



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**KLONING DAN SEKUENSING GEN L-ASPARAGINASE YANG  
BERASAL DARI BAKTERI *Erwinia raphontici*  
DAN *Bacillus circulans* DI *E. coli***

**SKRIPSI**


**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Farmasi**

**FIKA ENRI APRIGIYONIES  
0706163363**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI REGULER FARMASI  
DEPOK  
JUNI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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



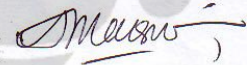

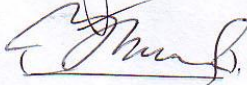
Nama : Fika Enri Aprigiyonies  
NPM : 0706163363  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 27 Juni 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Fika Enri Aprigiyonies  
NPM : 0706163363  
Program Studi : Reguler Farmasi  
Judul Skripsi : Kloning dan Sekuensing Gen L-Asparaginase yang Berasal dari Bakteri *Erwinia raphontici* dan *Bacillus circulans* di *E. coli*.

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

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Maksum Radji, M.Biomed. (  )  
Pembimbing II : Dr. Is Helianti, M.Sc. (  )  
Penguji I : Dr. Amarila Malik, M.Si., Apt. (  )  
Penguji II : Dra. Juheini Amin, M.Si. (  )  
Penguji III : Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt. (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 27 Juni 2011

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kepada Allah S.W.T karena atas segala rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari sepenuhnya bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangatlah sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu saya hendak mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Ir. Witono Basuki, M.Sc selaku direktur Pusat Teknologi Bioindustri (PTB) Pusat Penerapan dan Pengkajian Teknologi (BPPT) Serpong yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian di PTB BPPT Serpong.
3. Dr. Maksum Radji, M.Biomed selaku dosen pembimbing I dan Dr. Is Helianti, M.Sc selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bantuan berupa bimbingan dan ilmu selama penelitian berlangsung dan penyusunan skripsi.
4. Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc. selaku pembimbing akademik yang telah banyak membantu selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Seluruh jajaran pengajar, karyawan dan laboran yang telah banyak membantu penulis selama masa pendidikan hingga penelitian di Departemen Farmasi.
6. Ibu Niknik, Ibu Titut, Kak Maria Ulfah, Kak Lina, Kak Keis, Kak Syafa, Ahmad Nailul dan jajaran peneliti dan karyawan di PTB BPPT Serpong yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis selama penelitian berlangsung.

7. Ayah Syamsu, Bunda Endah, Fauzi, Bapak M. Ilham sekeluarga, Ibu Tri D.(Akses UI), dan pihak keluarga lainnya yang telah banyak memberikan segala do'a dan dukungan baik moral maupun material kepada penulis hingga penulis mampu menyelesaikan masa pendidikan dan penelitiannya.
8. Agus, Adeline, Reza, Kak Tri, Sekar, dan sahabat-sahabat atas segala bantuan dan dukungan kepada penulis.
9. Teman-teman Farmasi UI angkatan 2007 dan rekan-rekan mahasiswa farmasi lainnya.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan sehingga terselesaikannya skripsi ini

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masihlah jauh dari sempurna oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Akhir kata penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama : Fika Enri Aprigiyonies  
NPM : 0706163363  
Program Studi : Reguler  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

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

Kloning dan Sekuensing Gen L-Asparaginase yang Berasal dari Bakteri *Erwinia raphontici* dan *Bacillus circulans* di *E. coli*.

berserta 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 : 27 Juni 2011

Yang menyatakan



( Fika Enri Aprigiyonies )

## ABSTRAK

Nama : Fika Enri Aprigiyonies  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Kloning dan Sekuensing Gen L-Asparaginase yang Berasal dari Bakteri *Erwinia raphontici* dan *Bacillus circulans* di *E. coli*.

Enzim asparaginase digunakan untuk terapi penyembuhan leukemia pada anak-anak (*Acute Lymphoblastic Leukemia*). Produksi enzim asparaginase saat ini sebagian besar berasal dari bakteri *E. coli* dimana penggunaannya menimbulkan reaksi alergi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi gen asparaginase yang berasal dari bakteri *Erwinia sp.* dan *Bacillus circulans*, serta melakukan kloning dan sekuensing pada gen asparaginase yang didapat. Isolasi gen dilakukan dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan genom DNA bakteri *Erwinia sp.* dan *Bacillus circulans* dengan primer yang telah didesain. Primer yang didesain adalah primer *degenerated* hasil *alignment* dari berbagai gen asparaginase yang berasal dari bakteri yang bergenus sama. Dengan menggunakan primer tersebut, berhasil didapat amplicon PCR yang spesifik dari genom bakteri *Erwinia raphontici*, *Erwinia cypripedii*, dan *Bacillus circulans*. Produk PCR diligasikan pada vektor kloning pGEM-T Easy dan dilanjutkan dengan mentransformasikannya ke *E. coli*. Sekuensing dilakukan pada transforman yang positif. Hasil sekuensing dianalisis dan di dapat gen asparaginase untuk sekuens *Erwinia raphontici* dan *Bacillus circulans* yang diprediksi dapat menyandikan enzim aktif

Kata kunci : *Acute Lymphoblastic Leukemia*, Asparaginase, *Bacillus circulans*, *Erwinia raphontici*, kloning, PCR, sekuensing.  
xiii+99 halaman : 35 gambar; 6 tabel; 8 lampiran  
Daftar Pustaka : 34 (1966-2010)

## ABSTRACT

Name : Fika Enri Aprigiyonies  
Program Study: Pharmacy  
Title : Cloning and Sequencing L-ASparaginase Gene from *Erwinia raphontici* and *Bacillus circulans* in *E. coli*

Asparaginase is to be used for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in children. Nowadays, production of asparaginase is mainly from *E. coli* that can lead to allergic reactions. This research was designed to isolate asparaginase gene from *Erwinia sp.* and *Bacillus circulans*, to clone and to sequence asparaginase gene obtained before. Gene isolation was conducted with PCR (Polymerase Chain Reaction) method using *Erwinia sp.* and *Bacillus circulans*'s DNA genome with primer that was already designed. Designed primer was degenerated primer as an alignment result from the same genus bacteria genes. By using the mentioned designed primer, specific PCR product was successfully retrieved from *Erwinia raphontici*, *Erwinia cypripedii*, and *Bacillus circulans*'s genome. PCR product was ligated to a cloning vector pGEM-T Easy and was continued to be transformed to *E. coli*. Sequencing was conducted to positive transformans and the sequences result was analyzed. *Erwinia raphontici* and *Bacillus circulans*'s sequence was successfully retrieved and predicted to encode the putative asparaginase

Keyword : *Acute Lymphoblastic Leukemia*, Asparaginase, *Bacillus circulans*, cloning, *Erwinia raphontici*, PCR, sequencing  
xiii+99 pages; 35 pictures; 6 tables; 8 appendixes  
Bibliography: 34 (1966-2010)



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	2
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>3</b>
2.1 L-Asparaginase .....	3
2.2 Mikroba Yang Diprediksi Merupakan Sumber Enzim Asparaginase Yang digunakan Dalam Penelitian.....	4
2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	6
2.4 Bioinformatik.....	9
2.5 Elektroforesis .....	9
2.5 Plasmid Sebagai Vektor Kloning.....	10
2.7 Ligasi.....	12
2.8 Transformasi .....	13
2.9 Seleksi Hasil Transformasi Koloni Putih Biru Dan Ampicillin.....	13
2.10 Sekuensing .....	14
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN</b> .....	<b>15</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	15
3.2 Alat.....	15
3.3 Bahan .....	15
3.4 Medium Dan Pembuatan Medium .....	16
3.5 Cara Kerja .....	18
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>27</b>
4.1 Desain Primer.....	27
4.2 Isolasi Genom DNA.....	31
4.3 Hasil PCR.....	31
4.4 Hasil Kloning Produk PCR Ke Dalam pGEM-T Easy .....	34
4.5 Hasil Sekuensing.....	37
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>44</b>
5.1 Kesimpulan .....	44
5.2 Saran .....	44
<b>DAFTAR ACUAN</b> .....	<b>45</b>

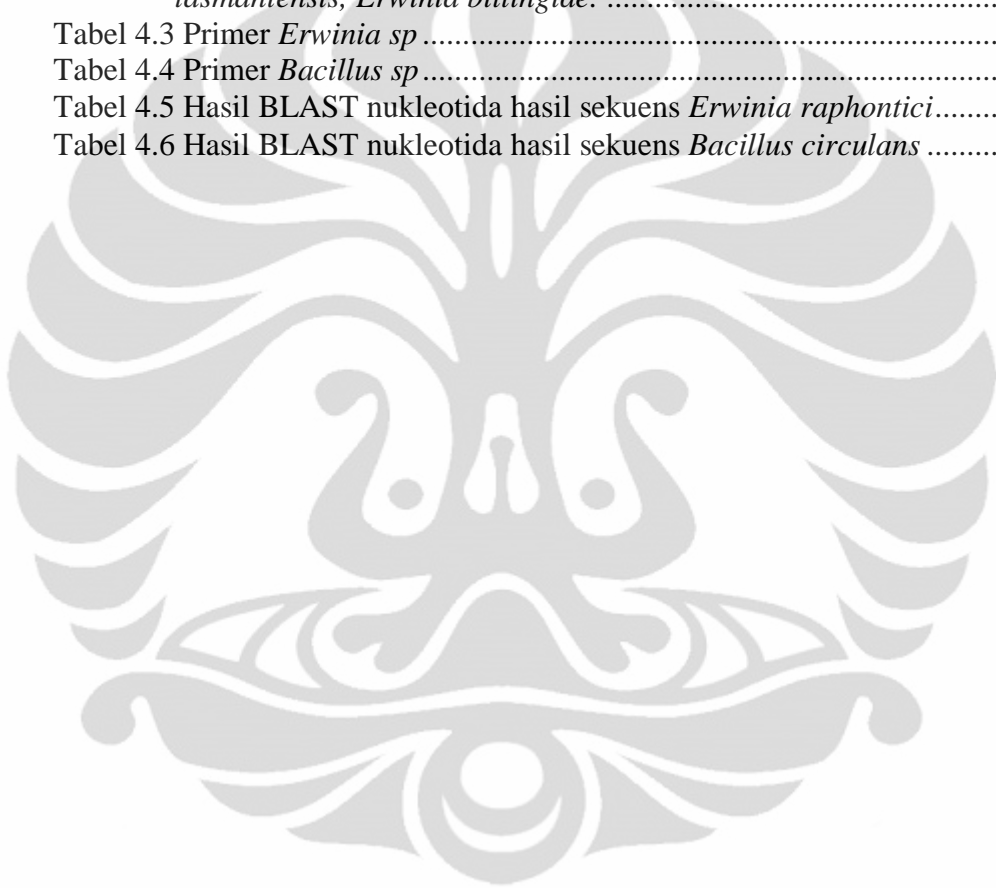
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Vektor plasmid pGEM-T Easy.....	48
Gambar 4.1 <i>Temperature melting</i> untuk primer <i>forward</i> <i>Erwinia sp.</i> desain1 .....	49
Gambar 4.2 <i>Temperature melting</i> untuk primer <i>reverse</i> <i>Erwinia sp.</i> desain1 .....	50
Gambar 4.3 <i>Temperature melting</i> untuk primer <i>forward</i> <i>Erwinia sp.</i> desain2.....	51
Gambar 4.4 <i>Temperature melting</i> untuk primer <i>reverse</i> <i>Erwinia sp.</i> desain2.....	52
Gambar 4.5 Elektroforesis hasil isolasi genom DNA <i>Erwinia cypripedii</i> .....	53
Gambar 4.6 Elektroforesis hasil PCR dengan primer desain 2 dengan genom DNA <i>Erwinia nimipressuralis</i> , <i>Erwinia cypropedii</i> , dan <i>Erwinia raphontici</i> .....	54
Gambar 4.7 Elektroforesis hasil PCR untuk melihat spesifitas dan kemungkinan kontaminasi primer <i>Erwinia sp</i> dengan menggunakan genom DNA <i>Erwinia raphontici</i> .....	55
Gambar 4.8 Elektroforesis Hasil PCR untuk melihat spesifitas primer <i>Erwinia sp</i> dengan menggunakan genom DNA <i>Erwinia cypripedii</i> .....	56
Gambar 4.9 Elektroforesis hasil PCR dan untuk melihat spesifitas primer <i>Bacillus sp.</i> dengan menggunakan genom DNA <i>Bacillus circulans</i> .....	57
Gambar 4.10 Elektroforesis hasil PCR dan untuk melihat kemungkinan kontaminasi primer <i>Bacillus sp.</i> dengan menggunakan genom DNA <i>Bacillus circulans</i> .....	58
Gambar 4.11 LB agar ampisilin yang ditumbuhi koloni putih biru hasil transformasi .....	59
Gambar 4.12 Elektroforesis hasil isolasi plasmid <i>Erwinia raphontici</i> dan <i>Erwinia cypripedii</i> yang telah dipotong enzim restriksi EcoR1.....	60
Gambar 4.13 Elektroforesis hasil isolasi plasmid <i>Bacillus circulans</i> yang telah dipotong enzim restriksi EcoR1 .....	61
Gambar 4.14 Elektroforesis hasil isolasi plasmid menggunakan kit yang akan digunakan untuk sekuensing .....	62
Gambar 4.15 Elektroforesis hasil isolasi plasmid menggunakan kit yang telah dipotong dengan enzim restriksi EcoR1 .....	63
Gambar 4.16 Konstruksi plasmid pGEM-Asp <i>Erwinia raphontici</i> .....	64
Gambar 4.17 Konstruksi plasmid pGEM-Asp <i>Bacillus circulans</i> .....	65
Gambar 4.18 Analisis pohon filogenetik untuk <i>Erwinia raphontici</i> dan <i>Bacillus circulans</i> rekombinan.....	66
Gambar 4.19 <i>Alignment</i> nukleotida <i>Erwinia raphontici</i> hasil sekuens dengan nukleotida <i>Erwinia tasmaniensis</i> .....	68
Gambar 4.20 <i>Alignment</i> nukleotida <i>Erwinia raphontici</i> hasil sekuens	

dengan nukleotida <i>Erwinia carotovora</i> .....	69
Gambar 4.21 <i>Alignment</i> asam amino <i>Erwinia raphontici</i> hasil sekuens dengan asam amino <i>Erwinia pyrifoliae</i> .....	70
Gambar 4.22 <i>Alignment</i> asam amino <i>Erwinia raphontici</i> hasil sekuens dengan asam amino <i>Erwinia tasmaniensis</i> .....	71
Gambar 4.23 <i>Alignment</i> nukleotida <i>Bacillus subtilis</i> hasil sekuens dengan nukleotida <i>Bacillus circulans</i> .....	72
Gambar 4.24 <i>Alignment</i> nukleotida <i>Bacillus megaterium</i> hasil sekuens dengan nukleotida <i>Bacillus circulans</i> .....	73
Gambar 4.25 <i>Alignment</i> asam amino <i>Bacillus circulans</i> hasil sekuens dengan asam amino <i>Bacillus subtilis</i> .....	74
Gambar 4.26 <i>Alignment</i> asam amino <i>Bacillus circulans</i> hasil sekuens dengan asam amino <i>Bacillus subtilis</i> .....	75
Gambar 4.27 <i>Thermocycler</i> yang digunakan untuk PCR .....	75
Gambar 4.28 Alat elektroforesis .....	75
Gambar 4.29 <i>Thermomixer</i> .....	76
Gambar 4.30 Sentrifuge dengan pendingin.....	76
Gambar 4.31 <i>Shaker</i> .....	77
Gambar 4.32 <i>Laminar Air Flow</i> .....	77
Gambar 4.33 Sentrifuge dengan pendingin.....	78
Gambar 4.34 Autoklaf .....	78

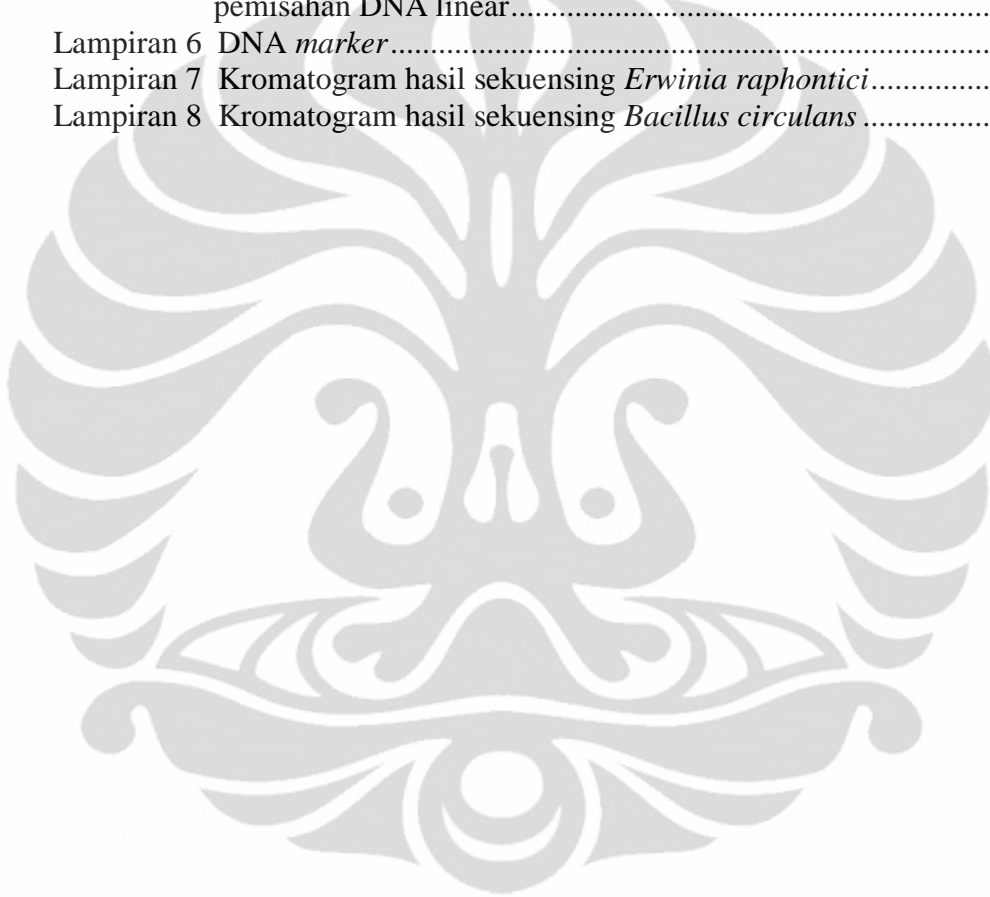
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 4.1 <i>Alignment</i> nukleotida penyandi asparaginase dari bakteri : <i>Carotovorum wasabiae</i> , <i>Carotovorum carotovorum</i> (2 strain), dan <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (Ansb2) .....	79
Tabel 4.2 <i>Alignment</i> nukleotida penyandi asparaginase dari bakteri : <i>Erwinia amylovora</i> (2 strain), <i>Erwinia pyrifoliae</i> , <i>Erwinia</i> <i>tasmaniensis</i> , <i>Erwinia billingiae</i> . .....	82
Tabel 4.3 Primer <i>Erwinia sp</i> .....	86
Tabel 4.4 Primer <i>Bacillus sp</i> .....	86
Tabel 4.5 Hasil BLAST nukleotida hasil sekuens <i>Erwinia raphontici</i> .....	86
Tabel 4.6 Hasil BLAST nukleotida hasil sekuens <i>Bacillus circulans</i> .....	87



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 Cara pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian .....	88
Lampiran 2 Komposisi PCR .....	90
Lampiran 3 Proses PCR .....	93
Lampiran 4 Proses elektroforesis .....	94
Lampiran 5 Hubungan antara konsentrasi agarose dalam gel dengan pemisahan DNA linear .....	94
Lampiran 6 DNA <i>marker</i> .....	95
Lampiran 7 Kromatogram hasil sekuensing <i>Erwinia raphontici</i> .....	96
Lampiran 8 Kromatogram hasil sekuensing <i>Bacillus circulans</i> .....	98



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

L-asparaginase (L-asparagin amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) (Kotzia & Labrou, 2005) adalah enzim yang menghidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan ammonia (Youseff & Al-Omair, 2008). Enzim ini telah banyak dimanfaatkan dalam terapi leukemia, terutama pada anak-anak (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) (Pieters & Carroll, 2008).

Sel leukemia memerlukan L-asparagin untuk pertumbuhannya, akan tetapi sel ini memiliki sifat defisiensi L-asparagin sintetase sehingga memerlukan L-asparagin dari luar, tidak seperti sel normal. L-asparaginase yang digunakan sebagai terapi menyebabkan sel malignan tersebut gagal menyelesaikan sintesis proteinnya karena kekurangan L-asparagin yang berujung pada kehancuran sel. Oleh karena itu, L-asparaginase dapat digunakan sebagai agen terapi penderita leukemia (Kotzia & Labrou, 2007; Youssef & Al-Omair, 2008).

L-asparaginase terdistribusi secara luas pada sel eukariot dan prokariot (Youseff & Al-Omair, 2008). L-asparaginase yang telah banyak digunakan adalah yang berasal dari *Escherichia coli* (Elspar®) (Kotzia & Labrou, 2005; Kotzia & Labrou, 2007), tetapi terdapat efek samping yakni reaksi alergi yang timbul pada pasien (Moola, Scawen, Atkinson, & Nicolls, 1994). Oleh karena itu diperlukan penelitian untuk mendapatkan sumber baru atau penghasil L-asparaginase yang lebih baik dan seminimal menyebabkan reaksi alergi.

Dari penelitian sebelumnya (Kotzia & Labrou, 2007) diketahui bahwa L-asparaginase yang berasal bakteri *Erwinia sp* lebih tidak menimbulkan reaksi alergi dan memiliki spesifitas yang lebih baik dibanding dengan yang berasal dari *E. coli*. L-asparaginase yang berasal dari *Erwinia chrysanthemi* mempunyai spesifitas dan efisiensi katalitik yang lebih baik terhadap L-asparagin (Kotzia & Labrou, 2007). Respon antigenesitas L-asparaginase yang berasal *Erwinia chrysanthemi* dapat diturunkan dengan *site-directed* mutagenesis (Moola, Scawen, Atkinson, & Nicolls, 1994). Dapat pula diketahui bahwa produksi L-

asparaginase yang berasal dari *Bacillus circulans* efektif dan memiliki aktifitas antineoplastik yang baik (Prakasham et al., 2010).

L-asparaginase untuk penggunaan terapi pada saat ini belum diproduksi di Indonesia sehingga masih dilakukan penggunaan produksi L-asparaginase dari luar negeri. Hal tersebut mengakibatkan diperlukannya waktu untuk pengadaan dan biaya yang tidak murah untuk terapi menggunakan L-asparaginase. Hal yang lebih baik jika Indonesia mampu memproduksi L-asparaginase tersebut.

Dalam penelitian ini dilakukan kloning dan sekuensing L-asparaginase dari beberapa spesies *Erwinia sp* dan *Bacillus circulans*, sebagai tahap awal proses produksi enzim asparaginase rekombinan.

## 1.2 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mendesain *degenerated primer* untuk mengamplifikasi gen asparaginase.
2. Melakukan PCR DNA genom bakteri *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia raphontici*, *Erwinia cypripedii*, dan *Bacillus circulans* dengan *degenerated primer* yang telah didesain.
3. Melakukan kloning produk PCR ke dalam plasmid vektor pGEM-T Easy.
4. Melakukan sekuensing pada produk PCR yang telah diklon.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 L-asparaginase

L-asparaginase (L-asparagin amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) (Kotzia *et al.* 2005) adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan ammonia.



Pada tahun 1961, Broome yang saat itu bekerja di laboratorium milik Kidd sukses mendemonstrasikan bahwa aktifitas antilimfoma pada marmut adalah aktifitas enzim L-asparaginase. Tidak lama berselang, Yellin dan Wriston melakukan pemurnian dua isoform L-asparaginase dari serum marmut. Akan tetapi, produksi L-asparaginase dari serum marmot sulit dilakukan sehingga mendorong para peneliti untuk mencari sumber alternatif dari L-asparaginase lain. Kemudian, pada tahun 1964 Masburn dan Wriston melaporkan purifikasi L-asparaginase yang berasal dari *E. coli*, juga tentang aktifitas antitumornya, dan kemungkinannya untuk produksi skala besar (Prakasham *et al.*, 2010). Selain itu, asparaginase dapat pula berasal dari tanaman, diantaranya: kacang kedelai (Streeter, 1977), kacang kapri atau *Pisum sativum* (Siecichowich, Ireland, & Joy, 1985).

