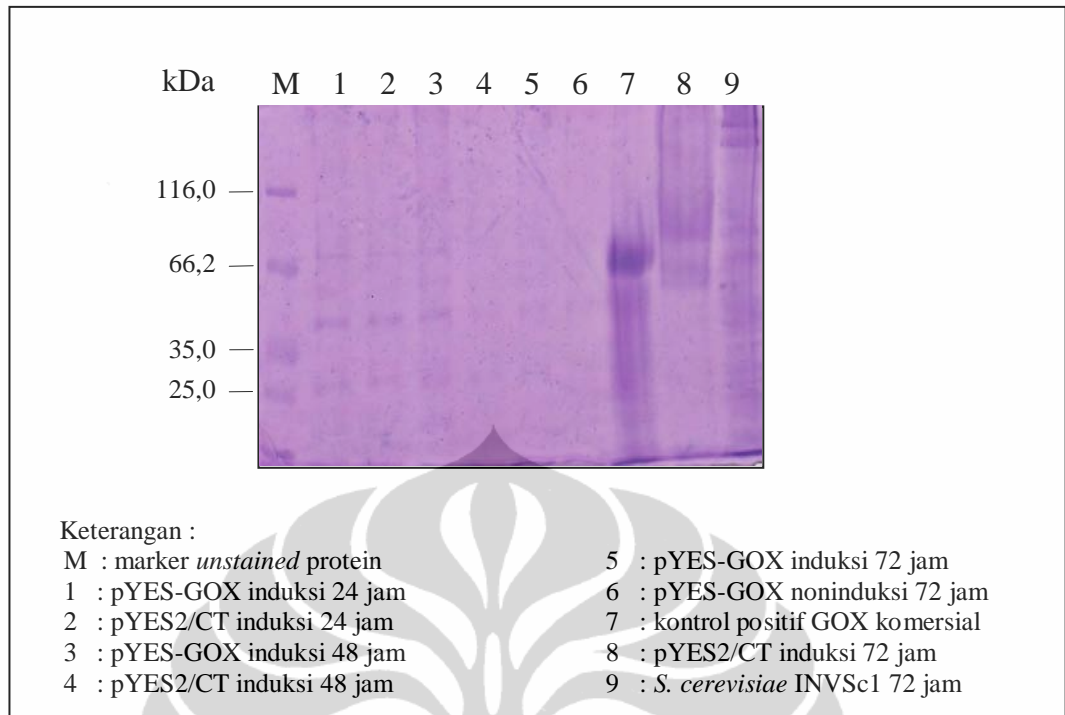
B.3. Hasil metode ekstraksi protein pYES-GOX, fase pelet, induksi 8% galaktosa pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 100° C selama 5 menit.



Gambar 16. Metode : sonikasi, vortex dengan *glass beads*.



Gambar 17. Metode : vortex dengan *glass beads*.



Gambar 18. Metode : sonikasi.

DISKUSI PARIPURNA

Enzim *glucose oxidase* (GOX) dari kapang *Aspergillus niger* mengkatalisis reaksi oksidasi dari β -D-*glucose* menjadi D-*glucono-1,5-lactone* kemudian menjadi D-asam glukonat dan hidrogen peroksida. Enzim ini digunakan sebagai bahan dasar biosensor glukosa (Pulci *et.al.* 2004). Langkah awal agar enzim GOX dapat digunakan sebagai biosensor glukosa adalah mengklonakan dan mengekspresikan gen GOX ke dalam organisme.

Proses pengklonaaan dimulai dari tahap amplifikasi fragmen gen GOX berukuran sekitar 1.779 pb dengan teknik PCR. Amplifikasi gen GOX bertujuan memperbanyak fragmen gen spesifik. Reaksi PCR yang dipisahkan melalui elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v) selama 30 menit dengan voltase 80 volt dan divisualisasikan dengan merendam gel dalam ethidium bromida (1 μ g/ml) berhasil mengamplifikasi fragmen gen GOX berukuran 1.779 pb secara spesifik.