Asparaginase sampai saat ini dimanfaatkan sebagai enzim terapi untuk leukemia. Sel leukemia membutuhkan L-asparagin demi kelangsungan hidupnya. L-asparagin didapatkan oleh sel tersebut dari luar atau eksogen karena sifat sel leukemia yang kekurangan L-asparagin sintetase. L-asparaginase dapat menghidrolisis L-asparagin yang mengakibatkan sel leukemia kekurangan pasokan L-asparagin sehingga gagal melakukan sintesis protein dan berujung pada kematian sel atau apoptosis (Kotzia & Labrou, 2007; Youssef & Al-omar, 2008).

Produksi L-asparaginase yang bersumber dari hewan ataupun tanaman akan menemui beberapa kendala diantaranya adalah sulitnya perbanyakannya dari produksi enzim. Oleh karena itu produksi L-asparaginase yang berasal dari



mikroorganisme lebih dipilih karena mikroorganisme mudah untuk memperbanyak diri sehingga perbanyak produksi enzim mudah untuk dilakukan.

Pada saat ini, L-asparaginase telah banyak digunakan pada terapi untuk penderita leukemia (McGrath & Walsh, 2006), terutama *acute lymphoblastic leukaemia* (ALL) yang banyak terjadi pada anak-anak (Pieters & Carroll, 2008). L-asparaginase yang telah banyak digunakan sebagai agen terapi berasal dari bakteri *Eschericia coli* (Elspar®) dan *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase®) (Khushoo, Pal, Singh, & Mukherjee, 2004). Akan tetapi terdapat efek samping dari L-asparaginase yang berasal dari *Eschericia coli* yakni reaksi alergi atau hipersensitifitas (Moola, Scawen, Atkinson, & Nicolls, 1994). Oleh karena itu sangat penting untuk dapat menemukan sumber baru dari L-asparaginase yang seminimal menyebabkan reaksi alergi dan efek samping lain.

## **2.2 Mikroba Yang Digunakan Dalam Penelitian Yang Diprediksi Merupakan Sumber Enzim Asparaginase**

Terdapat berbagai jenis mikroba yang dapat menjadi sumber enzim L-asparaginase. Sumber L-asparaginase yang tergolong dalam fungi diantaranya: *Aspergillus sp* dan *Penicilium sp* (Sarquis, Oliveira, Santos, & Costa, 2004), kapang endofit, diantaranya: *Hiptage benghalensis*, *Betula alnoides*, *Adenanthera microsperma*, *Eupatorium odoratum*, dan *Houttuynia cordata* (Theantana, Hyde, & Lumyong, 2007). Mikroba lain sebagai sumber L-asparaginase adalah bakteri, diantaranya: bakteri gram positif *Bacillus subtilis* (Sun & Setlow, 1991), *Bacillus circulans* (Hymavathi, Sathish, Rao, & Prakasham, 2008; Prakasham, Hymavathi, Rao, Arepali, & Rao, 2010), *Bacillus cereus* (Sunitha, Ellaiah, & Devi, 2010), dan *Corynebacter glutamicum* (Mesas, Gil, & Mart, 1990), bakteri gram negatif *Eschericia coli* (Schwartz, Reevesi, & Broome, 1966; Bilimoria, 1969), *Pseudomonas acidovorans* (Davidsons, Brear, Wingard, Hawkins, & Kitto, 1977), *Pseudomonas aeruginosa* (Manikandan, Pratheeba, Sah, & Sah, 2010), *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia & Labrou, 2007), dan *Erwinia carotovora* (Shifrin, Solis, & Chaiken 1973; Kotzia & Labrou, 2005).

Pada penelitian ini, sumber L-asparaginase yang digunakan adalah *Erwinia sp* dan *Bacillus circulans*. *Erwinia sp* adalah bakteri gram negatif yang sering menimbulkan pembusukan pada tanaman atau sayuran. Sebagai contoh adalah *Erwinia carotovora* dan *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* dapat menimbulkan pembusukan pada kentang pasca panen (Kelaniyangoda, Ekanayake, Kekunadola, Weerasinghe, & Subhashini, 2004) dan *Erwinia chrysanthemi* dapat menimbulkan pembusukan pada tanaman lidah buaya (Supriadi, Ibrahim, & Taryono, 2002). Sedangkan *Bacillus sp.* adalah bakteri gram positif penyebab beberapa penyakit infeksi (Gurol, Kipritci, Selcuk, Koc, & Kocagoz, 2007). Tentunya akan sangat menguntungkan jika *Erwinia sp.* dan *Bacillus circulans* dapat dijadikan sumber enzim L-asparaginase untuk terapi pasien leukemia.

Adapun taksonomi dari *Erwinia sp* yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

*Erwinia sp.* (gram negatif)

Diperoleh dari Institut Teknologi Bandung (ITB)

Taksonomi

Kingdom : Bacteria  
 Filum : Proteobacteria  
 Klas : Gammaproteobacteria  
 Ordo : Enterobacteriales  
 Famili : Noctuoidea  
 Genus : *Erwinia*  
 Spesies : *Erwinia nimipressuralis*

(Garrity, 2006b)

Kingdom : Bacteria  
 Filum : Proteobacteria  
 Klas : Schizomycetes  
 Ordo : Eubacteriales  
 Famili : Enterobacteriaceae  
 Genus : *Erwinia*

Spesies : *Erwinia cypripedii*  
(Garrity, 2006a)

Kingdom : Bacteria  
 Filum : Proteobacteria  
 Klas : Gammaproteobacteria  
 Ordo : Enterobacteriales  
 Famili : Noctuoidea  
 Genus : Erwinia  
 Spesies : *Erwinia rhapontici*  
(Garrity, 2006c)

Adapun Taksonomi dari *Bacillus circulans* yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

*Bacillus circulans*. (gram positif)

Taksonomi

Kingdom : Bacteria  
 Filum : Firmicutes  
 Klas : Bacilli  
 Ordo : Bacillales  
 Famili : Bacillaceae  
 Genus : Bacillus  
 Spesies : *Bacillus circulans*  
(“Uniprot,” 2002-2011)

### 2.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR adalah teknik kloning dalam biologi molekuler untuk amplifikasi fragmen DNA sehingga menghasilkan jutaan salinan fragmen DNA dalam waktu yang cepat. Dalam suatu literatur (Chen & Janes, 2002) menyebutkan amplifikasi dari PCR dapat dikategorikan menjadi beberapa kategori, diantaranya adalah:

1. *Standard* PCR, meliputi amplifikasi dari sekuens DNA tunggal yang ukurannya kurang dari 5 kb. PCR jenis ini dapat digunakan untuk beberapa aplikasi seperti: sekuensing siklus, kloning, dan deteksi mutasi.
2. *Long* PCR, digunakan untuk amplifikasi dari sekuens tunggal DNA dengan ukuran antara 5 kb sampai 40 kb. Aplikasinya meliputi sekuensing rantai panjang seperti: amplifikasi dari genom lengkap, untuk deteksi berbasis PCR dan diagnosis dari peristiwa delesi dan insersi yang bermakna secara klinik, kloning molekular dan lain sebagainya.
3. *Multiplex* PCR, digunakan untuk amplifikasi dari sekuens DNA multiple dengan ukuran kurang dari 5 kb. PCR jenis ini biasa digunakan dalam beberapa aplikasi seperti: studi forensik, identifikasi patogen, analisis pautan, kuantifikasi cetakan *template*, diagnosis penyakit genetik, dan lain sebagainya.
4. *Degenerated* PCR, adalah teknik PCR yang menggunakan primer hasil *degenerated* dan belum ditambahkan enzim restriksi, adaptor, atau histidin taq.

Proses PCR terdiri dari serangkaian siklus temperatur (pemanasan dan pendinginan) yang berulang dan tiap-tiap siklus terdiri atas tahapan sebagai berikut:

1. Denaturasi (*denaturation*) temperatur  $\pm 94^{\circ}\text{C}$ , dimana dua untai dari cetakan DNA terpisah antara satu dan yang lainnya.
2. Penempelan (*annealing*) temperatur  $\pm 55\text{-}60^{\circ}\text{C}$ , pada temperatur ini primer dapat berhibridisasi dengan cetakan DNA. Temperatur pada tahap ini disesuaikan dengan  $T_M$  atau *temperature melting* dari primer.
3. Pemanjangan (*elongation/extension*) temperatur  $\pm 68\text{-}72^{\circ}\text{C}$ , temperatur ini adalah temperatur yang optimal bagi enzim polimerase untuk mensintesis untai DNA yang kedua (Sambrook & Russell, 2001; Chen & Janes, 2002).

Komponen dari PCR terdiri dari:

1. Cetakan DNA (*DNA Template*).  
Kualitas dan konsentrasi dari cetakan DNA memberikan pengaruh secara langsung terhadap hasil PCR. Untuk amplifikasi DNA genom, dapat digunakan 100 – 500 ng cetakan DNA. Dapat dilakukan pemurnian untuk

meningkatkan kualitas cetakan DNA yang digunakan untuk PCR, baik dengan menggunakan kit ataupun dengan metode pemurnian standar (Sambrook & Russell, 2001).

2. Enzim taq-DNA polymerase.

Taq-polimerase biasa digunakan karena sifatnya yang termostabil. Taq-DNA polimerase dimurnikan dari bakteri gram negatif *Thermus aquaticus*. Konsentrasi yang biasa digunakan adalah 2.5 unit per 100  $\mu$ L atau dapat dilakukan optimasi dengan dengan rentang konsentrasi 0,5-5 unit per 100  $\mu$ L.

3. Empat jenis deoksinukleotida trifosfat (dNTP : dATP, dTTP, dGTP, dCTP).

4. Satu pasang oligonukleotida primer.

Primer adalah untai nukleotida yang menyediakan gugus 3'OH pada ujungnya. Primer sangat diperlukan karena DNA polimerase hanya dapat menambahkan nukleotida pada gugus 3'OH (Karp, 2008). Ukuran yang optimal untuk primer biasanya berkisar antara 18-28 nukleotida. Ukuran primer yang lebih pendek biasanya kurang spesifik namun menghasilkan PCR yang lebih efisien, sebaliknya primer yang lebih panjang akan meningkatkan spesifitas dan menurunkan efisiensi PCR.

Spesifitas menunjukkan frekuensi terjadinya kesalahan primer, sedangkan efisiensi adalah jumlah produk PCR yang dapat dihasilkan dari sekian siklus PCR yang dilakukan. Satu pasang primer terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse*. Primer *forward* berfungsi sebagai penambah gugus 3'OH pada proses amplifikasi oleh DNA polimerase pada rantai antisense DNA, sedangkan primer reverse berfungsi pada pada rantai sense DNA

5. Kation divalen (biasanya  $Mg^{2+}$ ).

Konsentrasi dari magnesium berpengaruh pada keberhasilan PCR. Konsentrasi yang digunakan berkisar antara 0,5 – 5 mM. Konsentrasi magnesium yang berlebih akan mengakibatkan akumulasi dari hasil amplifikasi yang tidak spesifik yang akan terlihat pada agarose elektroforesis (pita), sebaliknya ketika terjadi kekurangan magnesium akan mengakibatkan menurunnya kualitas amplifikasi PCR.

## 6. Larutan dapar.

Dapar PCR 10×: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 25°C.

## 2.4 Bioinformatik

Diperlukan situs *online* ataupun perangkat lunak dalam hal mendesain primer, analisis hasil sekuens, dan konstruksi plasmid.

Untuk mendesain primer dapat digunakan situs *online* atau perangkat lunak sebagai berikut: [www.genome.jp](http://www.genome.jp), Bioedit, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), GENETYX VERSION7, dan [www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.htm](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.htm). *Alignment* dari 2 sekuens nukleotida dapat dilakukan menggunakan pilihan *align* pada web [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), sedangkan untuk *alignment* dari lebih dari 2 sekuens nukleotida dapat menggunakan pilihan CLUSTALW pada situs *online* [www.genome.jp](http://www.genome.jp) atau menggunakan Bioedit. Perangkat lunak GENETYX VERSION 7 digunakan untuk mengkomplemen nukleotida pada saat mendesain primer *reverse*. Situs *online* [www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.htm](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.htm) digunakan untuk menentukan *temperature melting* (T<sub>m</sub>) dari primer dan untuk mengetahui simbol-simbol nukleotida *degenerated* primer.

Analisis hasil sekuens dapat dilakukan dengan menggunakan situs *online* atau perangkat lunak sebagai berikut: CHROMAS, Bioedit, GENETYX VERSION 7, dan [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). CHROMAS atau Bioedit digunakan untuk membuka hasil sekuens dalam format kromatogram, dapat dilakukan pembetulan dari sekuens nukleotida *forward* dan *reverse* dilihat dari tingkat kebenaran kromatogramnya. GENETYX VERSION 7 dapat digunakan untuk menerjemahkan nukleotida yang telah dibetulkan menjadi urutan asam amino dan analisis enzim restriksi. Situs *online* [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) digunakan untuk BLAST dari nukleotida yang telah dibetulkan.

Untuk mengkonstruksi plasmid dapat digunakan perangkat lunak PLASDRAW, PDRAW32, GENETYX VERSION 7, dan situs *online* NEB cutter.

## 2.5 Elektroforesis

Elektroforesis adalah metode untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA, RNA, atau protein berdasarkan ukurannya. Teknik dari elektroforesis berdasarkan

sifat dari DNA yang bermuatan negatif pada pH netral karena kerangka fosfatnya. Oleh karena itu, ketika muatan listrik dialirkan pada DNA maka DNA akan berpindah dari muatan negatif ke muatan positif (Sambrook & Russell, 2001; Brown, 2006).

Dalam prakteknya, komposisi dari gel menentukan ukuran molekul DNA yang dapat dipisahkan. Irisan agar setebal 0,5 cm dari 0,5% agarose, yang memiliki pori-pori relatif tebal, dapat digunakan untuk molekul dengan rentang ukuran 4-30 kb sehingga molekul dengan ukuran 10 kb dan 12 kb dapat dibedakan dengan jelas (Brown, 2006).

Visualisasi molekul DNA dapat dilakukan dengan metode pewarnaan. Cara yang paling mudah untuk melihat hasil dari gel elektroforesis adalah mewarnai gel dengan komponen yang dapat membuat DNA terlihat. Etidium bromida (EtBr) dapat digunakan untuk mewarnai gel agarose. Pita dengan posisi yang berbeda berdasarkan ukuran fragmen DNA dapat dengan jelas terlihat dibawah radiasi sinar UV setelah pewarnaan dengan EtBr (Brown, 2006).

Faktor yang mempengaruhi elektroforesis:

1. Ukuran molekular dari DNA.  
Molekul yang lebih besar bermigrasi lebih lambat dari pada molekul yang lebih kecil. Hal tersebut dikarenakan molekul yang lebih kecil lebih mudah melewati pori-pori dari gel agarose.
2. Konsentrasi dari agarose.
3. Konformasi dari DNA.
4. Adanya Etidium Bromida (EtBr).
5. Voltase.
6. Tipe dari agarose.
7. Dapar elektroforesis (Sambrook & Russell, 2001).

## **2.6 Plasmid Sebagai Vektor Kloning**

Plasmid adalah molekul DNA sirkuler yang dapat bereplikasi secara autonom dalam sel bakteri hospes, dan tersebar secara luas pada sel prokariot. Ukuran dari plasmid beragam dari yang pendek hingga yang berukuran ratusan kb (1-250 kb). Plasmid hampir selalu membawa satu atau lebih gen yang bermanfaat

bagi hospesnya. Sebagai contoh, kemampuan bertahan dalam konsentrasi toksik antibiotik seperti kloramfenikol dan ampisilin dikarenakan keberadaan dari plasmid bakteri yang membawa gen resisten antibiotik. Kebanyakan plasmid memiliki sekuens DNA yang menjadi *origin of replication*, sehingga plasmid dapat memperbanyak diri dalam sel secara independen (Rapley & Walker, 1998; Brown, 2006).

Plasmid sebagai vektor kloning memiliki ukuran yang kurang dari 10 kb. Sebagai vektor kloning, plasmid harus memiliki daerah pengenalan bagi DNA sisipan, daerah ini disebut dengan sisi enzim restriksi yang biasanya membentuk *multiple cloning site*. Yang penting pula bagi plasmid sebagai vektor kloning adalah angka penggandaan / *copy number*. Angka penggandaan spesifik bagi tiap plasmid (Rapley & Walker, 1998; Brown, 2006).

Sifat Vektor pGEM T-Easy

pGEM®-T Easy

1. *T-overhang* untuk memudahkan kloning produk PCR (TA kloning vektor). pGEM-T Easy adalah vektor linier dengan tutup 3' timidin tunggal pada kedua ujungnya (dapat dilihat pada gambar 2.1). *T-overhang* pada bagian sisi penyisipan dapat meningkatkan efisiensi ligasi dari produk PCR dengan mencegah resirkularisasi dari vektor dan menyediakan *overhang* yang cocok untuk produk PCR.

2. Seleksi biru/putih dari rekombinan.

Vektor pGEM-T Easy adalah vektor dengan kemampuan menggandakan yang tinggi yang terdiri dari promotor T7 dan RNA polimerase SP6, mengapit beberapa daerah kloning di dalam daerah pengkode  $\alpha$ -peptida dari enzim  $\beta$ -galaktosidase. Dengan inaktivasi sisipan dari  $\beta$ -galaktosidase, dapat dilakukan identifikasi penapisan koloni putih biru pada plat.

3. Pilihan dari sisi restriksi untuk sisipan.

Beberapa daerah kloning dari vektor pGEM-T Easy diapit oleh sisi yang dikenal oleh enzim restriksi EcoR1, BstZI, dan NotI, menyediakan tiga enzim pencerna tunggal untuk memasukkan sisipan.



#### 4. Proses ligasi yang cepat.

Vektor pGEM-T Easy disertai dengan *2x rapid Ligation Buffer*. Reaksi ligasi dengan menggunakan dapar ini dapat diinkubasi selama 1 jam dalam temperatur ruang. Waktu inkubasi dapat ditambah untuk meningkatkan jumlah koloni setelah transformasi. Secara umum, inkubasi semalam dalam temperatur 4°C menghasilkan transforman dengan jumlah maksimum.

### 2.7 Ligasi

Ligasi adalah tahapan dari penggabungan molekul plasmid vektor dan DNA asing yang diinginkan sebagai sisipan. Enzim yang berperan mengkatalisis reaksi ini adalah DNA ligase.

Semua sel hidup menghasilkan DNA ligase, tetapi enzim yang dipakai dalam teknik genetika adalah yang telah dimurnikan dari *E. coli* yang telah terinfeksi dengan T4 faga. Dalam sel, enzim ini memiliki fungsi yang penting dari perbaikan diskontinuitas yang mungkin timbul pada salah satu untai dari molekul DNA untai ganda. Diskontinuitas adalah posisi dimana ikatan fosfodiester diantara molekul nukleotida yang berdekatan hilang. Mekanisme dari penggabungan antara vektor plasmid dan DNA sisipan serupa seperti proses perbaikan diskontinuitas tersebut (Brown, 2006).

Plasmid yang digunakan sebagai vektor kloning adalah pGEM-T Easy, pGEM-T Easy adalah TA vektor yang memiliki *T-overhang*, sehingga memerlukan *A-overhang* pada bagian DNA sisipan agar ligasi dapat berlangsung. *A-overhang* pada DNA sisipan didapatkan dengan cara *A-tailing* atau penambahan ujung adenin pada DNA sisipan. Karena baik vektor kloning maupun DNA sisipan memiliki *sticky-end*, metode ligasi dapat dilakukan dengan kloning langsung (Sambrook & Russell, 2001; Brown, 2006).

Literatur (Moelhard, 2007) menyebutkan proses ligasi berjalan pada temperatur 14°C - 16°C selama 1 jam atau lebih. Proses ligasi berjalan cepat ketika terdapat *overhang* pada vektor kloning dan DNA sisipan. Ligasi dari vektor kloning dan DNA sisipan yang tidak memiliki *overhang* (hanya *blunt-end*) akan lebih sulit dan reaksinya akan kurang efektif, pada temperatur yang sama dalam waktu 4-18 jam atau pada temperatur 4°C semalam.

## 2.8 Transformasi

Transformasi adalah memasukkan molekul DNA rekombinan ke dalam sel hidup, biasanya bakteri, yang kemudian akan tumbuh dan membelah untuk memproduksi atau memperbanyak klon. Secara umum, terdapat dua tujuan dari transformasi DNA rekombinan ke bakteri. Tujuan yang pertama adalah memproduksi DNA rekombinan dalam jumlah yang besar dari material awal yang sedikit. Hanya dari beberapa nanogram DNA rekombinan dapat menghasilkan beberapa mikrogram dalam tiap koloni bakteri dalam plat agar dan beberapa milligram dalam kultur cair bakteri, ribuan bahkan jutaan kali meningkat produksinya. Tujuan kedua dari transformasi adalah agar jumlah produksi DNA rekombinan memenuhi untuk tahap pemurnian. Penting sekali dilakukan pemurnian dari DNA rekombinan, karena dalam hasil ligasi selain terdapat vektor plasmid dan DNA sisipan yang telah terligasi terdapat pula: molekul vektor tidak terligasi, molekul DNA tidak terligasi, molekul vektor yang mengalami resirkularisasi tanpa DNA sisipan, dan DNA rekombinan yang membawa fragmen DNA yang salah (Brown, 2006).

Tidak semua bakteri dapat menjadi objek dari transformasi, hanya sel kompeten bakteri yang dapat digunakan. Sel kompeten adalah bakteri yang telah diberi perlakuan fisika atau kimia yang meningkatkan kemampuannya untuk menerima DNA rekombinan. Pembuatan kompeten sel dapat dilakukan dengan metode penambahan  $\text{CaCl}_2$  atau dengan penambahan DMSO/metode TSS. Sel kompeten harus di panen pada Log-fase dan disimpan pada temperatur dingin ( $-80^\circ\text{C}$ ), karena akan menurunkan kualitas kompeten sel jika dibiarkan dalam temperatur ruang (Carson & Robartson, 2006; Moelhardt, 2007).

Proses transformasi dapat dilakukan dengan metode *heat shock* dan elektroporasi. Metode *heat shock* dilakukan dengan inkubasi pada temperatur tinggi dan rendah. Metode elektroporasi dilakukan dengan mengalirkan aliran listrik (Moelhard, 2007).

## 2.9 Seleksi Hasil Transformasi Koloni Putih Biru dan Ampisilin

Seleksi plasmid yang diinginkan dari hasil transformasi dapat dilakukan dengan penambahan antibiotik ampisilin dan IPTG X-Gal pada media agar plat.

Penambahan ampisilin dan IPTG X-Gal adalah dalam rangka mendapatkan selektifitas dari koloni *E.coli* yang tumbuh pada media padat. Antibiotik ampisilin ditambahkan karena vektor pGEM-T Easy memiliki ORF penyandi ampisilin resisten. Diharapkan koloni yang tumbuh adalah koloni yang resisten ampisilin atau koloni *E.coli* yang benar terdapat vektor pGEM-T Easy. IPTG dan X-Gal digunakan untuk menyeleksi koloni *E.coli* yang benar terdapat hasil ligasi pGEM-T Easy dan sisipan asparaginase (produk PCR). Sisipan asparaginase bergabung dengan pGEM-T Easy pada ujung T dalam ORF LacZ yang menyandikan  $\beta$ -galaktosidase.  $\beta$ -galaktosidase dapat memotong X-Gal (IPTG sebagai penginduksi) sehingga menghasilkan senyawa galaktosa dan 5-bromo-4-kloro-3-hidroksiindole. Senyawa kedua akan dioksidasi menjadi senyawa 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo, senyawa berwarna biru yang tidak larut. Ketika benar sisipan asparaginase terligasi dengan pGEM-T Easy maka  $\beta$ -galaktosidase tidak dapat tersandikan dan tidak akan terbentuk senyawa biru tersebut.