Proses PCR disertakan kontrol positif dan negatif. Kontrol positif menghasilkan fragmen DNA berukuran 323 pb. Kontrol positif berfungsi untuk menunjukkan amplifikasi telah berlangsung dengan baik (Smith *et al.* 1997). Kontrol negatif berfungsi untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi pada reagen PCR. Hasil PCR memperlihatkan fragmen DNA berukuran sekitar 323 pb pada kontrol positif, sedangkan kontrol negatif tidak memperlihatkan adanya fragmen DNA. Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses PCR telah berhasil dilakukan dan menghasilkan gen target spesifik.

Fragmen DNA gen GOX ukurannya tepat kemudian dipurifikasi dengan *kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* untuk menghilangkan sisa komponen PCR. Hasil purifikasi yang divisualisasi dengan elektroforesis menunjukkan pita tunggal berada di bawah pita berukuran 2.027 pb pada penanda λ /*Hind* III, merupakan fragmen gen GOX berukuran sekitar 1.779 pb. Vektor pYES2/CT diperbanyak di dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α . Isolasi DNA menggunakan metode minipreparasi lisis alkali (Sambrook & Russell 2001). Vektor plasmid pYES2/CT hasil isolasi yang telah didigesti dengan enzim *Bam* HI menunjukkan pita DNA tunggal berukuran 5.963 pb.

Produk PCR (gen GOX) sebagai sisipan dan pYES2/CT sebagai vektor kloning didigesti secara terpisah dengan kondisi dan menggunakan enzim restriksi *Bam* HI dan *Xba* I (*double digestion*). Hasil digesti vektor ekspresi pYES2/CT memperlihatkan terbentuknya fragmen DNA tunggal berukuran sekitar 5.963 pb, sedangkan hasil digesti produk PCR terbentuk fragmen DNA berukuran sekitar 1.779 pb. Digesti merupakan tahap yang penting dalam tehnik pengklonaan. *Double digestion* dengan *Bam* HI dan *Xba* I terdapat pada daerah MCS vektor ekspresi pYES2/CT. Hasil digesti *Bam* HI dan *Xba* I menghasilkan potongan ujung lengket (*sticky-end*) (Winfrey *et al.* 1997).

Produk PCR dan vektor ekspresi pYES2/CT yang telah didigesti selanjutnya diligasi dengan enzim *T4 DNA ligase*. Konsentrasi DNA produk PCR dan vektor ekspresi PYES2/CT diukur menggunakan pembanding penanda λ /*Hind* III dengan fasilitas *software* Bio 1D. Hasil ligasi tidak dapat divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa karena keterbatasan konsentrasi akhir DNA pada reaksi ligasi. Oleh karena itu, untuk mengetahui keberhasilan ligasi dilakukan transformasi dan seleksi pada medium SOB ampisilin.

Kondisi reaksi ligasi optimal diperoleh berdasarkan hasil optimasi pendahuluan, yaitu pada suhu 16° C selama 16 jam dan ditunjukkan dengan adanya koloni yang tumbuh pada medium seleksi ampisilin. Menurut Promega (2007), kedua molekul DNA berujung kohesif dapat diligasi pada suhu 12—16° C. Reaksi ligasi pada saat kloning juga disertakan kontrol negatif ligasi. Kontrol negatif ligasi tidak memperlihatkan pertumbuhan koloni mengindikasikan reaksi digesti berjalan sempurna. Rasio molar vektor dan sisipan yang optimal untuk ligasi yaitu 1:11. Hasil ligasi kemudian ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α .

Kultur *E. coli* DH5 α hasil transformasi disebar di atas medium SOB agar mengandung ampisilin. Koloni tumbuh pada medium ampisilin hanya sel bakteri yang berhasil mentransformasi plasmid pYES2/CT karena plasmid membawa sifat resistensi ampisilin terhadap sel. Seluruh sel tumbuh pada kontrol positif, sedangkan tidak terdapat pertumbuhan pada kontrol negatif. Kontrol positif disebar diatas medium SOB tanpa ampisilin untuk melihat kemampuan tumbuh sel kompeten. Kontrol negatif disebar pada medium ampisilin untuk melihat

kemungkinan terjadi kontaminasi pada sel kompeten atau pada proses transformasi (Sambrook & Russell 2001). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sel kompeten berhasil tumbuh dengan baik pada medium SOB, serta tidak terjadi kontaminasi.

Bakteri *E. coli* DH5 α yang telah ditransformasi dengan DNA rekombinan hasil ligasi, kemudian diseleksi dengan medium seleksi SOB ampisilin. Koloni yang tumbuh pada cawan hasil ligasi dengan rasio molar vektor:sisipan (1:11) berjumlah 163 koloni, pada kontrol positif ligasi 704 koloni, sedangkan tidak terdapat koloni pada kontrol negatif ligasi.

Enam belas kandidat koloni rekombinan dipilih secara acak dari 163 koloni yang tumbuh kemudian diisolasi dengan metode lisis alkali. Visualisasi elektroforesis gel agarosa 0,8% menunjukkan terdapat pita DNA plasmid hasil isolasi dengan perbedaan pola migrasi lebih tinggi dibandingkan dengan pola migrasi pita DNA pYES2/CT (koloni a, 5 dan 31). Plasmid yang diisolasi dari koloni a, 5 dan 31 tersebut diduga merupakan plasmid rekombinan pYES2/CT-GOX kemudian diverifikasi lebih lanjut dengan PCR dan *single digestion*.

Verifikasi kandidat koloni yang membawa plasmid rekombinan pYES-GOX yaitu koloni 5 dan 31 dilakukan dengan metode PCR. Hasil elektroforesis verifikasi plasmid 5 dan 31 dengan PCR menunjukkan pita DNA gen GOX berukuran sekitar 1.779 pb. Koloni 5 dipilih untuk verifikasi dengan *single digestion Bam* HI. Verifikasi plasmid 5 dengan *single digestion Bam* HI menunjukkan pita DNA linear tunggal berukuran 7.742 pb.

Berdasarkan hasil verifikasi kandidat rekombinan dengan PCR dan *single digestion*, dapat disimpulkan bahwa plasmid koloni 5 merupakan koloni positif rekombinan membawa gen GOX. Klon plasmid 5 diverifikasi lebih lanjut dengan metode sekuensing. Verifikasi sekuensing dilakukan untuk mengetahui apabila terjadi perubahan basa nitrogen selama proses amplifikasi dengan PCR ataupun pengklonaan dan memastikan ketepatan orientasi penyisipan gen GOX pada plasmid pYES2/CT. Sekuens GOX dianalisis lebih lanjut dengan program BLASTN. Hasil analisis sekuens gen GOX dengan program BLASTN menunjukkan bahwa hasil pengklonaan memiliki *similarity* 99% dengan sekuens

Aspergillus niger glucose oxidase mRNA, complete cds (accession number J05242.1).

Sekuens gen GOX hasil sekuensing kemudian dibandingkan (*alignment*) dengan gen GOX dari *Aspergillus niger* NRRL-3 yang menjadi referensi pengklonaan (Kriechbaum *et al.* 1989). Hasil analisis sekuens menunjukkan bahwa klon GOX berada pada *Open Reading Frame* yang tepat dan terdapat mutasi delesi pada asam amino ke 582 sehingga terjadi perubahan kerangka baca asam amino dari serin (TCC) menjadi prolin (CCA). Perubahan kerangka baca asam amino mengakibatkan proses pembacaan basa nitrogen terhenti sebelum *polyhistidine region*. Mutasi delesi yang terjadi pada klon GOX berada pada domain pertama, karena mutasi berada pada domain yang tidak berfungsi untuk mengikat substrat β -D-*glucose* diharapkan enzim GOX tetap aktif (Hecht *et al.* 1993).