## 2.10 Sekuensing

Sekuensing DNA pada dasarnya adalah versi modifikasi dari replikasi DNA yang didalam kontrol kondisi *In Vitro*. Sekuensing berbeda dengan replikasi DNA normal karena keberadaan dari dideoksinukleotida (ddNTPs) dalam reaksi. Dideoksinukleotida berbeda dengan deoksinukleotida normal karena ketiadaan dari grup 3'-OH yang penting bagi DNA polimerase untuk memperpanjang rantai. Ketika (ddNTP) diinkorporasikan pada DNA, sintesis akan terhenti (Metode Sanger Coulson) (Rapley & Walker, 1998; Karp, 2008), oleh karena itu dikenal juga dengan terminasi sekuensing.

Metode lain yang dapat digunakan adalah metode Maxam-Gilbert. Metode ini diawali dengan penambahan piperidin untuk memotong DNA. Kemudian ditambahkan dimetil sulfat, asam format, dan hidrazin. Dimetil sulfat akan bereaksi dengan basa guanin, asam format akan bereaksi dengan basa adenin dan guanin, dan hidrazin akan bereaksi dengan basa sitosin dan timin. Dalam prakteknya, metode Sanger Coulson yang lebih banyak digunakan dalam proses sekuensing.

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Bioindustri meliputi: laboratorium biologi molekular non virus, laboratorium fermentasi, dan laboratorium analisa, LABTIAP, PUSPIPTEK, BPPT selama bulan Januari 2011- Juni 2011.

### 3.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: *thermal cycler* [Eppendorf Master Cycler Personal, Jerman], elektroforesis [Mupid ex U Submarine Electrophoresis System], spektrofotometer UV-VIS [Hitachi U-2001, Jepang], sekuenser, *shaker* [Koehner Shaker, Heidolph Unimax 1010], sentrifuge [Sorval Fresco, Cool Sertrifuge Hitachi CR-21G, Jepang, Eppendorf Mini Spin, Jerman], milipore [Simpak 1], pH meter, autoklaf [Iwaki Autoclave ACV-2450], kamera digital [Kodak DC 290 200m Digital Camera], neraca analitik [RAD WAG WAS 220/C/2], *thermomixer* [Eppendorf Thermomixer Comfort, Jerman], vortex [Supermixer K], lemari es, pH meter, *Laminar Air Flow* [ESCO Class II BSC], konsentrator [Eppendorf Consentator 5301, Jerman], *microwave* [Sharp], oven, inkubator, *magnetic stirrer*, lemari asam, pipet berukuran ml dan  $\mu$ l, tube eppendorf, tips pipet, falkon, alat-alat gelas.

### 3.3 Bahan

#### 3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli* strain DH5- $\alpha$  yang digunakan sebagai hospes. Bakteri *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia cyripedii*, dan *Bacillus circulans* yang digunakan sebagai bakteri sumber. Bakteri *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia rhapontici*, dan *Erwinia cyripedii* diperoleh dari Institut Teknologi Bandung (ITB) sedangkan *Escherichia coli* stain DH5- $\alpha$  dan *Bacillus circulans* adalah bakteri koleksi laboratorium biologi molekular non virus LABTIAP, PUSPIPTEK, BPPT.

### 3.3.2 Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: *bactotryptone*, *yeast extract*, NaCl, KCl, agar, agarose, CaCl<sub>2</sub>, glukosa, EDTA, HCl, NaOH, SDS (sodium dodesil sulfat), lizozim, proteinase K, Na asetat, asam asetat glasial, isopropanol, etanol 70 %, 96 %, 100 %, tris HCl, dapar TAE, dapar TE (tris-EDTA), dapar transformasi (TB), EtBr (etidium bromida), dNTP [Fermentas, Kanada], primer asparaginase (telah didesain dan disintesis sebelumnya) [1<sup>st</sup> Base], KAPA taq polimerase [Biosystems], GeneAid PCR *purification kit* [Geneaid], GeneJet *plasmid purification kit* [Fermentas, Kanada] plasmid pGEM T-Easy [Promega, Amerika], *Buffer 2x Rapid Ligation* [Promega, Amerika], T4 DNA ligase [Promega, Amerika], ampicilin, IPTG (Isopropyl β-D-1-tiogalaktopiranosida) [Invitrogen], X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranosida) [Invitrogen], DMSO (dimetil sulfoksida) [Sigma-Aldrich, Jerman], *loading dye* [Fermentas, Kanada], DNA *marker* [Fermentas, Kanada], aquabidestilata steril, aquadest, bovin serum albumin (BSA), enzim restriksi EcoR1 [Biolabs, Amerika], dapar EcoR1 [Biolabs, Amerika], *buffer 5x ligase reaction* [Invitrogen], T4 DNA ligase [Invitrogen].

## 3.4 Medium Dan Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium cair luria bertani (LB), medium agar LB, medium agar LB ampicilin, dan medium *super optimal broth* (SOB).

### 3.4.1 Medium cair LB

Untuk membuat 500 ml medium cair luria bertani (LB) ditimbang *bactotryptone*, *yeast extract*, dan NaCl masing-masing sebesar 5 g; 2,5 g; dan 5 g. Semua bahan dimasukkan dalam botol scoot dan ditambahkan aquabidestilata steril dengan volume dicukupkan hingga 500 ml. Kemudian dilarutkan dengan cara diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah larut, larutan medium ini diatur pH-nya dengan menggunakan pH meter hingga pH 7±0,2 dengan menggunakan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N. Larutan medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15

menit. Medium cair LB yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C dan dapat digunakan sebagai stok LB cair.

#### 3.4.2 Medium agar LB

Untuk membuat 300 ml medium agar LB dengan konsentrasi agar 1,5 % w/v ditimbang *bactotryptone*, *yeast extract*, NaCl, dan agar masing-masing sebanyak 3 g; 1,5 g; 3 g; dan 4,5 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan aquabidestilata steril dengan volume dicukupkan hingga 300 ml. Kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan diatur pH-nya dengan menggunakan pH meter hingga pH  $7\pm 0,2$  dengan menggunakan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium dibiarkan sejenak hingga tidak terlalu panas setelah itu medium dituang pada cawan petri steril secara aseptis dan dibiarkan dingin dan mengeras. Medium yang sudah mengeras disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C.

#### 3.4.3 Medium agar LB ampisilin

Untuk membuat 200 ml medium agar LB ampisilin dengan konsentrasi ampisilin dalam medium agar 0,1 % v/v ditimbang *bactotryptone*, *yeast extract*, NaCl, dan agar masing-masing sebanyak 2 g; 1 g; 2 g; dan 3 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan aquabidestilata steril dengan volume dicukupkan hingga 200 ml. Kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan diatur pH-nya dengan menggunakan pH meter hingga pH  $7\pm 0,2$  dengan menggunakan larutan HCl 1 N atau NaOH 1 N. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium dibiarkan sejenak hingga tidak terlalu panas baru kemudian ditambahkan larutan ampisilin 100 mg/ml secara aseptis sebanyak 200 µl. Medium agar yang masih cair diaduk dengan menggoyangkan erlenmeyer kemudian dituang pada cawan petri steril secara aseptis dan dibiarkan dingin dan mengeras. Medium yang sudah mengeras disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C.

#### 3.4.4 Medium SOB

Untuk membuat 50 ml medium cair SOB ditimbang *bactotryptone*, *yeast extract*, NaCl, dan KCl masing-masing sebesar 1 g; 0,25 g; 0,0293 g; dan 0,0093 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan aquabidestilata steril dengan volume dicukupkan hingga 50 ml. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium dibiarkan sejenak hingga tidak terlalu panas kemudian ditambahkan larutan Mg steril sebanyak 0,5 ml secara aseptis. Medium dapat disimpan dalam lemari pendingin atau dapat langsung digunakan.

### 3.5 Cara kerja

3.5.1 Isolasi DNA *Erwinia cypripedii*, bakteri ditumbuhkan pada medium yang terdiri dari:

1% pepton, 0,5 % ekstrak yeast, 1% NaCl dan diinkubasi selama 18 jam dalam temperatur 30°C.

Metode isolasi DNA genom adalah sebagai berikut :

Sebanyak 8 ml kultur bakteri disentrifugasi pada kecepatan 4000 x g pada temperatur 4°C untuk mendapatkan pelet bakteri. Supernatan dibuang dan pelet bakteri diresuspensi dengan dapar TE sebanyak 225 µl dengan cara dipipet berulang-ulang. Suspensi bakteri dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan disimpan dalam temperatur -80°C selama 30 menit.

Untuk tahap pemecahan dinding sel ditambahkan larutan lizozim 10 mg/ml sebanyak 25 µl ke dalam suspensi bakteri yang sebelumnya dibekukan dilanjutkan dengan mencairkan suspensi bakteri beku tersebut pada temperatur ruang. Tabung eppendorf berisi suspensi bakteri yang telah mencair kemudian ditaruh di dalam es selama 45 menit. Untuk tahap pelisisan sel ditambahkan larutan STEP sebanyak 50 µl dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 1 jam dengan sesekali dilakukan pengocokan.

Tris-dapar fenol sebanyak 300 µl ditambahkan dan dicampurkan perlahan selama 5 menit tanpa menggunakan vortex. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 x g dalam temperatur 4°C selama 5 menit untuk memisahkan

lapisan DNA, lapisan DNA berada di lapisan bagian atas. Lapisan bagian atas dipindahkan ke dalam tabung eppendorf steril yang baru, pada tahap ini lapisan yang berada di bawah tidak boleh terambil. Selanjutnya dilakukan tahap presipitasi, ditambahkan larutan Na asetat 3 N sebanyak 0,1 dari volume lapisan atas yang dipisahkan dan dicampurkan perlahan tanpa menggunakan vortex. Ditambahkan etanol 100 % sebanyak dua kali dari volume terakhir dan diaduk dengan membolak-balik tabung. Untuk mengendapkan DNA dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10000 x g dalam temperatur 4°C selama 20 menit dan supernatan dibuang.

Pelet DNA dibersihkan dengan ditambahkan sebanyak 0,5 ml etanol 70 % ke dalam tabung eppendorf dan kocok perlahan baru kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 x g selama 3 menit. Pelet DNA dikeringkan pada temperatur 37°C selama 1 jam dan kemudian dilarutkan dalam dapar TE atau aquabidestila steril (ddH<sub>2</sub>O). DNA selanjutnya disimpan pada temperatur -20°C. (Sambrook & Russell, 2001).

### 3.5.2 Desain primer

Mendesain primer penyandi L-asparaginase dari beberapa strain *Erwinia sp.*

Tahap pengambilan sekuens genom *Erwinia sp* diunduh dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sekuens genom berasal dari *Erwinia sp* yang menghasilkan L-asparaginase. Primer *forward* didesain dari kurang lebih 20 nukleotida bagian depan dari sekuens *open reading frame* (ORF) penyandi L-asparaginase. Primer *reverse* didesain dari kurang lebih 20 nukleotida bagian depan dari sekuens ORF penyandi L-asparaginase yang telah dikomplemen terlebih dahulu dengan perangkat lunak GENETYX VERSION7.

Selanjutnya dilakukan *alignment* sekuens. Perangkat lunak yang digunakan adalah situs *online* <http://www.genome.jp/> pilihan CLUSTALW atau menggunakan Bioedit. Tahap selanjutnya adalah merancang *degenerated* primer. Sekuens genom berasal dari *Erwinia sp* yang menghasilkan L-asparaginase yang telah di-*alignment* masing-masing di *degenerated*. Simbol nukleotida *degenerated* dan *temperature melting* (TM) diperoleh dengan menggunakan situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>. Primer yang dirancang



adalah primer *degenerated* dan belum ditambahkan adaptor, enzim restriksi, atau histidin taq.

### 3.5.3 Persiapan PCR

Dicampurkan aquabidestilata steril, dapar dengan  $Mg^{2+}$ , genom DNA, dNTP 10 mM, 10  $\mu$ M primer *forward*, 10  $\mu$ M primer *reverse*, KAPA Taq (5 U/ $\mu$ l) masing-masing sebanyak 18,9  $\mu$ l; 2,5  $\mu$ l; 1  $\mu$ l; 0,5  $\mu$ l ; 1  $\mu$ l ; 1  $\mu$ l ; dan 0,1  $\mu$ l. Disentrifugasi selama beberapa detik dan segera dimasukkan ke dalam *thermal cycler* untuk proses amplifikasi PCR. Genom DNA digunakan genom DNA dari bakteri: *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia cypripedii*, *Erwinia raphontici*, dan *Bacillus circulans*. Untuk uji spesifitas digunakan salah satu primer dalam 1 komposisi bagi masing-masing genom DNA bakteri. Untuk uji adanya kontaminasi genom DNA diganti dengan aquabidestilata steril dalam komposisinya. Komposisi PCR dapat dilihat pada lampiran 2 (Sambrook & Russell, 2001).

### 3.5.4 Proses PCR

Kondisi PCR program *touch down* diatur sebagai berikut: untuk PCR *Erwinia sp.* pra-siklus 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 71°C (dengan penurunan temperatur sebesar -0,4°C setiap siklusnya) selama 35 detik, ekstensi 72°C selama 2 menit, sebanyak 30 siklus, dilanjutkan dengan denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 55°C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 2 menit, sebanyak 10 siklus, diakhiri dengan ekstensi akhir 72°C selama 10 menit dan kondisi akhir 4°C. Untuk PCR *Bacillus circulans* pra-siklus 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 68°C (dengan penurunan temperatur sebesar -0,4°C setiap siklusnya) selama 35 detik, ekstensi 72°C selama 2 menit, sebanyak 30 siklus, dilanjutkan dengan denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 53°C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 2 menit, sebanyak 10 siklus, diakhiri dengan ekstensi akhir 72°C selama 10 menit dan kondisi akhir 4°C (Kotzia & Labrou, 2005; Kotzia & Labrou, 2007).

### 3.5.5 Analisis amplikon dengan elektroforesis gel agarosa

Dibuat gel agarose dengan konsentrasi 1% w/v dengan komposisi:

0,25 g agarosa, 25 ml dapar TAE .

Tahapan elektroforesis adalah sebagai berikut:

Dicampurkan sampel sebanyak 3  $\mu$ l dan *loading dye* sebanyak 2  $\mu$ l dan dihomogenkan dengan cara pipeting. Setelah homogen, sampel dimasukkan dalam sumuran gel yang berbeda untuk masing-masing sampel. Dimasukkan *marker* DNA sebanyak 1  $\mu$ l pada sumur yang berbeda. Kemudian dielektroforesis selama 25 menit, setelah 25 menit agar diambil dan dibilas dengan aquades. Agar kemudian direndam dalam Etidium Bromida (EtBr) selama 15 menit, kemudian dibilas kembali dengan aquades. Agar kemudian difoto dengan kamera digital dalam kotak (Sambrook & Russell, 2001).

### 3.5.6 Purifikasi hasil PCR

(Protokol Geneaid)

Untuk tahap preparasi masing-masing sampel dalam tabung eppendorf ditambahkan dengan dapar *detergent free* (DF) sebanyak lima kali dari volume sampel. Kemudian untuk tahap pengikatan DNA, kolom DF (tabung dengan membran) diletakkan diatas tabung penampung. Kemudian sampel dimasukkan ke kolom DF dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 x g selama 30 detik (cairan dari kolom DF akan berpindah ke tabung mikro) dan cairan di tabung mikro dibuang ke buangan.

Selanjutnya untuk tahap pencucian sebanyak 600  $\mu$ l dapar cuci (yang telah ditambahkan etanol) ditambahkan pada kolom DF dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 x g selama 30 detik. Cairan di tabung mikro dibuang ke buangan dan disentrifugasi lagi selama 3 menit dengan kecepatan 13000 x g untuk mengeringkan membran pada kolom. Kolom DF kemudian dipindahkan ke tabung mikro (tidak tersedia dalam kit). Untuk tahap elusi DNA sebanyak 30  $\mu$ l dapar elusi atau aquabidestilata steril ditambahkan pada tengah membran dan dilakukan tanpa mengenai dinding. Ditunggu selama 2 menit sampai dapar elusi terserap kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13000 x g untuk elusi

DNA. Hasil purifikasi kemudian dielektroforesis untuk melakukan cek, dilihat hasil.

### 3.5.7 Ligasi sisipan (produk PCR yang telah dimurnikan) ke vektor pGEM-T Easy

Komposisi dengan total reaksi 10  $\mu$ l yang terdiri dari pGEM T-Easy, produk PCR, dapar ligasi, T4 DNA ligasi masing-masing sebanyak 1  $\mu$ l; 3  $\mu$ l; 5  $\mu$ l; 1  $\mu$ l dimasukkan dalam tabung eppendorf. Dihomogenkan perlahan dengan tangan dan dinkubasi semalam dalam temperatur 4°C (protokol promega).

### 3.5.8 Pembuatan kompeten sel (*E. coli* DH5- $\alpha$ )

Adapun metode pembuatan sel kompeten adalah sebagai berikut:

Sebanyak 1 koloni *E. coli* DH5- $\alpha$  diinokulasi ke dalam 50 ml media SOB, dikocok semalam pada temperatur 25-30°C dengan kecepatan 70-100 rpm. Setelah semalam kemudian diukur densitas optikal (OD) 0,4-0,8 dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya sampel diinkubasi sampai dingin dalam es. Sampel yang semula berada di dalam erlenmeyer (100 ml) kemudian dipindahkan ke dalam tabung falkon masing-masing sebanyak 50 ml. Disentrifugasi dengan kecepatan 1000 x g selama 15 menit pada temperatur 4°C, supernatan dibuang dengan cara aseptis (pada *Laminar Air Flow*), digunakan pipet jika masih terdapat sisa sampel. Pelet disuspensi menggunakan pipet dengan menambahkan dapar transformasi (TB) dingin sebanyak 16,75 ml dan diinkubasi di es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1000 x g selama 10 menit pada temperatur 4°C, supernatan dibuang dengan cara aseptis, digunakan pipet jika masih terdapat sisa sampel. Pelet kemudian disuspensi menggunakan pipet dengan menambahkan dapar transformasi (TB) dingin sebanyak 4 ml. DMSO sebanyak 0,3 ml kemudian ditambahkan dan dinkubasi di es selama 10 menit. Dipindahkan pada tabung eppendorf masing-masing sebanyak 200  $\mu$ l dan disimpan dalam nitrogen cair atau lemari pendingin khusus (-80°C) (Sambrook & Russell, 2001).

### 3.5.9 Transformasi hasil ligasi ke dalam kompeten sel dengan cara *heat shock*

Kompeten sel yang telah dibuat (beku), dicairkan dalam es. Hasil ligasi pGEM-T Easy Asparaginase sebanyak 10 µl dimasukkan dalam kompeten sel dan disuspensi dengan tangan hingga tercampur sempurna. Kemudian diinkubasi di dalam es selama 30 menit, dilanjutkan dengan diinkubasi pada temperatur 42°C selama 60 detik pada *thermomixer*, dan diinkubasi dalam es selama 2 menit. Sebanyak 800 µl medium SOB *with catabolite repression* (SOC) selanjutnya ditambahkan, dikocok selama 1 jam, dengan kecepatan 150 rpm, temperatur 37°C. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 x g selama 5 menit, kemudian dibuang sebanyak 800 µl, lalu sisanya diresuspensi. Di-*spread* semua (200 µl) ke medium LB agar ampisilin yang ditambahkan IPTG 30 µl dan X-Gal 30 µl dan diinkubasi dalam temperatur 37°C semalam (Sambrook & Russell, 2001).

### 3.5.10 Seleksi koloni putih (dari koloni putih biru yang terbentuk setelah inkubasi semalam)

Koloni putih diambil kemudian ditumbuhkan pada medium LB cair sebanyak 5 ml ditambah ampisilin sebanyak 5 µl dalam tabung reaksi (steril). Dikocok dalam temperatur 37°C dengan kecepatan 150 rpm semalam (Sambrook & Russell, 2001).

### 3.5.11 Isolasi DNA plasmid

Isolasi plasmid dengan metode *Alkaline mini preparation*

Sebanyak 3 ml hasil seleksi koloni putih yang telah ditumbuhkan dalam LB ampisilin cair dimasukkan ke dalam tabung eppendorf (dilakukan dalam 2 kali tahapan) dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 x g, supernatan dibuang menggunakan pipet. Selanjutnya ditambahkan 100 µl larutan I pada masing-masing tabung. Disuspensi dengan menggunakan vortex sampai seluruh pelet tercampur sempurna dengan larutan I dan dibiarkan dalam temperatur ruang selama 5 menit. Kemudian ditambahkan larutan II sebanyak 200 µl, dikocok ke atas ke bawah sebanyak 5 kali dan diinkubasi di dalam es selama 5 menit, suspensipun akan menjadi bening dan pada tutup tabung akan nampak benang-

benang lengket. Selanjutnya ditambahkan 150 µl larutan III dan dikocok segera dengan kuat sebanyak 5 kali, diinkubasi di es selama 5 menit. Lamanya inkubasi harus ditaati karena terlalu lama akan menyebabkan meningkatnya kontaminasi genom.

Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13000 x g selama 20 menit dalam temperatur 4°C dan diambil supernatan dan dipindah ke tabung baru. Ditambahkan sebanyak 300 µl isopropanol sambil membolak-balik tabung dan diamkan dalam temperatur ruang selama 30 menit. Disentrifugasi dengan kecepatan 10000 x g selama 30 menit dalam temperatur 4 °C kemudian supernatan dibuang. Dibilas dengan etanol 70 % sebanyak 0,5 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 x g selama 5 menit dan supernatan dibuang. Kemudian dikeringkan (dengan konsentrator) dan dilarutkan dalam 50 µl Tris-HCl 10 mM pH 8 + RNase 1 mg/ml (Sambrook & Russell, 2001).

Isolasi plasmid dengan kit GeneJET Fermentas

Untuk plasmid *High-copy* diperlukan 1-5 ml kultur cair, untuk plasmid *low-copy* diperlukan 10 ml kultur cair. Karena pGEM-T Easy adalah plasmid *high-copy* kultur cair yang digunakan 5 ml.

Metode isolasi plasmid dengan kit adalah sebagai berikut:

Kultur cair sebanyak 5 ml disentrifugasi dengan kecepatan 13000 x g pada temperatur ruang. Selanjutnya sel pelet diresuspensi dengan larutan resuspensi sebanyak 250 µl dan dipindahkan ke tabung baru. (Resuspensi dilakukan dengan vortex atau pipeting berulang). Ditambahkan larutan lisis sebanyak 250 µl, dicampurkan segera dengan membolak-balik tabung sebanyak 4-6 kali sampai larutan menjadi kental dan jernih (inkubasi tidak boleh dilakukan lebih dari 5 menit untuk mencegah denaturasi dan superkoil dari DNA plasmid). Kemudian ditambahkan larutan netralisasi sebanyak 350 µl, dicampurkan segera dengan membolak-balik tabung sebanyak 4-6 kali dan dilanjutkan dengan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 x g selama 5 menit.

Supernatan kemudian dipindahkan ke kolom GeneJET dengan didekantasi atau menggunakan pipet. Selanjutnya disentrifugasi selama 1 menit dan cairan yang ada di bagian bawah kolom dibuang kemudian kolom ditaruh kembali ke

tabung penampung yang sama. Ditambahkan larutan pencuci sebanyak 500 µl ke kolom GeneJET dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 x g selama 30-60 detik kemudian cairan yang terdapat di bawah kolom dibuang. Kolom ditaruh kembali ke tabung penampung yang sama. Diulang kembali prosedur sebelumnya menggunakan larutan pencuci sebanyak 500 µl. Cairan yang terdapat pada bagian bawah kolom dibuang dan disentrifugasi kembali selama 1 menit untuk menghilangkan sisa larutan pencuci. Kolom GeneJET dipindahkan ke tabung eppendorf steril ukuran 1,5 ml yang baru kemudian ditambahkan 50 µl dapar elusi atau aquabidestilata steril pada bagian tengah dari membran kolom spin GeneJET untuk melulusi DNA plasmid. Diinkubasi selama 2 menit dalam temperatur ruang kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 x g selama 2 menit. Plasmid kemudian disimpan dalam temperatur -20°C.