Hasil analisis menggunakan BLASTN dan DNASTAR menunjukkan bahwa penelitian pengklonaan gen GOX berhasil dilakukan. Klon rekombinan merupakan koloni bakteri *E. coli* DH5 α yang membawa vektor ekspresi pYES2/CT dengan sisipan gen GOX yang mengalami mutasi sehingga gen GOX tersebut tidak terjadi fusi dengan *polyhistidine* sehingga protein yang terekspresi tidak dapat dipurifikasi menggunakan histidin epitop. Akan tetapi karena gen tersebut tepat berada pada ORF maka plasmid rekombinan pYES-GOX dapat diekspresikan pada *Sacharomyces cereviceae* untuk memperoleh protein rekombinan GOX spesifik sebagai bahan dasar pembuatan biosensor glukosa.

Proses ekspresi protein rekombinan GOX diawali dengan transformasi plasmid rekombinan ke dalam *S. cerevisiae* INVSc1. Transformasi plasmid pYES2/CT menghasilkan 536 koloni dan transformasi plasmid rekombinan pYES-GOX menghasilkan 292 koloni. *S. cerevisiae* INVSc1 di minimal medium sebagai kontrol negatif tidak terdapat koloni tumbuh, sedangkan *S. cerevisiae* INVSc1 di medium YPD sebagai kontrol positif menghasilkan 1.036 koloni.

Kontrol negatif, sel *S. cerevisiae* INVSc1 yang tidak ditransformasi dengan pYES-GOX tidak dapat tumbuh pada medium seleksi (minimal medium). Hal ini disebabkan karena *S. cerevisiae* INVSc1 tidak mengandung gen *URA3* yang berfungsi sebagai penyeleksi pada minimal medium, sedangkan kontrol

positif *S. cerevisiae* INVSc1 dapat tumbuh pada media YPD. Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses transformasi berhasil dengan baik karena tidak terjadi kontaminasi. Selain itu, medium selektif juga dapat bekerja dengan baik.

Pada hasil isolasi dan verifikasi plasmid rekombinan terlihat pita pada posisi sekitar 1.779 pb yang menunjukkan gen GOX. Sedangkan, pada lajur kontrol negatif tidak terlihat adanya pita dan pada lajur kontrol positif terlihat pita pada posisi sekitar 322 pb. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi PCR berjalan baik dan tidak terjadi kontaminasi selama proses PCR. Dari hasil ini disimpulkan bahwa koloni transforman yang diverifikasi mengandung plasmid rekombinan pYES-GOX.

Ekspresi protein rekombinan pYES-GOX dilakukan dalam sistem ekspresi yeast *S. cerevisiae* INVSc1. Ekspresi protein rekombinan berlangsung dengan penambahan galaktosa berperan sebagai induser ekspresi. Protein rekombinan diinduksi dengan tiga variasi konsentrasi induser yaitu dengan 2, 4 dan 8 % induksi galaktosa. Masing-masing variasi kadar induksi dioptimasi dengan tiga variasi waktu induksi yaitu 24, 48 dan 72 jam.

Optimalisasi cara ekstraksi protein dilakukan dengan tiga metode berbeda. Hal tersebut bertujuan untuk mendapatkan hasil protein maksimal. Metode pertama menggunakan vortex dengan penambahan *glass beads*, metode kedua menggunakan sonikasi, vortex dengan penambahan *glass beads*, dan metode ketiga menggunakan sonikasi. Hasil ekstraksi yang didapatkan berupa supernatan dan pelet.

Hasil yang didapatkan dari hasil optimalisasi metode ekstraksi protein pYES-GOX, fase supernatan, pada 8% SDS-PAGE, pemanasan 65° C selama 5 menit yaitu metode ekstraksi yang optimal yaitu metode vortex dengan *glass beads* ditunjukkan dengan sedikitnya sampel yang mengalami degradasi dan proses lisis terjadi lebih sempurna, walaupun tidak menunjukkan perbedaan ekspresi yang jelas dengan metode ekstraksi lainnya. Penggunaan vortex dengan penambahan *glass beads* saat proses ekstraksi protein bertujuan untuk melisiskan sel secara sempurna (Invitrogen 2003).

Analisis keberadaan protein GOX menunjukkan perbedaan ekspresi yang jelas antara fase supernatan dan fase pelet. Pada fase supernatan protein

terekstraksi memiliki berat molekul lebih besar dibandingkan dengan protein fase pelet. Protein GOX memiliki berat molekul sekitar 66 kDa, oleh karena itu, walaupun hasil SDS-PAGE tidak memperlihatkan adanya protein spesifik berukuran 66 kDa, akan tetapi memperlihatkan fase supernatan kemungkinan mengandung protein GOX dengan berat molekul diantara 35—116 kDa.

Hasil yang didapatkan dari hasil optimalisasi konsentrasi induser galaktosa, metode ekstraksi protein vortex dengan *glass beads* pada 8% SDS-PAGE tidak menunjukkan perbedaan yang jelas. Perbedaan yang tidak jelas pada beberapa konsentrasi induser yang berbeda kemungkinan disebabkan karena galaktosa sebagai induser menginduksi protein GOX dalam jumlah yang kecil. Ekspresi protein dalam jumlah kecil menyebabkan protein tidak terlihat jelas pada gel hasil SDS-PAGE. GOX rekombinan dapat terlihat dengan jelas setelah dilakukan proses purifikasi (Crognale *et al.* 2006).

Hasil *glucose assay* untuk seluruh variasi konsentrasi induser menunjukkan bahwa dalam kondisi induksi 8% galaktosa selama 48 jam ekspresi protein GOX rekombinan fungsional, karenanya dapat dilanjutkan purifikasi dengan metode *size inclusion*. Ekspresi protein GOX rekombinan fungsional ditandai dengan perubahan absorbansi yang jelas yang diikuti dengan perubahan warna larutan menjadi merah. Adanya perubahan warna memudahkan untuk mengukur aktivitas enzim dan konsentrasi glukosa secara tidak langsung dengan bantuan spektrofotometer (Suhartono 1989).

Berdasarkan hasil *glucose assay* maka sampel hasil ekstraksi induksi 8% galaktosa selama 48 jam dipurifikasi proteinnya berdasarkan berat molekul menggunakan Sephadex G-100. Dari hasil fraksi-fraksi purifikasi tidak terlihat pita protein GOX spesifik berukuran sekitar 66 kDa pada sampel GOX induksi 8% glukosa yang diinkubasi 48 jam, akan tetapi pada *glucose assay* sampel tersebut menunjukkan perubahan warna yang mengindikasikan adanya reaksi yang terjadi antara enzim GOX dengan sampel glukosa, oleh karena itu dilakukan uji dengan cara meneteskan langsung protein pYES-GOX pada strip biosensor menggunakan potensiostat galvanostat. Hasil analisis berupa cyclic voltammogram (*cyclic voltammetry*).

Pada biosensor yang menggunakan sampel protein pYES-GOX hasil purifikasi (fraksi ke-8) konsentrasi 0,1 µg/µl terlihat adanya arus (*peak*), yang menunjukkan bahwa terdapat reaksi redox antara enzim GOX dengan sampel glukosa. Tinggi arus redox protein pYES-GOX hasil purifikasi yaitu 90 µAmp. Biosensor yang menggunakan sampel protein total *S. cerevisiae* INVSc1 yang mengandung pYES2/CT (kontrol negatif) konsentrasi 0,1 µg/µl tidak terlihat adanya reaksi redox (tidak ada *peak*), hal ini menunjukkan pada sampel protein total *S. cerevisiae* INVSc1 yang mengandung pYES2/CT tidak terdapat enzim GOX yang akan bereaksi dengan glukosa.