#### 3.5.12 Konfirmasi plasmid sebelum dilakukan sekuensing, dengan cara analisis dengan enzim restriksi EcoR1

Plasmid dipotong dengan enzim restriksi EcoR1

Komposisi dengan total reaksi 5 µl yang terdiri dari enzim restriksi EcoR1, dapar EcoR1, aquabidestilata steril, produk plasmid, bovin serum albumin (BSA) masing-masing sebanyak 0,3 µl; 0,5 µl; 1,7 µl; 2 µl; 0,05 µl dimasukkan dalam tabung eppendorf yang dalam hal ini enzim restriksi EcoR1 dimasukkan paling akhir. Diinkubasi pada temperatur 37°C selama 1 jam kemudian dielektroforesis untuk melihat hasil restriksi.

#### 3.5.13 Sekuensing plasmid (yang tidak dipotong enzim restriksi)

Sekuensing sampel dilakukan dengan melakukan order pada *First Base sequencing service* (Genetika Science) di Singapura.

#### 3.5.14 Analisis hasil sekuens

Hasil sekuens adalah data yang berupa kromatogram dan urutan nukleotida masing-masing untuk sekuens *forward* dan *reverse*.

Tahapan analisis adalah:

Data nukleotida dibuka dengan perangkat lunak GENETYX VERSION 7. Untuk sekuens *forward* dapat langsung disalin dalam format word sedangkan untuk sekuens *reverse* dikomplemen terlebih dahulu. Sekuens yang telah disalin dalam format word kemudian dicari nukleotida daerah primer *forward* dan *reverse* nya. Di-*alignment* sekuens *forward* dan *reverse* dengan aplikasi *align* pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Dilihat adanya kesalahan pada masing-masing sekuens. File yang berupa kromatogram dibuka dengan menggunakan perangkat lunak CHROMAS atau Bioedit. Dilakukan pembetulan pada puncak yang salah. Urutan nukleotida yang sudah dibetulkan kemudian di BLAST dengan menggunakan aplikasi *nucleotide* BLAST pada situs *online* [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Urutan asam amino dan situs enzim restriksi dapat diketahui dengan menggunakan perangkat lunak GENETYX VERSION 7. Konstruksi plasmid dibuat dengan perangkat lunak PLASDRAW, GENETYX VERSION 7, PDRAW32, dan situs *online* NEB *cutter*.

## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Desain primer

Tahap awal dari penelitian ini adalah mendesain primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen L-asparaginase. Primer yang didesain adalah primer yang *degenerated*. Primer yang didesain berasal dari sekuens penyandi L-asparaginase yang berasal dari bakteri yang bergenus sama dengan bakteri yang digunakan sebagai sumber L-asparaginase dalam penelitian ini.

##### 4.1.1 Primer untuk *open reading frame* (ORF) asparaginase *Erwinia sp.* desain 1

###### 4.1.1.1 Desain primer *forward*

Primer *forward* didesain dari nukleotida penyandi enzim asparaginase yang berasal dari tiga spesies bakteri yaitu: *Carotovorum wasabiae*, *Carotovorum carotovorum* (2 strain), dan *Pectobacterium atrosepticum* (Ansb2). Sekuens dari keempat bakteri tersebut kemudian di-*alignment* seperti pada tabel 4.1. Primer *forward* didesain dari 30 nukleotida bagian depan dari *alignment* lengkap tersebut.

Berikut ini adalah 30 nukleotida bagian depan dari masing-masing spesies :

<i>Carotovorum wasabiae</i>	ATGCAACTCTCATT(C/T)ATCGC(T/C)CGCACCATC
<i>Carotovorum carotovorum</i> 2	ATGCAACTCTCATT(C/T)ATCGC(T/C)CGCACCATC
<i>Carotovorum carotovorum</i>	ATGCAACTCTCATT(C/T)ATCGC(T/C)CGCACCATC
Ansb2	ATGCAACTCTCATT(C/T)ATCGC(T/C)CGCACCATC

Terlihat pada urutan nukleotida tersebut terdapat urutan yang berbeda dan ditandai dengan kotak berwarna merah yang dapat ditulis kembali menjadi urutan nukleotida sebagai berikut:

ATGCAACTCTCATT(C/T)ATCGC(T/C)CGCACCATC

Terdapat empat ( $2^2$ ) kemungkinan primer *forward* yang dapat didesain, tetapi primer yang dibuat hanya satu dengan susunan nukleotida:

5'- ATGCAACTCTCATTYATCGCYCGCACC-3'



Kemungkinan untuk nukleotida sitosin (C) atau timin (T) ditulis dengan simbol Y sesuai dengan keterangan simbol nukleotida dari situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>. Setelah didapatkan *degenerated* primer, sekuens primer tersebut dimasukkan dalam situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> untuk mendapatkan *temperature melting* (Tm) dari primer *forward*. Dari perangkat lunak tersebut didapatkan nilai Tm adalah 59,7 – 62,8 °C seperti yang tertera pada gambar 4.1. Sedangkan nilai Tm dari keterangan tabel informasi teknis (tabel 4.3) adalah 67,6 °C.

#### 4.1.1.2 Desain primer *reverse*

Primer *reverse* didesain dari nukleotida penyandi enzim asparaginase yang berasal dari tiga spesies bakteri yaitu: *Carotovorum wasabiae*, *Carotovorum carotovorum* (2 strain), dan *Pectobacterium atrosepticum* (Ansb2). Sekuens dari keempat bakteri tersebut kemudian di-*alignment* yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.1. Primer *reverse* didesain dari 31 nukleotida bagian belakang dari hasil *alignment* tersebut. Berbeda dengan tahapan mendesain primer *forward*, untuk mendesain primer *reverse* 31 nukleotida tersebut dikomplemen menggunakan perangkat lunak GENETYX VERSION7. Sebanyak 31 nukleotida yang telah dikomplemen adalah :

<i>Carotovorum wasabiae</i>	TTACTGCTCGAAATAGCTGCGGATT-TTCTCG
<i>Carotovorum carotovorum</i> 2	TTACTGCTCGAAATAGCTGCGGATT-TTCTCG
<i>Carotovorum carotovorum</i>	TTACTGCTCGAAATAGCTGCGGATT-TTCTCG
Ansb2	TTACTGCTCGAAATAGGTACGGATT-TTCTCG

Terlihat pada urutan nukleotida tersebut terdapat urutan yang berbeda dan ditandai dengan kotak berwarna merah yang dapat ditulis kembali menjadi urutan nukleotida sebagai berikut:

TTACTGCTCGAAATAG(G/C)T(G/A)CGGATT-TTCTCG

Terdapat empat (2<sup>2</sup>) kemungkinan primer *reverse* yang dapat didesain, tetapi primer yang dibuat hanya satu dengan susunan nukleotida :

5'-CTACTGCTCGAAATAGSTRCG -3'

Kemungkinan untuk nukleotida guanin (G) atau sitosin (C) ditulis dengan simbol (S); nukleotida guanin (G) atau adenin (A) ditulis dengan simbol (R) sesuai dengan keterangan simbol dari situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>. Setelah didapatkan *degenerated* primer, sekuens primer dimasukkan dalam situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> untuk mendapatkan *temperature melting* (Tm) dari primer *reverse*. Dari perangkat lunak tersebut didapatkan nilai Tm adalah 52,4 – 54,4 °C seperti yang tertera pada gambar 4.2. Sedangkan nilai Tm dari keterangan tabel informasi teknis (tabel 4.3) adalah 61,6 °C.

#### 4.1.2 Primer untuk *open reading frame* (ORF) Asparaginase *Erwinia sp.* desain 2.

##### 4.1.2.1 Desain primer *forward*

Primer *forward* didesain dari nukleotida penyandi enzim asparaginase yang berasal dari tiga spesies bakteri yaitu: *Erwinia amylovora* (2 strain), *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia tasmaniensis*, *Erwinia billingiae*. Sekuens dari keempat bakteri tersebut kemudian di-*alignment* seperti pada tabel 4.2. Primer *forward* didesain dari 30 nukleotida bagian depan dari *alignment* lengkap tersebut. Berikut ini adalah 30 nukleotida bagian depan dari masing-masing spesies :

Amylovora_ATCC_49946	ATGCAAAGAAATCCATTACGTGCCTAT
Amylovora_CFBP1430	ATGCAAAGAAATCCATTACGTGCCTAT
Pyrifoliae_Ep1/96	ATGCAAAGAAATCCATTACGTGCCTAT
Tasmaniensis_Et1/99	ATGCAAAGAAATCCATTACGTGCCTAC
Billingiae_Eb661	ATGCAAAGAAATCCATTACGTGCCTAT

Terlihat pada urutan nukleotida tersebut terdapat urutan yang berbeda dan ditandai dengan kotak berwarna merah yang dapat ditulis kembali menjadi urutan nukleotida sebagai berikut:

ATGCAAAGAAATC(T/C)ATTACGT(C/T)GCCTA(T/C)

Terdapat delapan ( $2^3$ ) kemungkinan primer *forward* yang dapat didesain, tetapi primer yang dibuat hanya satu dengan susunan nukleotida:

5'- ATGCAAAGAAATCYATTACGTYGC -3'

Kemungkinan nukleotida untuk timin (T) atau sitosin (C) ditulis dengan simbol (Y) sesuai dengan keterangan simbol dari situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> Setelah didapatkan *degenerated* primer, sekuens primer dimasukkan dalam situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> untuk mendapatkan *temperature melting* (Tm) dari primer *forward*. Dari perangkat lunak tersebut didapatkan nilai Tm adalah 51,7-54,8 °C seperti yang tertera pada gambar 4.3. Sedangkan nilai Tm dari keterangan tabel informasi teknis (tabel 4.3) adalah 59,9 °C.

#### 4.1.2.2 Desain primer *reverse*

Primer *reverse* didesain dari nukleotida penyandi enzim asparaginase yang berasal dari tiga spesies bakteri yaitu: *Erwinia amylovora* (2 strain), *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia tasmaniensis*. Sekuens dari keempat bakteri tersebut kemudian di-*alignment* yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.2. Primer *reverse* didesain dari 24 nukleotida bagian belakang dari hasil *alignment* tersebut. Berbeda dengan tahapan mendesain primer *forward*, untuk mendesain primer *reverse* 24 nukleotida tersebut dikomplemen menggunakan perangkat lunak GENETYX VERSION 7. Sebanyak 24 nukleotida yang telah dikomplemen adalah :

amylovora_ATCC_49946	TCAGTCCGGGGTCACTTCGCCGCG
amylovora_CFBP1430	TCAGTCCGGGGTCACTTCGCCGCG
pyrifoliae_Ep1/96	TCAATCCGGGGTCACTTCGCCACG
tasmaniensis_Et1/99	TCAGTCAGGGGTAACTCGCCGCG

Terlihat pada urutan nukleotida tersebut terdapat urutan yang berbeda dan ditandai dengan kotak berwarna merah yang dapat ditulis kembali menjadi urutan nukleotida sebagai berikut:

TCA(A/G)TC(C/A)GGGGT(C/T)A(A/G)(T/C)TCGCC(A/G)CG

Terdapat 64 kemungkinan ( $2^6$ ) primer *reverse* yang dapat didesain, tetapi primer yang dibuat hanya satu dengan susunan nukleotida:

5'- TCARTCMGGGGTYARYTCGCCRCG -3'

Kemungkinan untuk nukleotida guanin (G) atau adenin (A) ditulis dengan simbol (R); nukleotida sitosin (C) atau adenin (A) ditulis dengan simbol (M); nukleotida timin (T) atau sitosisin (C) ditulis dengan simbol (Y) sesuai dengan keterangan simbol dari situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>.

Setelah didapatkan *degenerated* primer, sekuens primer dimasukkan dalam situs *online* <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> untuk mendapatkan *temperature melting* (T<sub>m</sub>) dari primer *reverse*. Dari perangkat lunak tersebut didapatkan nilai T<sub>m</sub> adalah 57,4-67,6 °C seperti yang tertera pada gambar 4.4. Sedangkan nilai T<sub>m</sub> dari keterangan tabel informasi teknis (tabel 4.3) adalah 69,7 °C.

Primer untuk *Erwinia sp.* Adalah *degenerated* primer dan belum ditambahkan adaptor, enzim restriksi, ataupun histidin taq. Dalam desain primer, *temperature melting* (T<sub>m</sub>) diperlukan untuk penentuan temperatur dalam salah satu proses PCR yakni tahap penempelan.

#### 4.1.3 Primer Asparaginase *Bacillus sp.*

Primer telah didesain sebelumnya.

## 4.2 Isolasi Genom DNA

Tahap selanjutnya dalam penelitian ini adalah isolasi DNA genom. Isolasi genom DNA hanya dilakukan pada genom DNA dari bakteri *Erwinia cypripedii*, adapun DNA genom bakteri lainya telah diisolasi sebelumnya. DNA genom yang telah diisolasi kemudian dielektroforesis seperti yang ditunjukkan gambar 4.5.

## 4.3 Hasil PCR

### 4.3.1 Hasil PCR untuk *Erwinia sp.*

DNA genom yang digunakan untuk PCR adalah genom yang diisolasi dari bakteri *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia raphontici*, dan *Erwinia cypripedii*. Tahap pertama amplifikasi dilakukan dengan *degenerated* primer desain 1 (Tabel 4.3. no 1 dan 2) untuk ketiga bakteri. Amplifikasi menggunakan program *touch down* yang komposisinya dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis dan dilihat hasilnya setelah agar diwarnai terlebih

dahulu. Hasil amplifikasi adalah kosong atau tidak teramplifikasi karena tidak terlihat adanya pita pada agar. Hasil amplifikasi tersebut menunjukkan bahwa *degenerated* primer desain 1 tidak dapat mengamplifikasi DNA genom.

Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan *degenerated* primer desain 2 (Tabel 4.3. no 3 dan 4) untuk ketiga bakteri. Amplifikasi menggunakan program *touch down* yang komposisinya dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil amplifikasi adalah seperti yang terlihat pada gambar 4.6.

Pada sumur kelima yakni amplifikasi dengan DNA genom bakteri *Erwinia raphontici* muncul pita jelas dengan ukuran sekitar 1 kb. Berdasarkan penelitian terdahulu pada *Erwinia chrysanthemi*, *open reading frame* (ORF) penyandi asparaginase memiliki ukuran kurang lebih 1 kb (Kotzia & Labrou, 2007). Diduga pita yang tampak dengan ukuran 1 kb pada amplifikasi dengan genom *Erwinia raphontici* tersebut adalah ORF penyandi asparaginase.

Pada sumur keempat yakni amplifikasi dengan DNA genom bakteri *Erwinia cypripedii* tampak terdapat pita tetapi samar dan tidak sejelas pita pada sumur kelima. Pita samar ini dapat dikarenakan DNA genom yang tidak homogen di dalam tabung eppendorf sehingga ketika dipipet untuk digunakan sebagai *template* PCR, genom yang terambil hanya sedikit, sehingga hasil amplifikasi PCR sedikit dan pita yang tampak saat elektroforesis tipis.

Pada sumur kedua dimana DNA genom bakteri yang digunakan dalam PCR adalah genom *Erwinia nimipressuralis* tidak terdapat pita. Dalam hal ini PCR dengan bakteri tersebut kosong atau tidak teramplifikasi. Hasil amplifikasi tersebut menunjukkan bahwa *degenerated* primer desain 2 tidak dapat mengamplifikasi DNA genom *Erwinia nimipressuralis*.

Sumur pertama adalah kontrol negatif dimana *template* pada proses PCR adalah aquabidestilata steril. Kosongnya pita pada kontrol negatif menunjukkan tidak ada kontaminasi DNA genom pada primer baik *forward* maupun *reverse* ataupun pada aquabidestilata steril.

Tahap selanjutnya adalah melakukan amplifikasi pada DNA genom *Erwinia raphontici* sekaligus melihat spesifitas dari *degenerated* primer desain 2 untuk DNA genom *Erwinia raphontici*. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada gambar 4.7.

Pada sumur kedua tampak pita dengan ukuran sekitar 1 kb, oleh karena itu dapat dikatakan PCR dengan DNA genom bakteri *Erwinia raphontici* reproduibilitasnya baik. Pada sumur ketiga dimana hanya digunakan *degenerated* primer desain 2 *forward* saja tidak muncul pita. Sedangkan pada sumur keempat hasil PCR menggunakan *degenerated* primer desain 2 *reverse* saja terlihat adanya pita dengan ukuran diatas 250 bp dan dibawah 500 bp. Meskipun amplifikasi dengan primer *reverse* saja dapat dihasilkan ampikon, tetapi ampikon yang dihasilkan tidak berukuran seperti *band of interest* (1 kb) sehingga dapat dikatakan PCR dengan *degenerated* primer desain 2 untuk DNA genom bakteri *Erwinia raphontici* bersifat spesifik.

Tahap selanjutnya adalah melakukan amplifikasi pada DNA genom *Erwinia cypripedii* sekaligus melihat spesifitas dari *degenerated* primer desain 2 untuk DNA genom *Erwinia cypripedii*. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada gambar 4.8. Tampak pita dengan ukuran sekitar 1 kb pada sumur kedua dimana amplifikasi menggunakan DNA genom bakteri *Erwinia cypripedii*. Tidak seperti pita tipis yang tampak pada hasil PCR sebelumnya (gambar 4.6), pita pada sumur kedua ini terlihat jelas. Hal tersebut diduga genom bakteri dalam tabung yang digunakan pada amplifikasi kali ini homogen, sehingga PCR teramplifikasi dengan baik dan menghasilkan pita yang jelas.

Pada sumur ketiga dan keempat adalah elektroforesis hasil PCR yang menggunakan *degenerated* primer desain 2 *forward* saja atau primer *reverse* saja untuk masing-masing reaksi. Pada sumur ketiga dan keempat tidak muncul pita dengan ukuran yang sama dengan *band of interest* (1 kb), hal tersebut menandakan PCR dengan *degenerated* primer desain 2 untuk DNA genom bakteri *Erwinia cypripedii* bersifat spesifik.

#### 4.3.2 Hasil PCR untuk *Bacillus circulans*.

DNA genom yang digunakan untuk amplifikasi adalah yang diisolasi dari *Bacillus circulans*. dan primer yang digunakan adalah *degenerated* primer yang tercantum pada table 4.4. Amplifikasi menggunakan program *touch down* yang komposisinya dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil amplifikasi kemudian

dielektroforesis dan dilihat hasilnya setelah agar diwarnai terlebih dahulu. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada gambar 4.9.

Pada sumur ketiga dimana amplifikasi menggunakan DNA genom *Bacillus circulans* dan *degenerated* primer yang telah didesain sebelumnya nampak adanya pita dengan ukuran kurang lebih 1 kb. Dalam hal ini berarti DNA genom bakteri *Bacillus circulans* dapat teramplifikasi dengan primer yang telah didesain tersebut. Pada sumur pertama dan kedua dimana amplifikasi menggunakan DNA genom *Bacillus circulans* dan *degenerated* primer *forward* saja dan *reverse* saja untuk masing-masing sumur menunjukkan tidak terdapat adanya pita, berdasarkan hasil elektroforesis tersebut dapat dikatakan PCR DNA genom *Bacillus circulans* dengan primer yang telah dirancang bersifat spesifik.

Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan DNA genom *Bacillus circulans* beserta kontrol negatif untuk melihat kemungkinan terjadinya kontaminasi genom pada primer ataupun aquabidestilata steril. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada gambar 4.10. Kontrol negatif adalah amplifikasi dengan menggunakan aquabidestilata steril yang menggantikan DNA genom. Sumur pertama adalah elektroforesis hasil PCR dengan *template* genom bakteri *Bacillus circulans*, PCR dilakukan dengan total reaksi 50 µl. Dari hasil PCR yang dapat diulang tersebut, dapat dikatakan reproduisibilitas PCR DNA genom bakteri *Bacillus circulans* dengan primer yang telah didesain sebelumnya baik. Pada sumur ketiga yakni kontrol negatif aquabidestilata steril tidak nampak adanya pita yang menandakan tidak adanya amplifikasi yang berarti bahwa tidak ada kontaminasi pada primer baik *forward* dan *reverse* maupun air steril.

#### **4.4 Hasil Kloning Produk PCR ke Dalam pGEM-T Easy**

Telah didapatkan produk PCR yang berasal dari 3 DNA genom bakteri yang berbeda yakni produk PCR *Erwinia raphontici*, *Erwinia cypripedii*, dan *Bacillus circulans*. Produk PCR tersebut digunakan sebagai sisipan yang akan di kloning dengan plasmid vektor pGEM-T Easy. Produk PCR terlebih dahulu dimurnikan untuk membersihkan dapar dan garam-garam yang berasal dari reaksi PCR serta kemungkinan masih terdapat genom yang tersisa. Jika tidak dilakukan pemurnian dikhawatirkan akan mempengaruhi atau mengganggu proses

selanjutnya. pGEM-T Easy adalah TA (timin-adenin) kloning vektor, agar ligasi dapat optimal maka produk PCR yang telah dimurnikan perlu ditambahkan ujung adenin (A) dengan cara *A-tailing*. Enzim polimerase yang digunakan untuk amplifikasi pada penelitian ini adalah KAPA taq yang dapat menghasilkan produk PCR *sticky-end* atau penambahan adenine (A), sehingga dalam penelitian ini tidak dilakukan *A-tailing* pada produk PCR.

Masing-masing produk PCR kemudian diligasikan dengan pGEM-T Easy. Kondisi inkubasi untuk ligasi yang dipilih adalah semalam dengan suhu 4°C. Setelah inkubasi semalam hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E.coli* DH5α yang telah dibuat sebelumnya. Transformasi dilakukan dengan cara *heatshock*. Untuk melihat kualitas sel kompeten dalam menerima transformasi adalah dengan melakukan *heatshock* pada kontrol atau plasmid standar yang dalam hal ini adalah plasmid PUC.

Hasil transformasi kemudian di tumbuhkan pada media LB ampisilin agar yang ditambahkan antibiotik ampisilin sebanyak 10 µl dan IPTG sebanyak 30 µl X-Gal sebanyak 30 µl dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi semalam dan telah tumbuh koloni putih biru, diambil koloni putih dari koloni putih biru media LB ampisilin agar masing-masing 4 koloni putih untuk pGEM-Asp *Erwinia raphontici* dan pGEM-Asp *Erwinia cypripedii*. Koloni putih biru dapat dilihat pada gambar 4.11. Masing-masing koloni ditumbuhkan pada media LB cair 5 ml yang telah ditambahkan ampisilin. Setelah diinkubasi semalam kemudian dilakukan isolasi plasmid menggunakan metode *alkaline mini preparation*. Hasil isolasi kemudian di konfirmasi dengan cara dipotong dengan menggunakan enzim restriksi EcoR1, dan hasilnya dapat dilihat pada gambar 4.12.

Dengan bantuan konstruksi pGEM-T Easy dengan sisipan, ketika dipotong dengan enzim restriksi EcoR1, maka akan menghasilkan dua plasmid linier dengan ukuran sekitar 1 kb dan 3 kb. Pada sumur 3 dan 4 tampak pita dengan ukuran sekitar 1 kb, diduga benar pGEM-T Easy terligasi dengan insert *Erwinia raphontici*; pada sumur 8 dan 9 tampak pita dengan ukuran sekitar 1 kb, diduga benar pGEM-T Easy terligasi dengan insert *Erwinia cypripedii*. Pada sumur 3, 4, 8, dan 9 tampak beberapa pita di daerah berukuran lebih dari 3 kb yang



seharusnya hanya terdapat 1 pita dengan ukuran 3 kb, diduga hal tersebut dikarenakan perbedaan konformasi dari plasmid. Pada sumur 1, 2, 6, dan 7 tidak tampak adanya pita dengan ukuran sekitar 1 kb, kemungkinan pita tersebut hanya pGEM-T Easy saja yang belum terligasi dengan sisipan atau dapat pula dikarenakan proses pemotongan plasmid rekombinan oleh enzim restriksi EcoR1 yang belum sempurna.