Arus redoks sampel GOX komersial (kontrol positif) konsentrasi 0,1 µg/µl yaitu 25 µAmp yang menunjukkan terdapat reaksi redox antara enzim dan sampel glukosa. Akan tetapi hasil ini lebih kecil dibandingkan dengan biosensor yang menggunakan sampel GOX rekombinan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena enzim GOX komersial yang digunakan mengalami penurunan kualitas karena terlalu lama disimpan pada suhu yang kurang sesuai. Namun mutasi yang terjadi pada GOX rekombinan menyebabkan lebih aktif daripada GOX komersial.

Analisis *Scanning Electron Microscopy* (SEM) bertujuan untuk mengetahui gambaran dari permukaan elektroda yang telah diberi perlakuan enzim. Hasil SEM pada sampel GOX komersial dan sampel GOX rekombinan terlihat berbeda. Pada sampel GOX komersial terlihat bahwa protein mengisi di beberapa lubang (yang merupakan carbon), sedangkan pada sampel GOX rekombinan terlihat bahwa semua lubang (carbon) terisi penuh. Menurut Yongjin Zou *et al.* (2008), biosensor yang baik apabila sampel enzim yang digunakan terdistribusi dengan baik sehingga permukaan elektroda terlihat kompak, homogen dan padat. Susunan ini dapat menguntungkan enzim untuk mempertahankan bioaktivitas enzim.

Hasil SEM memberikan kemungkinan arus redoks pada biosensor yang menggunakan GOX rekombinan lebih besar dibandingkan arus pada biosensor yang menggunakan GOX komersial, karena sampel GOX rekombinan terdistribusi dengan baik pada permukaan elektroda yang akan meningkatkan arus redoks biosensor.

RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

1. Gen *glucose oxidase* (GOX) telah berhasil diklona dari *Aspergillus niger* ke dalam *Escherichia coli* DH5 α dengan menggunakan vektor pYES2/CT.
2. Mutasi delesi yang terjadi pada klon GOX berada pada domain pertama (asam amino ke 582). Mutasi tersebut tidak mempengaruhi aktivitas dari enzim GOX sehingga diharapkan enzim GOX tetap aktif.
3. Plasmid rekombinan pYES-GOX berhasil ditransformasi ke dalam *S. cerevisiae* INVSc1 menggunakan metode LiAc.
4. Total protein diekstraksi menggunakan berbagai variasi metode ekstraksi. Metode vortex dengan penambahan *glass beads* sebagai teknik ekstraksi yang optimal.
5. Protein rekombinan diinduksi dengan konsentrasi induser 2, 4 dan 8% galaktosa. Hasil induksi ekspresi protein tidak terlihat secara jelas, walaupun kemungkinan besar protein rekombinan GOX terdapat pada fase supernatan.
6. Berdasarkan uji menggunakan *glucose assay*, protein rekombinan GOX induksi 8% galaktosa selama 48 jam fungsional. Protein rekombinan GOX fungsional dipurifikasi kemudian diuji menggunakan biosensor glukosa menunjukkan hasil yang lebih fungsional serta mempunyai aktivitas lebih tinggi dibandingkan GOX komersial.

SARAN

Beberapa perbaikan perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil ekspresi protein GOX rekombinan yang optimal antara lain optimalisasi induksi dengan penambahan variasi konsentrasi induser galaktosa dan waktu inkubasi. Protein rekombinan GOX dapat dipurifikasi menggunakan metode lainnya seperti *Ion Exchange Chromatography*. Optimalisasi metode purifikasi perlu dilakukan dengan melakukan fusi protein rekombinan GOX dengan epitop His₆ atau bahkan His₁₂, kemudian sampel protein dipisahkan menggunakan protein konsentrator.