Dapat diperoleh 2 plat koloni biru putih untuk kloning pGEM-Asp *Bacillus circulans* dan diambil 4 koloni putih dari masing-masing plat (gambar 4.11). Masing-masing koloni ditumbuhkan pada media LB cair 5 ml yang telah ditambahkan ampisilin. Setelah diinkubasi semalam kemudian dilakukan isolasi plasmid menggunakan metode *alkaline mini preparation*. Hasil isolasi kemudian di konfirmasi dengan cara dipotong dengan menggunakan enzim restriksi EcoR1, dan hasilnya dapat dilihat pada gambar 4.13.

Pada semua sumur yang mewakili masing-masing klon tampak terdapat pita dengan ukuran sekitar 1 kb dengan demikian diduga benar pGEM-T Easy terligasi dengan insert *Bacillus circulans*. Pada semua sumur terlihat beberapa pita pada daerah yang berukuran lebih dari 3 kb, hal tersebut diduga disebabkan oleh perbedaan dari konformasi plasmid.

Tahap selanjutnya adalah isolasi plasmid menggunakan kit yang akan digunakan untuk sekuensing. Isolasi plasmid dilakukan dengan menggunakan kit untuk plasmid klon 3 dan 4 pGEM-Asp *Erwinia raphontici*, klon 3 dan 4 pGEM-Asp *Erwinia cypripedii*, dan klon 1.1; 1.2; 2.1; 2.2 pGEM-Asp *Bacillus circulans*. Hasil isolasi plasmid kemudian dielektroforesis dan hasilnya dapat dilihat pada gambar 4.14. Pada sumur 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 tampak pita tebal pada daerah sekitar 4 kb dan tampak pula pita tipis pada daerah di atas 10 kb, hal tersebut diduga disebabkan oleh perbedaan dari konformasi plasmid. Pada sumur 5 dan 6 terlihat baik pita tebal dan tipis semuanya terletak pada daerah di atas 10 kb, hal tersebut diduga disebabkan pula oleh perbedaan dari konformasi plasmid.

Sebelum plasmid yang telah diisolasi dengan kit tersebut di sekuensing, perlu dilakukan konfirmasi ulang dengan memotongnya dengan enzim restriksi EcoR1 untuk memastikan plasmid hasil isolasi dengan kit adalah plasmid yang dimaksudkan sebelumnya. Hasil pemotongan dengan enzim restriksi EcoR1

kemudian dielektroforesis dan dapat dilihat pada gambar 4.15. Pada semua sumur yang mewakili masing-masing klon tampak terdapat pita dengan ukuran sekitar 1 kb dan 3 kb, dengan demikian diduga benar pGEM-T Easy terligasi dengan insert *Bacillus circulans*.

#### 4.5 Hasil Sekuensing

Plasmid yang disekuens adalah pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3, pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* klon 3, pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 1.1, dan pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2.

##### 4.5.1 Hasil sekuensing pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3

Nukleotida hasil sekuensing yang telah dikoreksi berdasarkan kromatogram *forward* dan *reverse* dan yang telah di *alignment* adalah sebagai berikut:

ATGCAAAAGAAATCTATTTACGTCGCCTATACGGGCGGTACGATCGGT  
 ATGCAGCGCTCTGAACACGGCTTTATTCCGGTCTCCGGCCATCTGCAA  
 CGTCAGCTGGCCAATATGCCGGAGTTTCACCGCCCGGAGATGCCTGAT  
 TTCACCATCCATGAATACCAGCCGCTGATTGACTCCTCGGATATGACTC  
 CGCAGGACTGGCAATCGATTGCGGATGACATTCGTCAGAATTATGACA  
 ATTACGATGGCTTTGTCATTTTGCACGGCACCGACACCATGGCCTTTAC  
 GGCCTCTGCGCTGTCGTTTCATGCTGGAAAACCTGGCCAAGCCGGTGAT  
 TGTGACAGGCTCACAGATCCCCTGGAGCAACTGCGCTCCGACGGCCA  
 GCAAATCTGCTGAACTCACTGTTTGTGCGCCGCAAATTATCCGATTAA  
 CGAAGTGACGTTATTCTTCAATAACACGCTTTATCGCGGTAACCGCAC  
 CACCAAAGCGCACGCTGACGGTTTCAATGCGTTTGATTGCCAAACCT  
 CGCCCCGCTGCTGGAAGCCGGTATCCATATTCGTCGTCTGAATACCCCT  
 GCCGCACCTGCAGGCCAGGGAGCGCTGATCGTGCATCCGATTACACCG  
 CAGCCGATTGGCGTGGTGACAATCTATCCGGGCATTTCTGCTGCCGTG  
 GTGCGTAACTTCCTGCAACAGCCGGTAAAAGCACTGATCCTGCGTTCT  
 TATGGCGTCGGGAATGCTCCGCAGAACAAAGAGTTCCTGCAGGAGCTG  
 AAAGAGGCTTCCGATCGCGGCATTGTGGTTCGTTAACCTCACGCAGTGC  
 ATGTCCGGTAAGGTCAATATGGGGGGTTACGCCACCGGAAACGCTCTG  
 GCCCTGGCTGGCGTGGTGAGTGGTGCCGACCTGACCGTTGAGGCTACA

CTGACCAA<sup>A</sup>ACTGCACTTCCTTCTGAGCCAGGACCTGACCAGCGACGAA  
 ATTCGTCAGCTGATGAAACAAAACCTGCGTGGCGAGTTAACCCCGGAT  
TGA

Huruf yang bergaris bawah pada bagian depan adalah urutan nukleotida primer *forward* dan urutannya sama dengan primer *forward* yang digunakan pada PCR. Huruf bergaris pada bagian belakang adalah urutan nukleotida primer *reverse* dan urutannya sama dengan primer *reverse* yang digunakan pada PCR. Tiga basa bagian depan yang di cetak tebal adalah kodon *start* (metionin) dan tiga basa bagian belakang yang di cetak tebal adalah kodon *stop*.

Hasil sekuensing kemudian di-BLAST untuk melihat dengan pendekatan kesamaan dengan sekuens nuklotida penyandi L-asparaginase yang berasal dari bakteri lain. Hasil *nucleotide* BLAST pada *genbank* dapat dilihat pada tabel 4.5. Berdasarkan BLAST dari NCBI, urutan nukleotida hasil sekuensing menunjukkan tingkat kesamaan tertinggi dengan nukleotida penyandi asparaginase yang berasal dari bakteri *Erwinia tasmaniensis* dengan tingkat kesamaan 82 %.

Nukleotida hasil sekuensing kemudian diterjemahkan menjadi asam amino dengan menggunakan perangkat lunak GNETYX VERSION 7 dan urutan asam amino yang disandikan oleh urutan nukleotida tersebut adalah:

M Q K K S I Y V A Y T G G T I G M Q R S E H G F I P V S G  
 H L Q R Q L A N M P E F H R P E M P D F T I H E Y Q P L I  
 D S S D M T P Q D W Q S I A D D I R Q N Y D N Y D G F V  
 I L H G T D T M A F T A S A L S F M L E N L A K P V I V T  
 G S Q I P L E Q L R S D G Q Q N L L N S L F V A A N Y P I  
 N E V T L F F N N T L Y R G N R T T K A H A D G F N A F  
 D S P N L A P L L E A G I H I R R L N T P A A P A G Q G A  
 L I V H P I T P Q P I G V V T I Y P G I S A A V V R N F L Q  
 Q P V K A L I L R S Y G V G N A P Q N K E F L Q E L K E A  
 S D R G I V V V N L T Q C M S G K V N M G G Y A T G N A  
 L A L A G V V S G A D L T V E A T L T K L H F L L S Q D  
 L T S D E I R Q L M K Q N L R G E L T P D \*

Tanda bintang adalah asam amino yang disandikan oleh kodon stop. Urutan asam amino tersebut tidak terdapat kodon stop di tengah urutan sehingga diduga dapat diekspresikan menjadi asam amino yang dalam hal ini adalah asparaginase.

pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3 kemudian di konstruksi plasmidnya dengan perangkat lunak PDRAW32, PLASDRAW, GENETYX VERSION7, dan situs *online* NEB *cutter*. Hasil konstruksi plasmid pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3 dapat dilihat pada gambar 4.16.

#### 4.5.2 Hasil sekuensing pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* klon 3

Urutan nukleotida hasil sekuensing tidak dapat ditemukan urutan nukleotida primer *reverse*. Kemudian dilakukan sekuense ulang untuk pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* klon 4 dan hasilnya tidak ditemukan urutan nukleotida primer *forward* dan *reverse*. Dengan demikian dapat dikatakan kloning pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* tidak berhasil. Kesalahan dapat terjadi pada saat proses PCR atau proses kloning.

#### 4.5.3 Hasil sekuensing pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 1.1

Nukleotida hasil sekuensing yang telah diperbaiki berdasarkan kromatogram *forward* dan *reverse* dan yang telah di *alignment* adalah sebagai berikut:

ATGAAAAATACTGCCGTTGACCACTGGGGGAACGATTGCTTCAGTTGA  
 AGGGGAAAATGGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTGATGAATTATTAA  
 GTTACGTATCAACACTTGATAACGATTACACAATGGAACTCAGTCGC  
 TTATGAATATAGACAGCACCAATATGCAGCCTGAATACTGGGTGGAAA  
 TAGCGGAAGCCGTTAAGGAAAATTATGATGCCTATGACGGGTTTGTTA  
 TTACTIONCACGGTACAGATAACAATGGCCTATAACATCTGCCGCACTATCGT  
 ATATGCTGCAGCATGCCAAAAGCCGATTGTCATCACCGGCTCGCAGA  
 TTCCGATCACGTTCCAAAGAACCGATGCCAAAAAAAATATTACAGATG  
 CCATTCGATTTGCCTGTGAAGGCGTGGGCGGCGTTTATGTTGTGTTTGA  
 CGGCAGAGTCATTCAGGGAACGCGTGCATCAAATTAAGAACGAAAA  
 GCTACGACGCATTTGAAAGCATCAATTACCCATATATCGCTTTTATCAA  
 TGAAGACGGGATCGAATACAACAACAAGTAACGGAACCTGAGAACG  
 ACACCTTCACAGTTGACACTTCACTATGTACAGATGTATGTCTGCTGAA

GCTGCATCCGGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGATGCCCTGAAAAGCAT  
 GTACAAAGGAATTGTCATTGAGAGTTATGGCAGCGGAGGGGTGCCGTT  
 TGAAGGCAGAGACATTTTGTCAAAAAGTGAATGAGCTGATCGAAAGCG  
 GCATTGTCGTGGTCATTACGACTCAATGTCTTGAAGAAGGCGAAGACA  
 TGAGCATTTACGAAGTTGGCCGCAGAGTCAACCAAGACTTAATTATCC  
 GATCAAGAAATATGAACACAGAAGCAATTGTGCCAAAATTGATGTGG  
 GCACTAGGTCAGTCTTCGGATCTTCTGTCTGTCGTCAGAGAATTATGGAA  
 ACGCCGATCGCTGATGTTGTCCTGTAG

Huruf yang bergaris bawah pada bagian depan adalah urutan nukleotida primer *forward* dan urutannya sama dengan primer *forward* yang digunakan pada PCR. Huruf bergaris pada bagian belakang adalah urutan nukleotida primer *reverse* dan urutannya sama dengan primer *reverse* yang digunakan pada PCR. Tiga basa bagian depan yang di cetak tebal adalah kodon *start* dan tiga basa bagian belakang yang di cetak tebal adalah kodon *stop*.

Hasil sekuensing kemudian di-BLAST untuk melihat dengan pendekatan kesamaan dengan sekuens nuklotida penyandi L-asparaginase yang berasal dari bakteri lain. Berdasarkan BLAST dari NCBI, urutan nukleotida hasil sekuensing menunjukkan tingkat kesamaan tertinggi dengan nukleotida penyandi asparaginase yang berasal dari bakteri *Bacillus subtilis*.

Nukleotida hasil sekuensing kemudian diterjemahkan menjadi asam amino dengan menggunakan perangkat lunak GNETYX VERSION7 dan urutan asam amino yang disandikan oleh urutan nukleotida tersebut adalah:

M K N T A V D H W G N D C F S \* R G K W A G S R S Q G \*  
 \* I I K L R I N T \* \* R L H N G N S V A Y E Y R Q H Q Y A  
 A \* I L G G N S G S R \* G K L \* C L \* R V C Y Y S R Y R Y  
 N G L Y I C R T I V Y A A A C Q K A D C H H R L A D S D  
 H V P K N R C Q K K Y Y R C H S I C L \* R R G R R L C C  
 V \* R Q S H S G N A C D Q I K N E K L R R I \* K H Q L P I  
 Y R F Y Q \* R R D R I Q Q T S N G T \* E R H L H S \* H F T  
 M Y R C M S A E A A S G L K A R N V \* C P E K H V Q R N  
 C H \* E L W Q R R G A V \* R Q R H F V K S E \* A D R K R  
 H C R G H Y D S M S \* R R R R H E H L R S W P Q S Q P R

L N Y P I K K Y E H R S N C A K I D V G T R S V F G S S C  
R Q E N Y G N A D R \* C C P V

Tanda bintang adalah asam amino yang disandikan oleh kodon *stop*. Pada urutan asam amino tersebut banyak terdapat kodon *stop* di tengah urutan sehingga diduga tidak dapat diekspresikan menjadi asam amino yang dalam hal ini adalah asparaginase. Dengan demikian dapat dikatakan kloning pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 1.1 tidak berhasil.

#### 4.5.4 Hasil sekuensing pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2

Nukleotida hasil sekuensing yang telah diperbaiki berdasarkan kromatogram *forward* dan *reverse* dan yang telah di *alignment* adalah sebagai berikut:

ATGAAAAAATTACTGATGTTGACAACCGGGGGAACGATTGCTTCAGTT  
GAAGGGGAAAATGGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTGATGAATTATT  
AAGTTACGTATCAACACTTGATAACGATTACACAATGGAAACTCAGTC  
GCTTATGAATATAGACAGCACCAATATGCAGCCTGAATACTGGGTGGA  
AATAGCGGAAGCCGTTAAGGAAAATTATGATGCCTATGACGGGTTTGT  
TATTACTCACGGTACAGATAACAATGGCCTATACATCTGCCGCACTATC  
GTATATGCTGCAGCATGCCAAAAAGCCGATTGTCATCACCGGCTCGCA  
GATTCCGATCACGTTCCAAAAAACCGATGCCAAAAAAAATATTACAGA  
TGCCATTCGATTTGCCTGTGAAGGCGTGGGCGGCCTTATGTTGTGTTT  
GACGGCAGAGTCATTCAGGGAACGCGTGCGATCAAATTAAGAACGAA  
AAGCTACGACGCATTTGAAAGCATCAATTACCCATATATCGCTTTTATC  
AATGAAGACGGGATCGAATAACAACAAGTAACGGAACCTGAGAA  
CGACACCTTCACAGTTGACACTTCACTATGTACAGATGTATGTCTGCTG  
AAGCTGCATCCAGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGATGCCCTGAAAAGC  
ATGTACAAAGGAATTGTCATTGAGAGTTATGGCAGCGGAGGGGTGCC  
GTTTGAAGGCAGAGACATTTTGTCAAAGTGAATGAGCTGATCGAAAG  
CGGCATTGTCGTGGTCATTACGACTCAATGTCTTGAAGAAGGCGAAGA  
CATGAGCATTTACGAAGTTGGCCGCAGAGTCAACCAAGACTTAATTAT  
CCGATCAAGAAATATGAACACAGAAGCAATTGTGCCAAAATTGATGT  
GGGCACTAGGTCAGTCTTCGGATCTTCCTGTCTGTCGTCAGAGAATTATGG  
AAACGCCGATCGCTGACGTTATCCTGTAG

Huruf yang bergaris bawah pada bagian depan adalah urutan nukleotida primer *forward* dan urutannya sama dengan primer *forward* yang digunakan pada PCR. Huruf bergaris pada bagian belakang adalah urutan nukleotida primer *reverse* dan urutannya sama dengan primer *reverse* yang digunakan pada PCR. Tiga basa bagian depan yang di cetak tebal adalah kodon *start* dan tiga basa bagian belakang yang di cetak tebal adalah kodon *stop*.

Hasil sekuensing kemudian di-BLAST untuk melihat dengan pendekatan kesamaan dengan sekuens nuklotida penyandi L-asparaginase yang berasal dari bakteri lain. Hasil *nucleotide* BLAST pada *genbank* dapat dilihat pada table 4.6. Berdasarkan *BLAST* dari NCBI, urutan nukleotida hasil sekuensing menunjukkan tingkat kesamaan tertinggi dengan nukleotida penyandi asparaginase yang berasal dari bakteri *Bacillus subtilis* dengan tingkat kesamaan 99 %.

Nukleotida hasil sekuensing kemudian diterjemahkan menjadi asam amino dengan menggunakan perangkat lunak GNETYX VERSION 7 dan urutan asam amino yang disandikan oleh urutan nukleotida tersebut adalah:

M K K L L M L T T G G T I A S V E G E N G L A P G V K A  
 D E L L S Y V S T L D N D Y T M E T Q S L M N I D S T N  
 M Q P E Y W V E I A E A V K E N Y D A Y D G F V I T H G  
 T D T M A Y T S A A L S Y M L Q H A K K P I V I T G S Q I  
 P I T F Q K T D A K K N I T D A I R F A C E G V G G V Y V  
 V F D G R V I Q G T R A I K L R T K S Y D A F E S I N Y P  
 Y I A F I N E D G I E Y N K Q V T E P E N D T F T V D T S  
 L C T D V C L L K L H P G L K P E M F D A L K S M Y K G I  
 V I E S Y G S G G V P F E G R D I L S K V N E L I E S G I V  
 V V I T T Q C L E E G E D M S I Y E V G R R V N Q D L I I  
 R S R N M N T E A I V P K L M W A L G Q S S D L P V V K  
 R I M E T P I A D V I L \*

Tanda bintang adalah asam amino yang disandikan oleh kodon *stop*. Urutan asam amino tersebut tidak terdapat kodon *stop* di tengah urutan sehingga diduga dapat diekspresikan menjadi asam amino yang dalam hal ini adalah asparaginase.

pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2 kemudian di konstruksi plasmidnya dengan perangkat lunak PDRAW32, PLASDRAW, GENETYX VERSION7, dan situs *online* NEB *cutter*. Hasil konstruksi plasmid pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2 dapat dilihat pada gambar 4.17.

Hasil sekuensing baik *Erwinia raphontici* maupun *Bacillus circulans* kemudian dianalisis pohon filogenetiknya dengan menggunakan situs *online* [www.genome.jp](http://www.genome.jp) dan hasilnya dapat dilihat pada gambar 4.18.





## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

1. Berhasil dilakukan PCR dengan primer asparaginase yang telah didesain dengan *template* DNA genom bakteri *Erwinia raphontici*, *Erwinia cypripedii*, dan *Bacillus circulans*.
2. Berhasil dilakukan kloning produk PCR *Erwinia raphontici*, *Erwinia cypripedii*, dan *Bacillus circulans* ke dalam plasmid vektor pGEM-T Easy.
3. Berhasil dilakukan sekuensing pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3 dan pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2 dan hasilnya adalah sebagai berikut:
  - a) Berhasil ditemukan urutan nukleotida primer *forward* dan primer *reverse*.
  - b) Hasil BLAST menunjukkan kesamaan dengan nukleotida pengkode asparaginase.
  - c) Tidak terdapat kodon stop di tengah urutan nukleotida ORF sehingga diprediksikan ORF tersebut menyandikan enzim asparaginase yang fungsional atau diprediksikan aktif.

#### 5.2 Saran

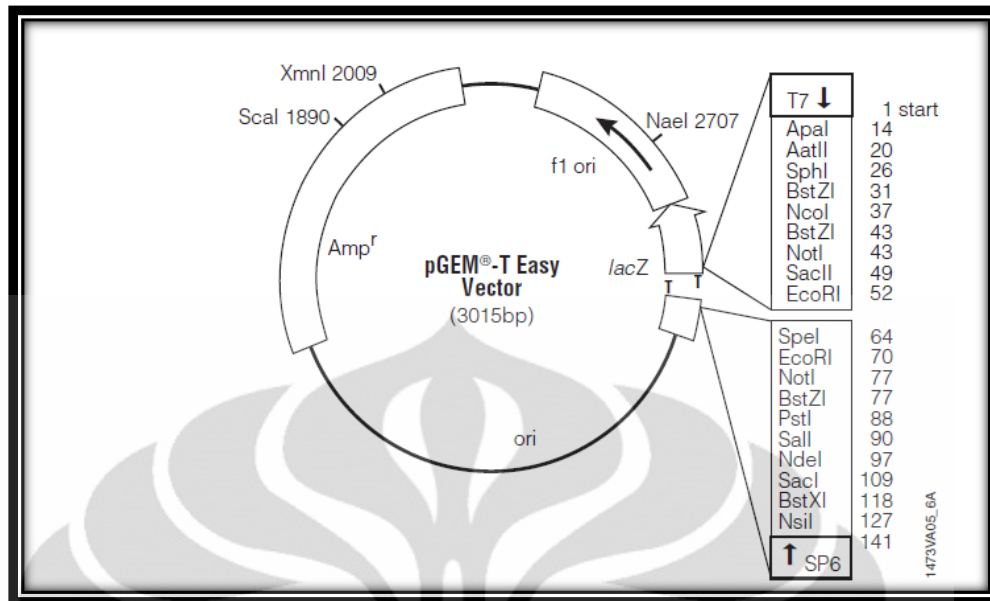
1. Sebaiknya dilakukan uji aktifitas dengan optimasi untuk mengetahui aktifitas asparaginase rekombinan pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3 dan pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2 .

## DAFTAR ACUAN

- Bilimoria, M. (1969). Conditions for the Production of L-Asparaginase 2 by Coliform Bacteria *Applied Microbiology*., Vol 18, 1025-1030.
- Brown, T. (2006). *Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction, 5<sup>th</sup> edition*. Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.
- Chen, B., Janes, H. (2002). *PCR Cloning Protocols, Second Edition*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Davidson, L., Brear, D., Wingard, P., Hawkins, J., Kitto, G. (1977). Purification and Properties of an L-Glutaminase-LAsparaginase from *Pseudomonas acidovorans*. *Journal of Bacteriology* ., Vol. 129, 1379-1386.
- Garrity. Zipcode Zoo. *Taxonomy Erwinia cypripedii*. November, 2006a. [http://zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter\\_cypripedii/](http://zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter_cypripedii/)
- Garrity. Zipcode Zoo. *Taxonomy Erwinia nimipressuralis*. November, 2006b. [http://zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter\\_nimipressuralis/](http://zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter_nimipressuralis/)
- Garrity. Zipcode Zoo. *Taxonomy Erwinia raphontici*. November, 2006c. [http://zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter\\_raphontici/](http://zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter_raphontici/)
- Gurol, Y., Kipritci, Z., Selcuk, N., Koc, Y., Kocagoz, S. (2008). *Bacillus circulans* Paracardiac Infection in Non-Hodgkin Lymphoma-A Case Report. *Prague Medical Report*. Vol.108, 19-22
- Hymavathi, M., Sathish, T., Rao, S., Prakasham, R. (2008). Enhancement of L-Asparaginase Production by Isolated (MTCC 8574) Using Response Surface Methodology. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Karp, G. (2008). *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiment*. New Jersey : John Wiley & Son, Inc.
- Kelaniyangoda, D., Ekanayake, H., Kekunadola, G., Weerasinghe, U., Subhashini, M. (2004). Development of a Quick detection Technique for Identification of *Erwinia carotovora carotovora* and *E. carotovora atroseptica* in Imported Seed Potato. *Annals of Sri Lanka Departement of Agriculture*., Vol. 6, 123-129.