Akhirnya, protein rekombinan GOX dapat dikeringkan menggunakan metode liofilisasi untuk mencegah protein terdegradasi.



DAFTAR ACUAN

- Atun, M. 2010. *Diabetes Melitus*. Kreasi Wacana, Bantul: v + 150 hlm.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko & J. Parker. 1994. *Biology of microorganisms*. 7th ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Crognale, S., V. Pulci, V. Brozzoli, M. Petruccioli & F. Federici. 2006. Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**(6): 1230—1235 hlm.
- Cullen, D. 2007. The genome of an industrial workhorse. Sequencing of the filamentous fungus *Aspergillus niger* offers new opportunities for the production of specialty chemicals and enzymes. *Nature Biotechnology*. **25**(2): 189—190 hlm.
- Frederick, K.R., J. Tung, R.S. Emerick, F.R. Masiarz, S.H. Chamberlain, A. Vasavada & S. Rosenberg. 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *Biological chemistry*. **265**(7): 3793—3802 hlm.
- Hara, S. & M. Yamakawa. 1996. Production in *Escherichia coli* of moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **220**(3): 664—669 hlm.
- Hecht, H.J., H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid & D. Schomburg. 1993a. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. **229**(1): 153—172 hlm.
- Invitrogen. 2003. *pYES2/CT, pYES3/CT, and pYC2/CT yeast expression vectors with C-terminal tags and auxotrophic selection markers*. Invitrogen Corp., California: 31 hlm.
- Katrlík, J., J. Svorc, M. Rosenberg & S. Miertus. 1996. Whole cell amperometric biosensor based on *Aspergillus niger* for determination of glucose with enhanced upper linearity limit. *Analytica Chimica Acta*. **331**(3): 225—232 hlm.

- Kriechbaum, M., H.J. Heilmann, F.J. Wientjes, M. Hahn, K.D. Jany, H.G. Gassen, F. Sharif & G. Alaeddinoglu. 1989. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *Elsevier Science Publishers Biomedical Division*. **255**(1): 63—66 hlm.
- Promega. 2007. *T4 DNA ligase usage information*. Promega Corp., Madison: 2 hlm.
- Pulci, V., R. D'Ovidio, M. Petruccioli & F. Federici. 2004. The glucose oxidase of *Penicillium variabile* P16: gene cloning, sequencing and expression. *Applied Microbiology*. **38**(3): 233—238 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume 1—3. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A.14.1 + R.22 + I.44 hlm.
- Simpson, C., J. Jordan, N.S. Gardiner & C. Whiteley. 2007. Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp. CBS 120262 optimally active at neutral pH. *Protein Expression and Purification*. **51**(2): 260—266 hlm.
- Smith, R., D. Kephart & G. Kobs. 1997. PCR core system : Complete reagent systems for DNA amplification. *Promega Notes Magazine*. **62**: 5—8 hlm.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan bioteknologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor: i + 322 hlm.
- Winfrey, M.R., M.A. Rott & A.T. Wortman. 1997. *Unraveling DNA: Molecular biology for the laboratory*. Prentice Hall, Upper Saddle River: xxviii + 369 hlm.
- Witarto, A.B. 2000. From bench to business: The story of glucose sensor. *Proceedings of the 9TH Scientific Meeting (Temu Ilmiah TI-IX PPI 2000)*. 5—8 hlm.
- Witt, S., M. Singh & H.M. Kalisz. 1998. Structural and kinetic of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(4): 1405—1411 hlm.

- Wong, D.W.S. 1997. *The ABCs gene cloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.
- Yamaguchi, M., Y. Tahara, A. Nakano & T. Taniyama. 2007. Secretary and continuous expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. **55**(2): 273—278 hlm.
- Yongjin Zou., Cuili Xiang, Li-Xian Sun & Fen Xu. 2008. Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol-gel. *Biosensors and Bioelectronics*. **23**(7): 1010—1016 hlm.