- Khushoo, A., Pal, Y., Singh, B., Mukherjee, K. (2004). Extracellular Expression and Single Step Purification of Recombinant *Eschericia coli* L-Asparaginase. *Elsevier Protein Expression and Purification.*, Vol. 38, 29-36.
- Kotzia, G., Labrou, E. (2005). Cloning, Expression, and Characterization of *Erwinia carotovora* L-Asparaginase. *Elsevier Journal of Biotechnology.*, Vol.119, 309-323.
- Kotzia, G., Labrou, E. (2007). L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning Expression and Characterization. *Elsevier Journal of Biotechnology.*, Vol. 127, 657-669.
- Manikandan, R., Pratheeba, C., Sah, P., Sah, S. (2010). Optimization of Asparaginase Production by *Pseudomonas aeruginosa* Using Experimental Methods. *Nature and Science.*, Vol. 8.
- McGranth, B., Walsh, G. (2006). *Directory of Therapeutic Enzymes*. London: Taylor & Francis.
- Mesas, J., Gil, J., Mart, J. (1990) .Characterization and partial purification of L-asparaginase from *Corynebaeterium glutamicum*. *Journal of General Microbiology.*, Vol. 136, 515-519.
- Moelhard, C. (2007). *Molecular Biology and Genomics, The Experimenter Series*. California: Elsevier Academic Press.
- Moola, Z., Scawen, M., Atkinson, T., Nicolls, D. (1994). *Erwinia Chrysanthemi* L-Asparaginase: Epitope Mapping and Production of Antigenically Modified Enzymes. *Biochem. J.*, Vol. 302, 921-927.
- Pieters, R., Carroll, W. (2008). Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Elsevier Saunders Pediatr Clin N Am.*, Vol. 55, 1-20.
- Prakasham, R., Hymavathi, M., Rao, C., Arepalli, S., Rao, J., Kennady, P., Nasaruddin, K., Vijayakumar, J., Sarma, J. (2010). Evaluation of Antineoplastic Activity of Extracellular Asparaginase Produced by Isolated *Bacillus circulans*. *Appl Biochem Biotechnol.*, Vol. 160, 72–80.
- Rapley, R., Walker, J. (1998). *Molecular Biomehtod Handbook*. New Jersey: Humana Press Inc.

- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sarquis, M., Oliveira, E., Santos, A., Costa, G. (2004). Production of L-Asparaginase by Filamentous Fungi. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro., Vol. 99, 489-492.
- Schwartz, J., Reevesi, J., Broome, J. (1966). Two L-Asparaginase From *E.coli* and Their Action Against Tumors. *Biochemistry.*, Vol. 66, 1516-1519.
- Sieciechowicz, K., Ireland, R., Joy, K. (1985). Diurnal Variation of Asparaginase in Developing Pea Leaves. *Plant Physiol.*, Vol.77, 506-508.
- Shifrin, S., Solis, B., Chaiken, I. L-Asparaginase from *Erwinia carotovora*. *The Journal of Biological Chemistry.*, Vol. 248, 3463-3469.
- Streeter, J. (1977). Asparaginase and Asparagine Transaminase in Soybean Leaves and Root Nodules. *Plant Physiol.*, Vol. 60, 235-239.
- Supriadi., Ibrahim, N., Taryono. (2002). Karakterisasi *Erwinia chrysanthemi* Penyebab Penyakit Busuk Bakteri Pada Daun Lidah Buaya (*Aloe vera*). *Jurnal LITTRI.*, Vol.8, 45-48.
- Sun, D., Setlow, P. (1991). Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the *Bacillus subtilis* ans Operon, Which Codes for L-Asparaginase and L-Aspartase. *Journal of Bacteriology.*, Vol. 173, 3831-3845.
- Sunitha, M., Ellaiah, P., Devi, B. (2010). Screening and Optimization of Nutrients for L-Asparaginase Production by *Bacillus cereus* MNTG-7 in SmF by Plackett-Burmann Design. *African Journal of Microbiology Research.*, Vol. 4 , 297-303.
- Theantana, T., Hyde, K., Lumyong, S. (2007). Asparaginase Production by Endophytic Fungi Isolated from some Thai medicinal Plant. *KMITL Sci. Tech. J.*, Vol. 7.
- Uniprot.(n.d.).*Taxonomy Bacillus circulans*.<http://www.uniprot.org/taxonomy/1397>
- Youssef, M., Al-Omair, M. (2008). Cloning, Purification, Characterization and Immobilization of L-Asparaginase II from *E.coli* W3110. *Asian Journal of Biochemistry.*, Vol. 3, 337-350.



[Sumber: Protokol pGEM-T Easy]

Gambar 2.1 Vektor plasmid pGEM-T Easy

Enter Oligonucleotide Sequence Below  
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

ATG CAA CTC TCA TTY ATC GCY CGC ACC

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

GGT GCG RGC GAT RAA TGA GAG TTG CAT

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule  
50 nM Primer 1 Measured Absorbance at 260 nanometers  
50 mM Salt (Na<sup>+</sup>)

Calculate Swap Strands BLAST mfold

**Physical Constants** **Melting Temperature (T<sub>M</sub>) Calculations**

Length: 27 Molecular Weight: 8100.3 to 8130<sup>4</sup> GC content: 48 to 56 % **1** 59.7 to 62.8 °C (Basic)  
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm **2** 68.2 to 71.5 °C (Salt Adjusted)  
is 3.775 to 3.81 microMolar<sup>5</sup> and contains 30.6 to 31 micrograms. **3** 59.93 to 62.53 °C (Nearest Neighbor)

**Thermodynamic Constants**  
Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK 33.404 cal/(°K\*<sup>4</sup>mol) deltaH 196.6 to 204.8 Kcal/mol  
deltaG 32.9 to 35.2 Kcal/mol deltaS 511.7 to 530.7 cal/(°K\*<sup>4</sup>mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

Keterangan: angka yang dilingkari dengan lingkaran merah menunjukkan *temperature melting primer forward Erwinia sp* desain 1.

[Sumber: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>]

Gambar 4.1. *Temperature melting* untuk primer *forward Erwinia sp.* desain1.

Enter Oligonucleotide Sequence Below  
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

CTA CTG CTC GAA ATA GST RCG

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

CGY ASC TAT TTC GAG CAG TAG

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule  
ssDNA

50 nM Primer  
50 mM Salt (Na<sup>+</sup>) 1 Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate Swap Strands BLAST mfold

Physical Constants		Melting Temperature (T <sub>M</sub> ) Calculations	
Length: 21	Molecular Weight: 6390.2 to 6446.4	GC content: 48 to 52 %	1 52.4 to 54.4 °C (Basic)
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm			2 59.5 to 61.2 °C (Salt Adjusted)
is 4.376 to 4.53 microMolar and contains 28 to 29.3 micrograms.			3 53.04 to 54.46 °C (Nearest Neighbor)
Thermodynamic Constants			
Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.			
RlnK	33.404 cal/(°K*mol)	deltaH	154.2 to 167.9 Kcal/mol
deltaG	24.7 to 27.2 Kcal/mol	deltaS	400.5 to 438 cal/(°K*mol)
Deprecated Hairpin/self dimerization calculations			

Keterangan: angka yang dilingkari dengan lingkaran merah menunjukkan *temperature melting primer reverse Erwinia sp* desain 1.

[Sumber: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>]

Gambar 4.2 *Temperature melting* untuk primer reverse *Erwinia sp.* desain 1.

Enter Oligonucleotide Sequence Below  
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

ATG CAA AAG AAA TCY ATT TAC GTY GC

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

GCR ACG TAA ATR GAT TTC TTT TGC AT

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule  
  ssDNA

50 nM Primer 1 Measured Absorbance at 260 nanometers  
 50 mM Salt (Na<sup>+</sup>)

Calculate Swap Strands BLAST mfold

Physical Constants		Melting Temperature (T <sub>M</sub> ) Calculations	
Length: 26	Molecular Weight: 7947.3 to 7977.4	GC content: 31 to 38 %	1 51.7 to 54.8 °C (Basic)
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm	is 3.385 to 3.41 microMolar	and contains 26.9 to 27.3 micrograms.	2 60.1 to 62.9 °C (Salt Adjusted)
			3 54.73 to 55.06 °C (Nearest Neighbor)
Thermodynamic Constants			
Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.			
RlnK	33.404 cal/(°K*mol)	deltaH	191.6 to 196.6 Kcal/mol
deltaG	29.8 to 30.5 Kcal/mol	deltaS	505.5 to 519.3 cal/(°K*mol)
Deprecated Hairpin/self dimerization calculations			

Keterangan: angka yang dilingkari dengan lingkaran merah menunjukkan *temperature melting primer forward Erwinia sp* desain 2.

[Sumber: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>]

Gambar 4.3 *Temperature melting* untuk primer *forward Erwinia sp*. desain 2.



Enter Oligonucleotide Sequence Below  
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

TCA RTC MGG GGT YAR YTC GCC RCC

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

CGY GGC GAR YTR ACC CCK GAY TGA

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule  
ssDNA

50 nM Primer  
50 mM Salt (Na<sup>+</sup>) 1 Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate Swap Strands BLAST mfold

Physical Constants		Melting Temperature (T <sub>m</sub> ) Calculations	
Length: 24	Molecular Weight: 7298.8 to 7400.4	GC content: 50 to 75 %	1 57.4 to 67.6 °C (Basic)
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm			2 65.2 to 75.5 °C (Salt Adjusted)
is 3.907 to 4.24 microMolar 5 and contains 28.5 to 31.4 micrograms.			3 55.56 to 65.53 °C (Nearest Neighbor)
Thermodynamic Constants			
Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.			
RlnK	33.404 cal/(°K*mol)	deltaH	172.9 to 214.7 Kcal/mol
deltaG	28.1 to 38 Kcal/mol	deltaS	450.8 to 553.5 cal/(°K*mol)
Deprecated Hairpin/self dimerization calculations			

Keterangan: angka yang dilingkari dengan lingkaran merah menunjukkan *temperature melting primer reverse Erwinia sp* desain 2.

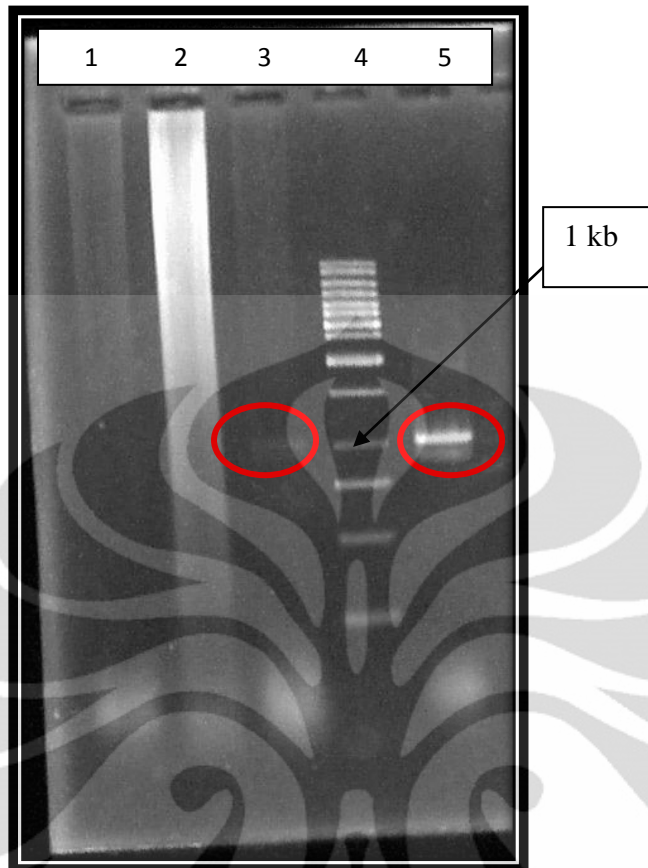
[Sumber: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>]

Gambar 4.4 *Temperature melting* untuk primer reverse *Erwinia sp.* desain 2.



Keterangan: gambar di dalam lingkaran merah adalah genom *Erwinia cypripedii*  
1,2,4 Genom DNA *Erwinia cypripedii*, 3) DNA Marker

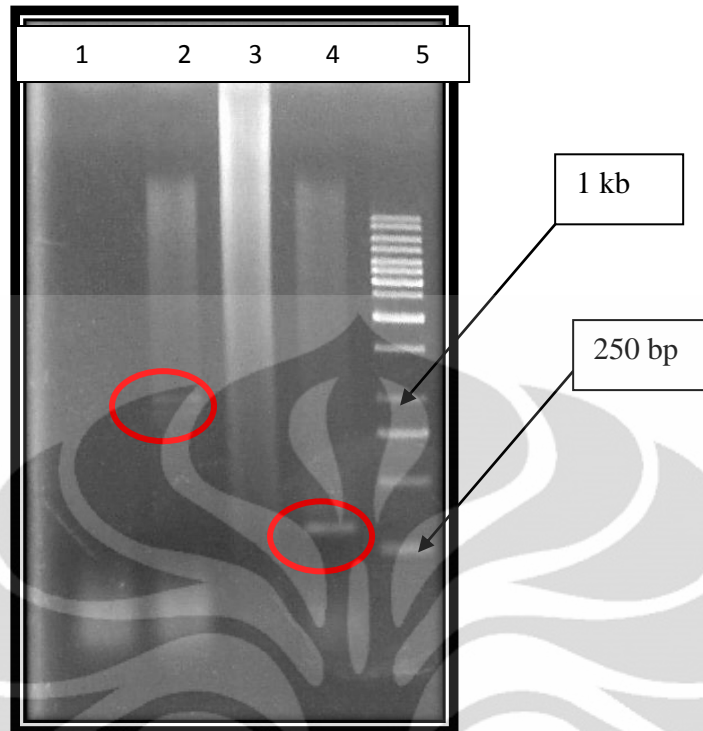
Gambar 4.5 Elektroforesis hasil isolasi genom DNA *Erwinia cypripedii*.



Keterangan :

- 1) Hasil PCR dengan control negatif aquabidestilata steril
- 2) Hasil PCR dengan genom DNA *Erwinia nimipressuralis*
- 3) Hasil PCR dengan genom DNA *Erwinia cyripedii*
- 4) DNA marker
- 5) Hasil PCR dengan genom DNA *Erwinia raphontici*

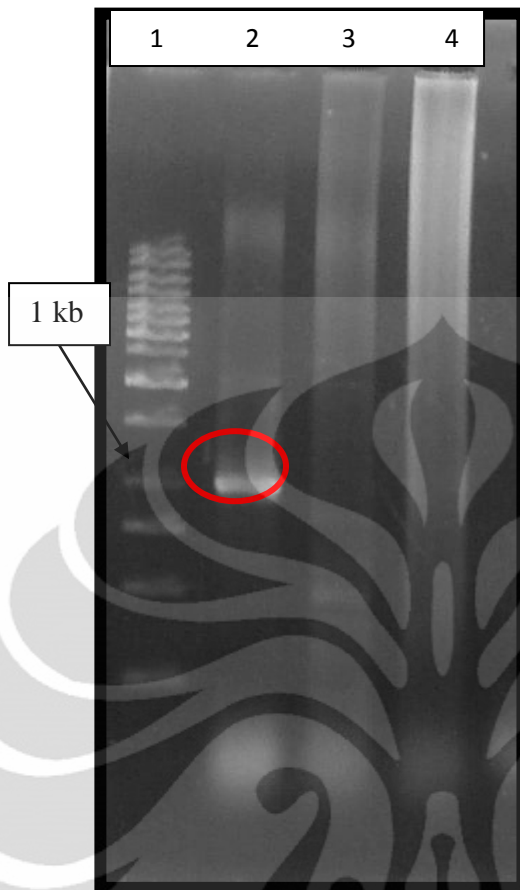
Gambar 4.6 Elektroforesis hasil PCR menggunakan primer desain 2 dengan DNA enom *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia cyropedii*, dan *Erwinia raphontici*.



Keterangan :

- 1) Hasil PCR dengan control negatif aquabidestilata steril
- 2) Hasil PCR dengan genom DNA *Erwinia raphontici*
- 3) Hasil PCR dengan genom DNA *Erwinia raphontici* primer *forward* saja
- 4) Hasil PCR dengan genom DNA *Erwinia raphontici* primer *reverse* saja
- 5) DNA *marker*

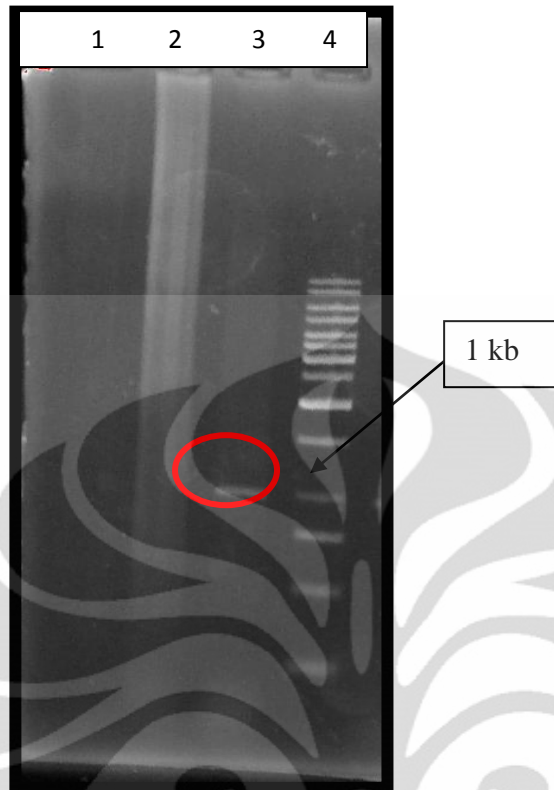
Gambar 4.7 Elektroforesis hasil PCR untuk melihat spesifitas dan kemungkinan kontaminasi primer *Erwinia sp* dengan menggunakan genom DNA *Erwinia raphontici*.



Keterangan:

- 1) DNA marker
- 2) Hasil PCR dengan genom *Erwinia cypripedii*
- 3) Hasil PCR dengan genom *Erwinia cypripedii* primer forward saja
- 4) Hasil PCR dengan genom *Erwinia cypripedii* primer reverse saja

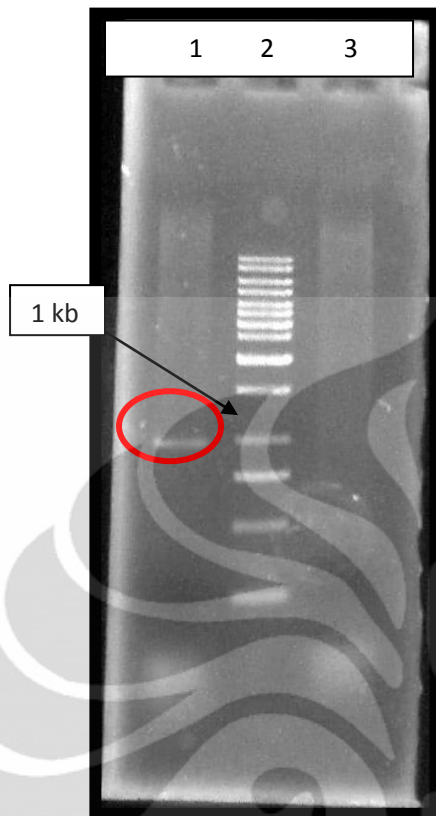
Gambar 4.8 Elektroforesis hasil PCR untuk melihat spesifitas primer *Erwinia sp* dengan menggunakan genom DNA *Erwinia cypripedii*.



Keterangan :

- 1) Hasil PCR dengan genom DNA *Bacillus circulans* primer *forward* saja
- 2) Hasil PCR dengan genom DNA *Bacillus circulans* primer *reverse* saja
- 3) Hasil PCR dengan genom DNA *Bacillus circulans*
- 4) DNA *marker*

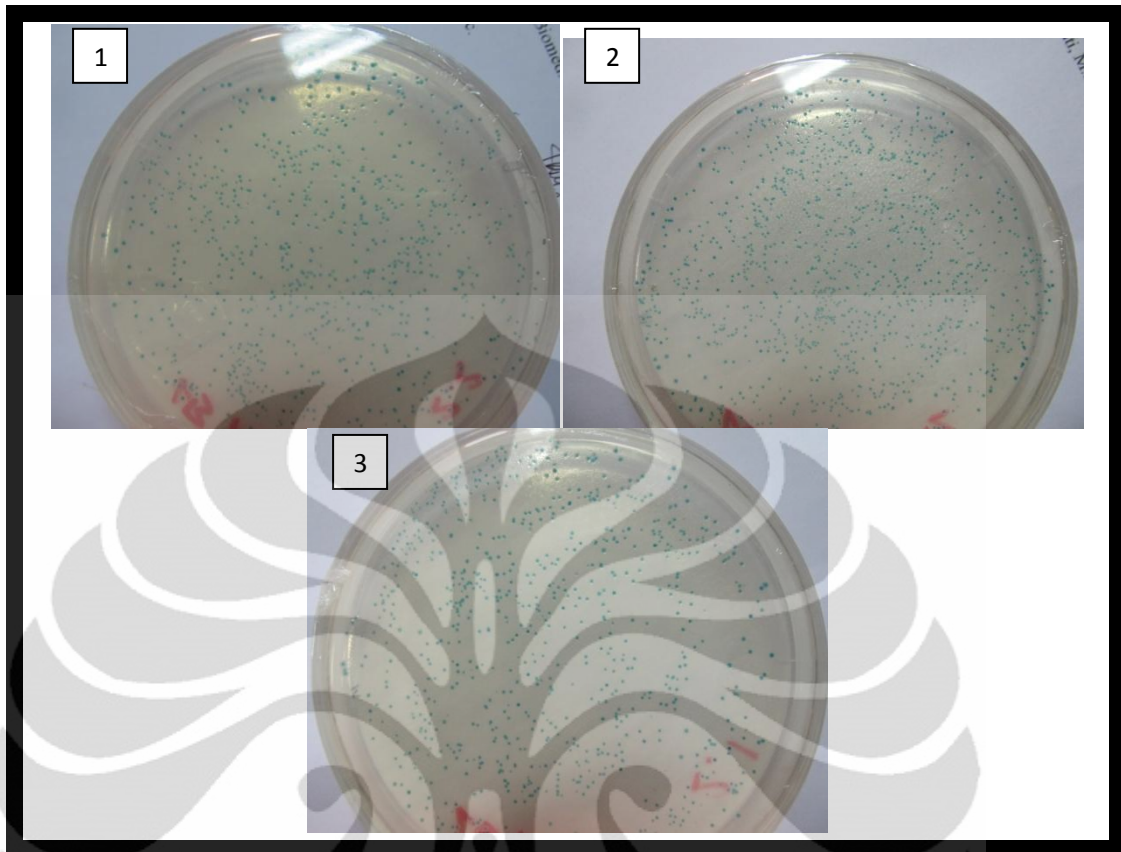
Gambar 4.9 Elektroforesis hasil PCR dan untuk melihat spesifitas primer *Bacillus sp.* dengan menggunakan genom DNA *Bacillus circulans*.



Keterangan :

- 1) Hasil PCR dengan genom DNA *Bacillus circulans*
- 2) DNA *marker*
- 3) Hasil PCR dengan blanko air

Gambar 4.10 Elektroforesis hasil PCR dan untuk melihat kemungkinan kontaminasi primer *Bacillus sp.* dengan menggunakan genom DNA *Bacillus circulans*.

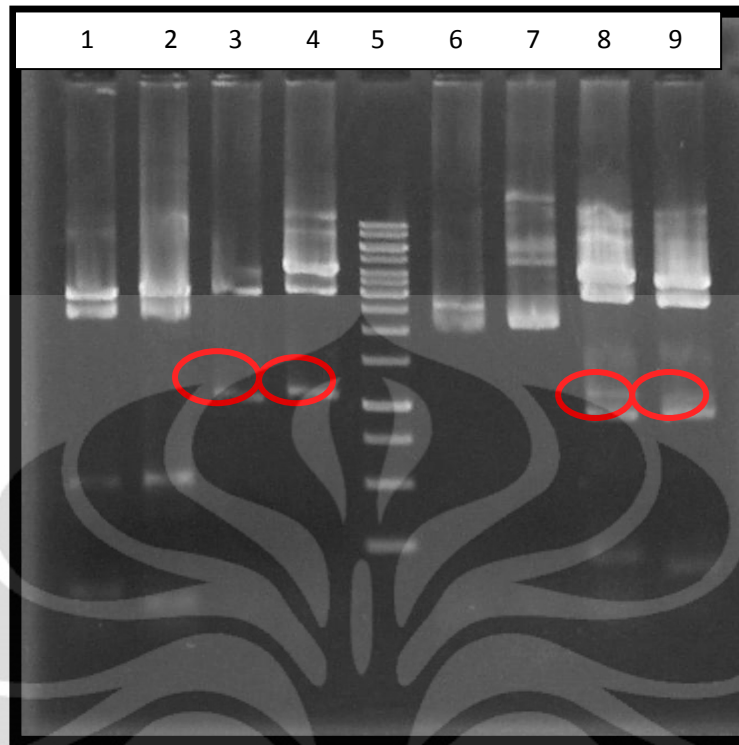


Keterangan :

- 1 : koloni putih biru pGEM-Asp *Erwinia raphontici* yang telah diambil koloni putihnya
- 2 : koloni putih biru pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* yang telah diambil koloni putihnya
- 3 : koloni putih biru pGEM-Asp *Bacillus circulans* yang telah diambil koloni putihnya

Gambar 4.11 LB agar ampicilin yang ditumbuhi koloni putih biru hasil transformasi.





Keterangan:

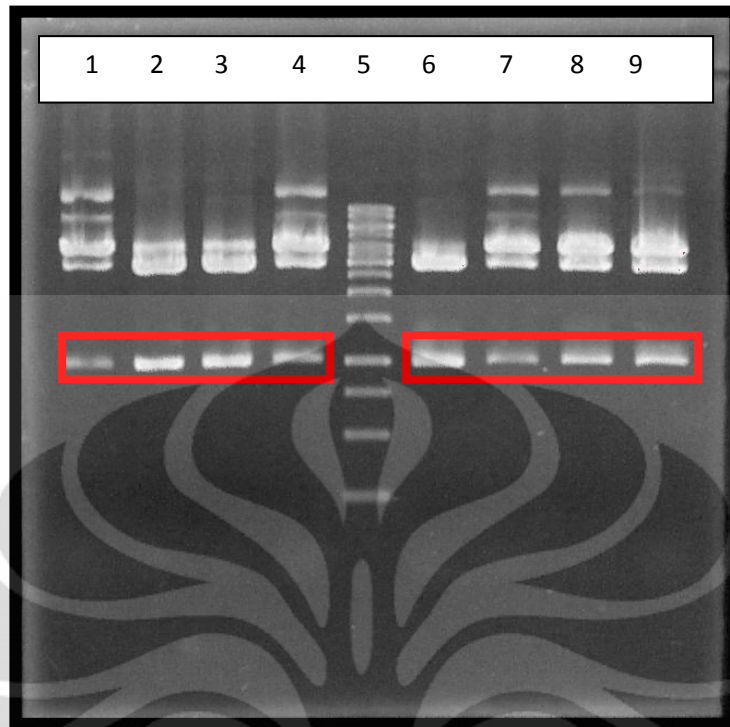
1-4) Isolasi plasmid pGEM-Asp *Erwinia raphontici* yang telah dipotong enzim restriksi EcoR1

6-9) Isolasi plasmid pGEM-Asp *Erwinia cyripedii* yang telah dipotong enzim restriksi EcoR1

5) DNA marker

Pada sumur ke 3, 4 dan 8,9 nampak pita dengan ukuran sekitar 1 kb (dalam lingkaran merah) dan 3 kb

Gambar 4.12 Elektroforesis hasil isolasi plasmid *Erwinia raphontici* dan *Erwinia cyripedii* yang telah dipotong enzim restriksi EcoR1.

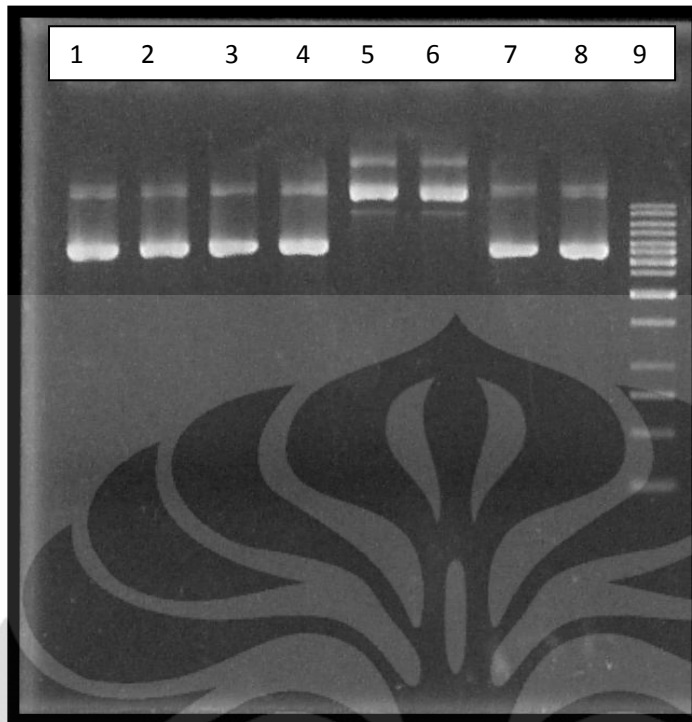


Keterangan :

1-4 dan 6-9 ) Isolasi plasmid pGEM-Asp *Bacillus circulans* yang telah dipotong enzim restriksi EcoR1 (dalam kotak merah)

5 ) DNA marker

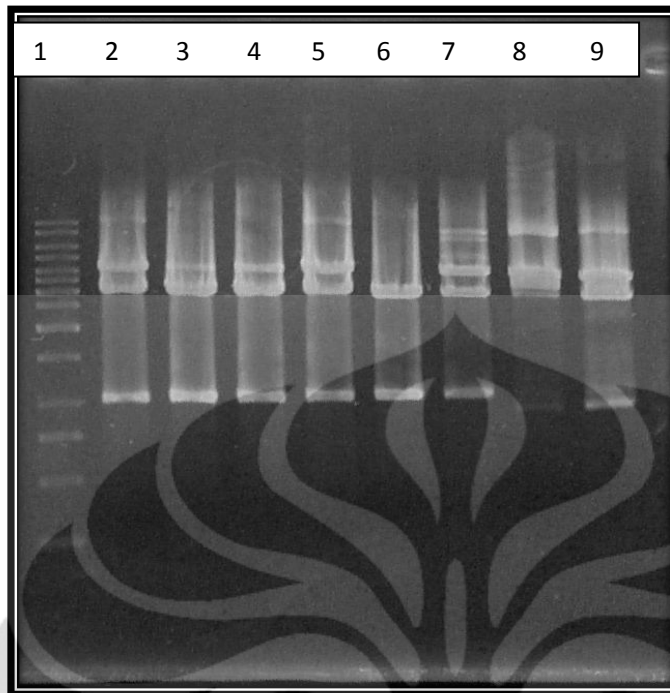
Gambar 4.13 Elektroforesis hasil isolasi plasmid *Bacillus circulans* yang telah dipotong enzim restriksi EcoR1.



Keterangan:

- 1) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 1.1
- 2) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 1.2
- 3) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.1
- 4) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2
- 5) pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3
- 6) pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 4
- 7) pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* klon 3
- 8) pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* klon 4.
- 9) DNA marker

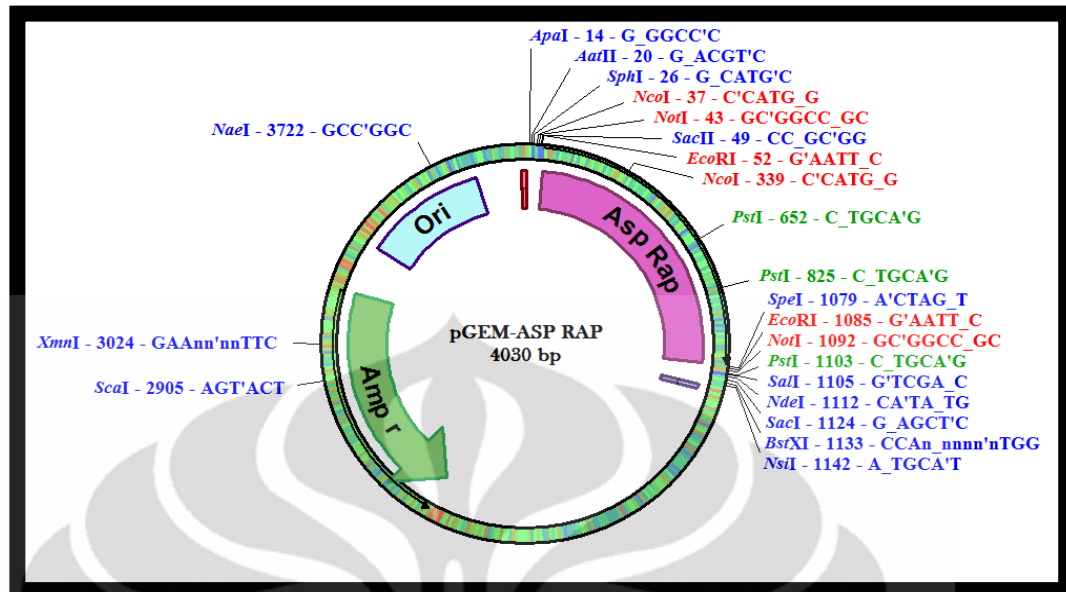
Gambar 4.14 Elektroforesis hasil isolasi plasmid menggunakan kit yang akan digunakan untuk sekuensing.



Keterangan:

- 1) DNA marker
- 2) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 1.1
- 3) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 1.2
- 4) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.1
- 5) pGEM-Asp *Bacillus circulans* klon 2.2
- 6) pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 3
- 7) pGEM-Asp *Erwinia raphontici* klon 4
- 8) pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* klon 3
- 9) pGEM-Asp *Erwinia cypripedii* klon 4.

Gambar 4.15 Elektroforesis hasil isolasi plasmid menggunakan kit yang telah dipotong dengan enzim restriksi EcoR1



Keterangan:

Asp Rap : Sisipan asparaginase (1015)

Amp r : *Open Reading Frame* resistensi terhadap antibiotik ampicilin.

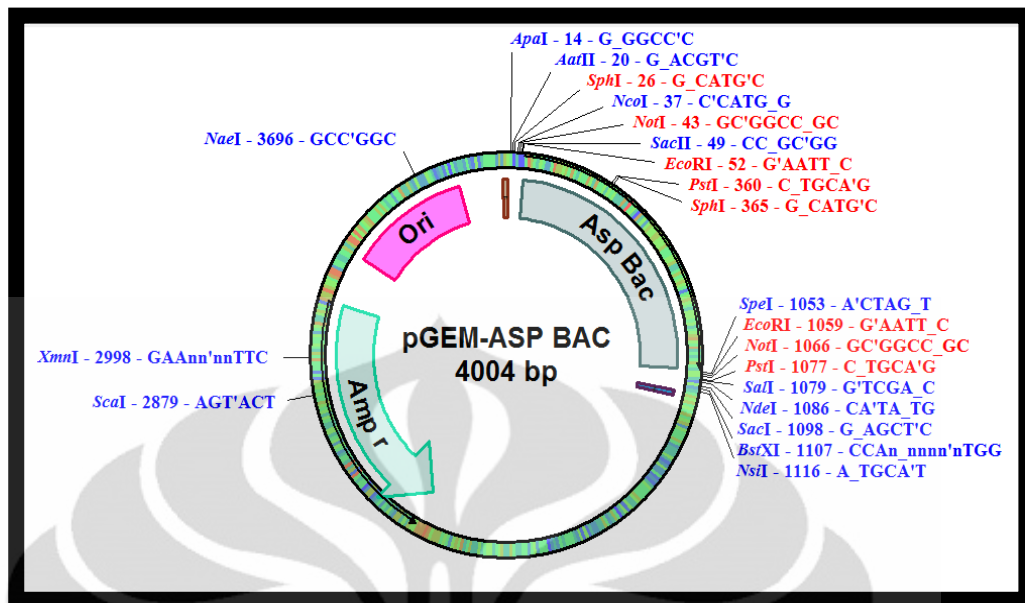
Ori : origin dari plasmid yang merupakan identitas dari plasmid.

T7 : promotor T7.

SP6 : promotor SP6

[Sumber : PDRAW32, PLASDRAW, NEB cutter.]

Gambar 4.16 Konstruksi plasmid pGEM-Asp *Erwinia raphontici*



Keterangan:

Asp Bac : Sisipan asparaginase (987)

Amp r : *Open Reading Frame* resistensi terhadap antibiotik ampicilin.

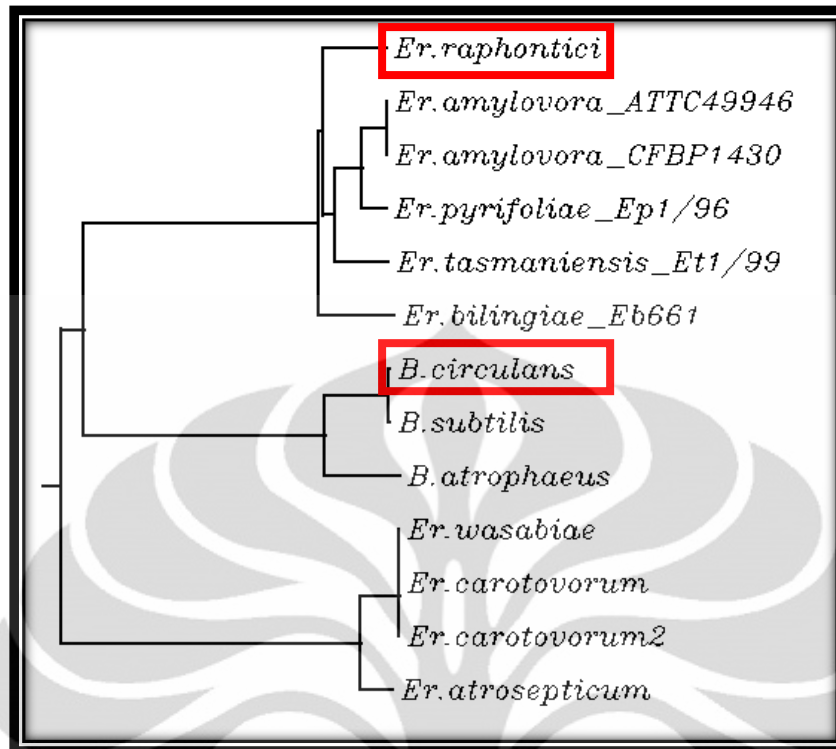
Ori : origin dari plasmid yang merupakan identitas dari plasmid.

T7 : promotor T7 .

SP6 : promotor SP6.

[Sumber : PDRAW32, PLASDRAW, NEB *cutter*.]

Gambar 4.17 Konstruksi plasmid pGEM-Asp *Bacillus circulans*.



Keterangan: yang berada dalam kotak merah adalah yang dikerjakan pada penelitian  
[Sumber : [www.genome.jp](http://www.genome.jp)]

Gambar 4.18 Analisis pohon filogenetik untuk *Erwinia raphontici* dan *Bacillus circulans* rekombinan.

Erwinia tasmaniensis strain ET1/99 complete chromosome  
Length=3883467

Features in this part of subject sequence:  
L-asparaginase 1

Score = 870 bits (471), Expect = 0.0  
Identities = 842/1023 (82%), Gaps = 18/1023 (2%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      ATGCAAAAGAAATCTATTTACGTGCGCTATACGGGCGGTACGATCGGTATGCAGCGCTCT 60
|||||
Sbjct 1775223 ATGCAAAAGAAATCCATTTACGTTGCCTACACGGGCGGCACTATCGGCATGCAGCGCTCC 1775164

Query 61     GAACACGGCTTTATTCCGGTCTCCGGCCATCTGCAACGTGAGCTGGCCAATATGCCGGAG 120
||| |||
Sbjct 1775163 GAGCATGGCTTTGTTCCGGTTTCCGGCCATCTTACGACCAGCTCGCCAACATGCCGGAA 1775104

Query 121    TTTACCCGCCGGAGATGCCTGATTTACCATCCATGAATACCAGCCGCTGATTGACTCC 180
|||||
Sbjct 1775103 TTTACATCGCCAGAAATGCCTGATTTACCATCCATGAATATCAGCCCTGATTGATTCT 1775044

Query 181    TCGGATATGACTCCGAGGACTGGCA-ATCGATTGCGGATGACATTGCGTCAGAATTATGA 239
|||||
Sbjct 1775043 TCGGATATGACGCCGAGGACTGGCAGATC-ATCGCGGACGATATACGGCAAAATTACGA 1774985

Query 240    -CAATTACGATGGCTTTGTCATTTGACCGGACCCGACACCATGGCCTTTACGGCCTCTG 298
| |||
Sbjct 1774984 TC-GTTACGATGGGTTGTTATCCTGCACGGCACCACGATGGCATTACCCGCTCAG 1774926

Query 299    CGCTGTCGTTTATGCTGGAAAACCTGGCCAAGCCGGTGATTGTGACAGGCTCACAGATCC 358
|||||
Sbjct 1774925 CGCTCTCGTTTATGCTGGAAAACCTGGCCAAGCCGGTGATTGTGACAGGCTCACAAATCC 1774866

Query 359    CACTGGAGCAACTGGCTCCGACGCCAGCAAATCTGCTGAACACTACTGTTTGTGCGCCG 418
| |||
Sbjct 1774865 CGCTTGAGCAGCTTCCGCTCCGATGGACAGCAGAATTTGTTAAATTCACTGTTGCTGCGCCG 1774806

Query 419    CAAATTATCCGATTAACGAAGTGACGTTATTCTTCAATAACACGCTTTATCGCGGTAACC 478
| |||
Sbjct 1774805 CTAACATCCGATCAACGAAGTGACGCTGTTTTCATAACACACTATACCCGCGTAATC 1774746

Query 479    GCACCACCAAAGCGCAGCTGACGG-TTTCATGCGTTT-GATTCGCCAAACCTCGCCCC 536
| |||
Sbjct 1774745 GTACCCTAAGGCTCATGCCGACGGCTTT-AATGC-TTTCGCTCGCCAATCTTGACCC 1774688

Query 537    GCTGCTGGAAGCCGGTATCCATATTCGTCGTCGTAATACCCCTGCC-GCACCTGCAGGCC 595
|||||
Sbjct 1774687 GCTGCTGGAAGCAGGATCCATATCCGCGCCTGAACACCGCT-CCTGCCCAACGGGTG 1774629

Query 596    AGGGAGCGCT-GATCGTGATC-CGATTACACCGCAGCCGATTGGCGTGGTGACAATCTA 653
||| |||
Sbjct 1774628 GGGTGAGCTTG-TGGTTCATCAC-ATTACTCCGCAGCCAATCGCGTGGTGACGCTCTA 1774571

Query 654    TCCGGGCATTTCTGCTGCCGTGGTGGTAACTTCTGCAACAGCCGGTAAAAGCACTGAT 713
|||||
Sbjct 1774570 TCCGGGAATTTACGCCAAGTGGTGGCAAACTTCTGCAACAGCCGGTAAAAGCGTTGAT 1774511

Query 714    CCTGCGTTCTTATGGCGTCGGAATGCTCCGCAGAACAAAGAGTTCTGAGGAGCTGAA 773
|||||
Sbjct 1774510 CCTGCGCTCTTATGGCGTTGGCAATGCCCGCAGAACAAAGCGTTCTTACGAGGAGCTGAA 1774451

Query 774    AGAGGCTTCCGATCGCGGCAATTGTTGGTCTTAACTCACGCAAGTGCATGTCGGTAAAGGT 833
| |||
Sbjct 1774450 GGCCGCTAACGAACGCGGCAATTGTTGGTGGTCAATCTCACCCAGTGTATGTCGGTAAAGGT 1774391

Query 834    CAATATGGGGGTTACGCCACCGGAAACGCTCTGGCCC-TGGCTGGCGTGGTGGTGGTGG 892
|||||
Sbjct 1774390 CAATATGGGAGGCTACGCCACCGGAAATGCGCTGGCGCATG-CGGGCGTGGTGGGAGCGGAG 1774332

Query 893    CCGACCTGACCGTTGAGGCTACACTGACCAAACCTGCACT-TCCTTCTGAGCCAGGACCTG 951
|||||
Sbjct 1774331 CCGATTTAACCGTCAAGCTACGCTGACCAAGCTGCATTATC-TGCTGAGCCAGGATTTG 1774273

```









Sbjct	121	LEQLRSDGQQNLLNSLFVAANYPINEVTLFFNNTLYRGNRTTKAHADGFNAF SPNL PL LEQLRSDGQQNLLNSLFVAANYPINEVTLFFNNTLYRGNRTTKAHADGFNAFASPPL	180
Query	181	LEAGIHIRRLNTPAAPAGQALIVHPITPQPIGVVTIYPGISA AAVVRNFLQQPVKALILR LEAGIHIRRLNTPAPAG+G L+VHPITPQPIGVVT+YPGISA VVRNFLQQPVKALILR	240
Sbjct	181	LEAGIHIRRLNTPAPAGEGELVVHPITPQPIGVVTLYPGISAEVVRNFLQQPVKALILR	240
Query	241	SYGVGNAPQNKEFLQELKEASDRGIVVNLTCMSGKVNMGYATGNALALAGVVSADL SYGVGNAPQNK FLQELK+A+ RGIVVNLTC+SGKVNMGYATGNALA AGVVSADL	300
Sbjct	241	SYGVGNAPQNKAFQELKDATGRGIVVNLTCISGKVNMGYATGNALAHAGVVSADL	300
Query	301	TVEATLTKLHFLLSQDLTSDEIRQLMKQNLRGELTPD 337 TVEATLTKLH+LLSQDLTSDEIRQLMKQNLRGELTPD	
Sbjct	301	TVEATLTKLHYLLSQDLTSDEIRQLMKQNLRGELTPD 337	

**Keterangan:**

Query : asam amino hasil sekuensing; Subject : asam amino *Erwinia pyrifoliae*. Hasil *Alignment* menunjukkan tingkat kesamaan antara asam amino pengkode Asparaginase dari *Erwinia pyrifoliae* dan asam amino dari *Erwinia raphontici* adalah 317 asam amino dari 337 asam amino atau 94 %. Asam amino yang berbeda atau gap adalah 0 asam amino dari 337 asam amino atau 0 %.  
[Sumber:www.ncbi.nlm.nih.gov]

**Gambar 4.21** *Alignment* asam amino *Erwinia raphontici* hasil sekuens dengan asam amino *Erwinia pyrifoliae*.

>	<input checked="" type="checkbox"/>	 cytoplasmic asparaginase I [Erwinia tasmaniensis Et1/99]	
		<a href="#">emb CA096610.1 </a>  L-asparaginase 1 [Erwinia tasmaniensis Et1/99]	
		Length=337	
		GENE ID: 6299625 ansA   cytoplasmic asparaginase I [Erwinia tasmaniensis Et1/99] (10 or fewer PubMed links)	
		Score = 653 bits (1685); Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 317/337 (94%), Positives = 323/337 (96%), Gaps = 0/337 (0%)	
Query	1	MQKKSIVVAYTGTTIGMQRSEHGFI PVSGHLQQLANMPEFHRPEMPDFTIHEYQPLIDS 60 MQKKSIVVAYTGTTIGMQRSEHGFPVSGHLQQLANMPEFHRPEMPDFTIHEYQPLIDS	60
Sbjct	1	MQKKSIVVAYTGTTIGMQRSEHGFPVSGHLQQLANMPEFHRPEMPDFTIHEYQPLIDS	60
Query	61	SDMTPQDWQSIADDIRQNYDNYDGFVILHGTDTMAFTASALSFMLENLAKPVI VTGSQIP 120 SDMTPQDWQ IADDIRQNYD YDGFVILHGTDTMAFTASALSFMLENLAKPVI VTGSQIP	120
Sbjct	61	SDMTPQDWQIIADDIRQNYDRYDGFVILHGTDTMAFTASALSFMLENLAKPVI VTGSQIP	120
Query	121	LEQLRSDGQQNLLNSLFVAANYPINEVTLFFNNTLYRGNRTTKAHADGFNAFSPNLAPL 180 LEQLRSDGQQNLLNSLFVAANYPINEVTLFFNNTLYRGNRTTKAHADGFNAF SPNLAPL	180
Sbjct	121	LEQLRSDGQQNLLNSLFVAANYPINEVTLFFNNTLYRGNRTTKAHADGFNAFASPPL	180
Query	181	LEAGIHIRRLNTPAAPAGQALIVHPITPQPIGVVTIYPGISA AAVVRNFLQQPVKALILR 240 LEAGIHIRRLNTPAPAG+G L+VHPITPQPIGVVT+YPGISA VVRNFLQQPVKALILR	240
Sbjct	181	LEAGIHIRRLNTPAPAGEGELVVHPITPQPIGVVTLYPGISAEVVRNFLQQPVKALILR	240
Query	241	SYGVGNAPQNKEFLQELKEASDRGIVVNLTCMSGKVNMGYATGNALALAGVVSADL 300 SYGVGNAPQNK FLQELK A++RGIVVNLTCMSGKVNMGYATGNALA AGVVSADL	300
Sbjct	241	SYGVGNAPQNKAFQELKAANERGIVVNLTCMSGKVNMGYATGNALAHAGVVSADL	300
Query	301	TVEATLTKLHFLLSQDLTSDEIRQLMKQNLRGELTPD 337 TVEATLTKLH+LLSQDLTSDEIRQLMKQNLRGELTPD	
Sbjct	301	TVEATLTKLHYLLSQDLTSDEIRQLMKQNLRGELTPD 337	

**Keterangan:**

Query : asam amino hasil sekuensing; Subject : asam amino *Erwinia tasmaniensis*. Hasil *Alignment* menunjukkan tingkat kesamaan antara asam amino pengkode Asparaginase dari *Erwinia tasmaniensis* dan asam amino dari *Erwinia raphontici* adalah 317 asam amino dari 337

asam amino atau 94 %. Asam amino yang berbeda atau gap adalah 0 asam amino dari 337 asam amino atau 0 %.

[Sumber:www.ncbi.nlm.nih.gov]

Gambar 4.22 *Alignment* asam amino *Erwinia raphontici* hasil sekuens dengan asam amino *Erwinia tasmaniensis*.

```

Bacillus subtilis BSn5, complete genome
Length=4093599

Features in this part of subject sequence:
  GXT repeat-containing collagen-like protein
  L-asparaginase

Score = 1784 bits (966), Expect = 0.0
Identities = 982/989 (99%), Gaps = 3/989 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 ATGAAAAAATTACTGATGTTGACAACCGGGGAACGATTGCTTCAGTTGAAGGGGAAAAAT 60
Sbjct 435961 ATGAAAAAATTATGATGTTGACAACCGGGGAACGATTGCTTCAGTTGAAGGGGAAAAAT 435902

Query 61 GGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTGATGAATTATTAAGTTACGTATCAACACTTGATAAC 120
Sbjct 435901 GGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTGATGAATTATTAAGTTACGTATCAACACTTGATAAC 435842

Query 121 GATTACACAATGGAAACTCAGTCGCTTATGAATATAGACAGCACCAATATGCAGCCTGAA 180
Sbjct 435841 GATTACACAATGGAAACTCAGTCGCTTATGAATATAGACAGCACCAATATGCAGCCTGAA 435782

Query 181 TACTGGGTGGAATAGCGGAAGCCGTTAAGGAAAATATGATGCCTATGACGGGTTTGT 240
Sbjct 435781 TACTGGGTGGAATAGCGGAAGCCGTTAAGGAAAATATGATGCCTATGACGGGTTTGT 435722

Query 241 ATTACTCACGGTACAGATACAATGGCCTATACATCTGCCGCACTATCGTATATGCTGCAG 300
Sbjct 435721 ATTACTCACGGTACAGATACAATGGCCTATACATCTGCCGCACTATCGTATATGCTGCAG 435662

Query 301 CATGCCAAAAAGCCGATTGTCATCACC GGCTCGCAGATTCCGATCACGTTCCAAAAAAC 360
Sbjct 435661 CATGCCAAAAAGCCGATTGTCATCACC GGCTCGCAGATTCCGATCACGTTCCAAAAAAC 435602

Query 361 GATGCCaaaaaaaTATTACAGATGCCATTCGATTTGCCTGTGAAGGCGTGGGCGGCGTT 420
Sbjct 435601 GATGCCAAAAAAATATTACAGATGCCATTCGATTTGCCTGTGAAGGCGTGGGCGGCGTT 435542

Query 421 TATGTTGTGTTTGACGGCAGAGTCATTCAGGGAACGCGTGCATCAAATTAAGAACGAAA 480
Sbjct 435541 TATGTTGTGTTTGACGGCAGAGTCATTCAGGGAACGCGTGCATCAAATTAAGAACGAAA 435482

Query 481 AGCTACGACGCATTTGAAAGCATCAATTACCCATATATCGCTTTTATCAATGAAGACGGG 540
Sbjct 435481 AGCTACGACGCATTTGAAAGCATCAATTACCCATATATCGCTTTTATCAATGAAGACGGG 435422

Query 541 ATCGAATACAACAACAAGTAACGGAACCTGAGAACGACACCTTCACAGTTGACACTTCA 600
Sbjct 435421 ATCGAATACAACAACAAGTAACGGAACCTGAGAACGACACCTTCACAGTTGACACTTCA 435362

Query 601 CTATGTACAGATGTATGTCTGCTGAAGCTGCATCCAGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGAT 660
Sbjct 435361 CTATGTACAGATGTATGTCTGCTGAAGCTGCATCCAGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGAT 435302

Query 661 GCCCTGAAAAGCATGTACAAGGAATTGTCATTGAGAGTTATGGCAGCGGAGGGGTGCCG 720
Sbjct 435301 GCCCTGAAAAGCATGTACAAGGAATTGTCATTGAGAGTTATGGCAGCGGAGGGGTGCCG 435242

Query 721 TTTGAAGGCAGAGACATTTTGTCAAAGTGAATGAGCTGATCGAAAGCGGCATTGTCGTG 780
Sbjct 435241 TTTGAAGGCAGAGACATTTTGTCAAAGTGAATGAGCTGATCGAAAGCGGCATTGTCGTG 435182

Query 781 GTCATTACGACTCAATGCTTGAAGAAGCGAAGACATGAGCATTACGAAGTTGGCCGC 840
Sbjct 435181 GTCATTACGACTCAATGCTTGAAGAAGCGAAGACATGAGCATTACGAAGTTGGCCGC 435122

```

Sbjct	435181	GTCATTACGACTCAATGTCTTGAAGAAGGCGAAGACATGAGCATTACGAAGTTGGCCGC	435122
Query	841	AGAGTCAACCAAGACTTAATTATCCGATCAAGAAATATGAACACAGAAGCAATTGTGCCA	900
Sbjct	435121	AGAGTCAACCAAGACTTAATTATCCGATCAAGAAATATGAACACAGAAGCAATTGTGCCA	435062
Query	901	AAATTGATGTGGGCACTAGGTCAGTCTTCGGATCTTCCTGTCTGTCAGAGAATTATGGAA	960
Sbjct	435061	AAATTGATGTGGGCACTAGGTCAGTCTTCGGATCTTCCTGTCTGTCAGAGAATTATGGAA	435002
Query	961	ACGCCGATCGCTGA---CGTTATCCTGTA	986
Sbjct	435001	ACGCCGATAGCTGATGACGTTGTCCTGTA	434973

Keterangan:

Query : hasil sekuensing; Subject : *Bacillus subtilis*. Hasil *Alignment* menunjukkan tingkat kesamaan antara nukleotida pengkode Asparaginase dari *Bacillus subtilis* dan nukleotida dari *Bacillus circulans* adalah 982 basa dari 989 basa atau 99 %. Nukleotida yang berbeda atau gap adalah 3 basa dari 989 basa atau 0 %.

[Sumber:www.ncbi.nlm.nih.gov]

Gambar 4.23 *Alignment* nukleotida *Bacillus subtilis* hasil sekuens dengan nukleotida *Bacillus circulans*.

Bacillus megaterium QM B1551, complete genome			
Length=5097129			
Features in this part of subject sequence:			
<u>L-asparaginase, type I</u>			
Score = 191 bits (103), Expect = 9e-45			
Identities = 675/944 (72%), Gaps = 67/944 (7%)			
Strand=Plus/Minus			
Query	2	TGAAAAAATTACTGA-TGTTGA-CAACCGGGGGAACGATTGCTTCAGTTGAAGGGGAAAA	59
Sbjct	3045601	TGAAAAAATA-TTATTGTT-ATCAACTGGTGGAAACGGTCGCTTCACTTGAAGGTGAAAA	3045544
Query	60	TGGGCTGGCTCCCGAGTCAAGGCTGATGAATTATTAAGTTACGTATCAACACTT-GAT-	117
Sbjct	3045543	TGGACTTGTTCCTGGAATGGAGCCAGATCAATTACTAAGCTACATA-CCTGATTTAAATG	3045485
Query	118	AACGA-T-TACACAATGGA-AACTCAGTCGCTTATGAATATAGACAGCACCAATATGCAG	174
Sbjct	3045484	AAC-ACTGT-CA-AATTGACAGC-AAATCTCTTATGAATCTTGATAGTACAAATATGCAG	3045429
Query	175	CCTGAATACTGGGTGGAAATAGCGGAAGCCG-T-TAAGGAAAATTATGATGCCTATGACG	232
Sbjct	3045428	CCAGAATGTTGGATAGAGATGGCAAAAG-CGATCGAA-GAGCATTATAATGAATACGATG	3045371
Query	233	GGTTTGTATTACTCACGGTACAGATACAATGGCCTATAACATCTGCCGCACTATCGTATA	292
Sbjct	3045370	GTTTGTATTACCCATGGAAGTATGATACAATGGCCTACACATCGGCAGCTCTTCTTACA	3045311
Query	293	TGCTGCAGCATGCCAAAAAGCCGATTGTC-ATCACCGGCTCGCAGATTCCGATCACGTTT	351
Sbjct	3045310	TGCTTCAGCATTCTAAAAACCAATTG-CGATTACAGGATCTCAAATTCCTATTTTCATT-	3045253
Query	352	CA-AAAAACCGATGCCAAAAAATATTACAGATGCCATTTCGATTTCCTGTGAAGGCGT	410
Sbjct	3045252	TAGTAAAACGGACGCGAAGCGCAATATTGCAGATGCGATTTCGCTTGTGAAGAAAC	3045193


Query	411	GGGCGGCGTTTATGTTGTGTTTGACGG-CAGAGTCATTCAGGGAACGCGTGCATCAA-A	468
Sbjct	3045192	AGGCGGAGTCTATGTAGTCTTTGACGGTC-GTGTGATTCAAGGCACAAGAGCAATCAAGC	3045134
Query	469	TTAAGAACGAAAAGCTACGACGCATTTGAAAGCATCAATTACCCATATATCGCTTTTATC	528
Sbjct	3045133	TT-CGTACAAAAGCTATGATGCATTTGAAAGCATTAAATTATCCATACGTGGCGCTCTATC	3045075
Query	529	AATG--AAGACGGGATCGAATAACAAC-AAACAAGTAACGGAAC-CTGAG-AACG-ACACC	582
Sbjct	3045074	CATGATAATAC-GG-TGGAATA-TACAAAACCCGT-TC-G--CTCT-AGTAAGAAGA-G	3045024
Query	583	TTCACAGTTGACACTTCACTATGTACAGATGTATGTCTGCTG--AAGCTGCATCCAGGC-	639
Sbjct	3045023	TTGACGGTTAATACATCTCTTTGTACGGATGTA-G-CAGTTGTTAAACTGTTTCCCGGCA	3044966
Query	640	TTAAAGCCCGAAATGTTT-GATGCCCTGAAAAGCATGTACA--AAGGAATTGTCATTGAG	696
Sbjct	3044965	TTAAA-CCTG-AATTTTTCGATG-GAT-TAAAGGATGTATATCAAGCGTTGTTGTGAA	3044910
Query	697	AGTTATGGCAGCGGAGGGGTGCCGTTTGAAG-GCAG-AGACATTTT-GTCAAAAGTGAAT	753
Sbjct	3044909	AGCTATGGAAGTGGAGGTATCCATTTCAAGTTC-GCA-ACATTTAGCCAAGCTTG-TT	3044853
Query	754	GAGCTGATCGAAAGCGGC-AT-TGT-CGTGGTCATTACGACTCAATGTCTTGAAGAAGGC	810
Sbjct	3044852	GAG-TTAAC-AAA-CCACGGTGTATCCGTTGTCATTACGACTCAATGTCTTGAAGAAGGA	3044796
Query	811	GAAGACATGAGCATTTACGAAGTTGGCCGCA-GAGTCAACCAAGACTTAATTATCCGATC	869
Sbjct	3044795	GAAGACATGGGCATTTTGAAGTAGGCCGAATGATT-AATCATGACAGCGTCTGCGCTC	3044737
Query	870	AAGAAATATGAACACAGAAGCAATTGTGCCAAAATTGATGTGGG	913
Sbjct	3044736	AAAAACATGAACACAGAAGCCATTGTTTCCTAAATTAATGTGGG	3044693

**Keterangan:**

Query : hasil sekuensing; Subject : *Bacillus megaterium*. Hasil *Alignment* menunjukkan tingkat kesamaan antara nukleotida pengkode Asparaginase dari *Bacillus megaterium* dan nukleotida dari *Bacillus circulans* adalah 675 basa dari 944 basa atau 72 %. Nukleotida yang berbeda atau gap adalah 7 basa dari 944 basa atau 7 %.

[Sumber:www.ncbi.nlm.nih.gov]

Gambar 4.24 *Alignment* nukleotida *Bacillus megaterium* hasil sekuens dengan nukleotida *Bacillus circulans*.


L-asparaginase [Bacillus subtilis BSn5]			
<a href="#">gb ADV93095.1 </a>  L-asparaginase [Bacillus subtilis BSn5]			
Length=329			
GENE ID: 10181107 BSn5_02305   L-asparaginase [Bacillus subtilis BSn5]			
Score = 671 bits (1731), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.			
Identities = 325/325 (100%), Positives = 325/325 (100%), Gaps = 0/325 (0%)			
Query	1	MKKLLMLTTGGTIASVEGENGLAPGVKADELLSYVSTLDNDYTMETQSLMNIDSTNMQPE	60
Sbjct	1	MKKLLMLTTGGTIASVEGENGLAPGVKADELLSYVSTLDNDYTMETQSLMNIDSTNMQPE	60
Query	61	YWVEIAEAVKENYDAYDGFVITHGTDTMAYTSAALS YMLQHAKKPIVITG SQIPITFQKT	120

Sbjct	61	YWVEIAEAVKENYDAYDGFVITHGTDTMAYTSAALS YMLQHAKKPIVITG SQIPITFQKT	120
Query	121	DAKKNITDAIRFACEGVGGVYVVF DGRVIQGTTRAIKLRTKSYDAFESINYPYIAFINEDG	180
Sbjct	121	DAKKNITDAIRFACEGVGGVYVVF DGRVIQGTTRAIKLRTKSYDAFESINYPYIAFINEDG	180
Query	181	IEYNKQVTEPENDTFTVDTS LCTDVCLLKLHPGLKPEMFDALKSMYKGIVIESYSGGGVP	240
Sbjct	181	IEYNKQVTEPENDTFTVDTS LCTDVCLLKLHPGLKPEMFDALKSMYKGIVIESYSGGGVP	240
Query	241	FEGRDILSKVNELIESGIVVVIT TQCLEEGEDMSIYEVGRRVNQDLIIRSRNMNTEAIVP	300
Sbjct	241	FEGRDILSKVNELIESGIVVVIT TQCLEEGEDMSIYEVGRRVNQDLIIRSRNMNTEAIVP	300
Query	301	KLMWALGQSSDLPVVKRIMETPIAD	325
Sbjct	301	KLMWALGQSSDLPVVKRIMETPIAD	325

Keterangan:

Query : asam amino hasil sekuensing; Subject : asam amino *Bacillus subtilis*. Hasil *Alignment* menunjukkan tingkat kesamaan antara asam amino pengkode Asparaginase dari *Bacillus subtilis* dan asam amino dari *Bacillus circulans* adalah 325 asam amino dari 325 asam amino atau 100 %. Asam amino yang berbeda atau gap adalah 0 asam amino dari 325 asam amino atau 0 %.  
[Sumber:www.ncbi.nlm.nih.gov]

Gambar 4.25 *Alignment* asam amino *Bacillus circulans* hasil sekuens dengan asam amino *Bacillus subtilis*.

<a href="#">sp P26900.1 ASPG1_BACSU</a> RecName: Full=L-asparaginase 1; Short=L-ASNase 1; AltName: Full=L-asparagine amidohydrolase 1 <a href="#">gb AAA22243.1 </a> L-asparaginase [ <i>Bacillus subtilis</i> ] <a href="#">dbj BAA12642.1 </a> AnsA [ <i>Bacillus subtilis</i> ] <a href="#">emb CAB14290.1 </a>  exported L-asparaginase [ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168] <a href="#">dbj BAI85865.1 </a> L-asparaginase [ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i> BEST195] Length=329  GENE ID: 938722 ansA   exported L-asparaginase [ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168] (10 or fewer PubMed links)  Score = 669 bits (1726), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 324/325 (99%), Positives = 324/325 (99%), Gaps = 0/325 (0%)			
Query	1	MKKLLMLTTGGT IASVEGENGLAPGVKADELLSYVSTLDNDYTMETQSLMNIDSTNMQPE	60
Sbjct	1	MKKLLMLTTGGT IASVEGENGLAPGVKADELLSYV LDNDYTMETQSLMNIDSTNMQPE	60
Query	61	YWVEIAEAVKENYDAYDGFVITHGTDTMAYTSAALS YMLQHAKKPIVITG SQIPITFQKT	120
Sbjct	61	YWVEIAEAVKENYDAYDGFVITHGTDTMAYTSAALS YMLQHAKKPIVITG SQIPITFQKT	120
Query	121	DAKKNITDAIRFACEGVGGVYVVF DGRVIQGTTRAIKLRTKSYDAFESINYPYIAFINEDG	180
Sbjct	121	DAKKNITDAIRFACEGVGGVYVVF DGRVIQGTTRAIKLRTKSYDAFESINYPYIAFINEDG	180
Query	181	IEYNKQVTEPENDTFTVDTS LCTDVCLLKLHPGLKPEMFDALKSMYKGIVIESYSGGGVP	240
Sbjct	181	IEYNKQVTEPENDTFTVDTS LCTDVCLLKLHPGLKPEMFDALKSMYKGIVIESYSGGGVP	240
Query	241	FEGRDILSKVNELIESGIVVVIT TQCLEEGEDMSIYEVGRRVNQDLIIRSRNMNTEAIVP	300
Sbjct	241	FEGRDILSKVNELIESGIVVVIT TQCLEEGEDMSIYEVGRRVNQDLIIRSRNMNTEAIVP	300
Query	301	KLMWALGQSSDLPVVKRIMETPIAD	325
Sbjct	301	KLMWALGQSSDLPVVKRIMETPIAD	325

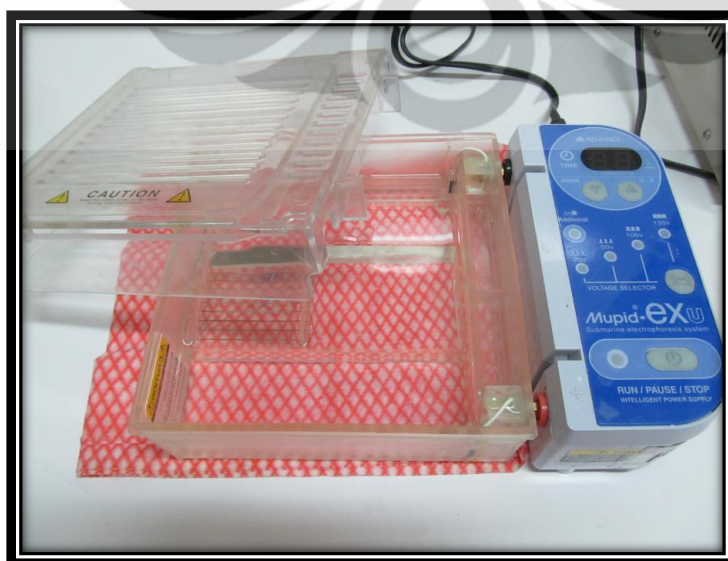
Keterangan: Query : asam amino hasil sekuensing; Subject : asam amino *Bacillus subtilis*. Hasil *Alignment* menunjukkan tingkat kesamaan antara asam amino pengkode Asparaginase dari *Bacillus subtilis* dan asam amino dari *Bacillus circulans* adalah 324 asam amino dari 325 asam amino atau 99 %. Asam amino yang berbeda atau gap adalah 0 asam amino dari 325 asam amino atau 0 %.

[Sumber:www.ncbi.nlm.nih.gov]

Gambar 4.26 *Alignment* asam amino *Bacillus circulans* hasil sekuens dengan asam amino *Bacillus subtilis*.



Gambar 4.27 *Thermocycler* yang digunakan untuk PCR.



Gambar 4.28 Alat elektroforesis.

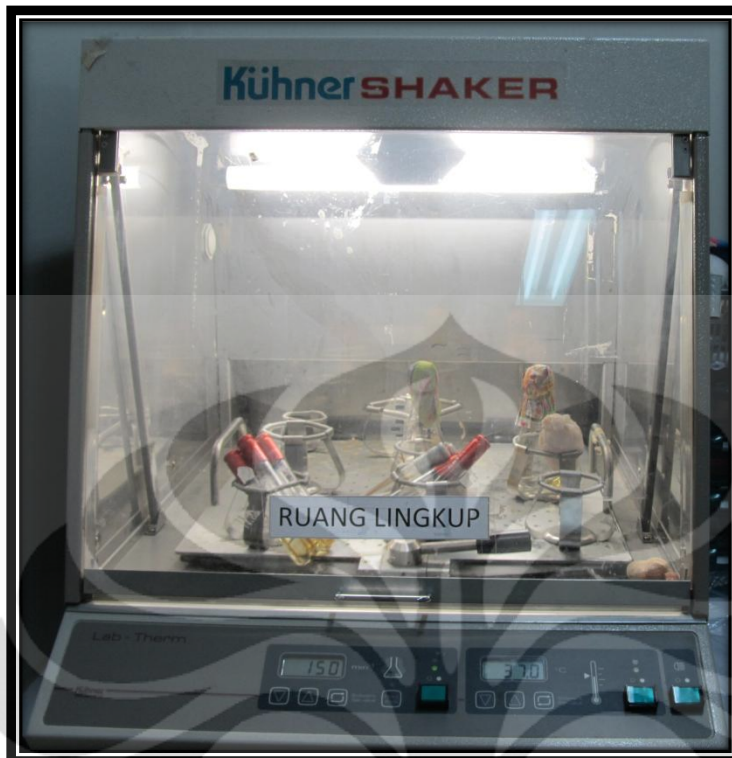




Gambar 4.29 *Thermomixer*.



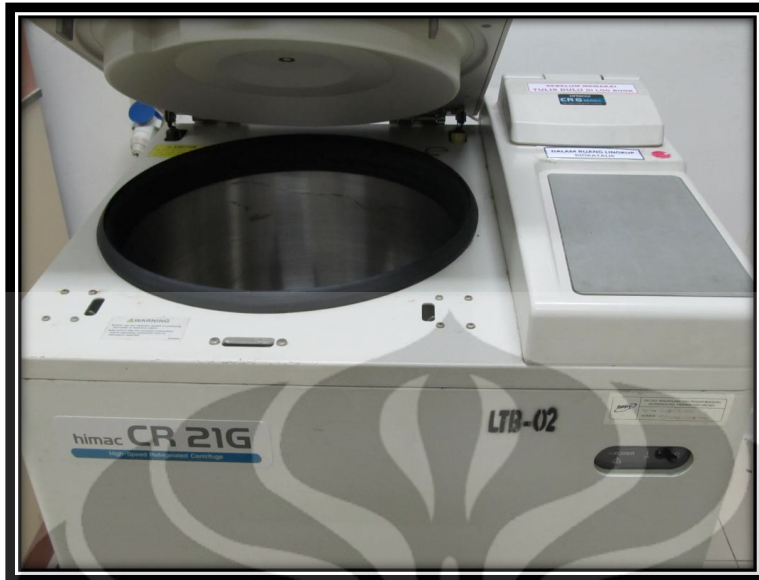
Gambar 4.30 Sentrifuse dengan pendingin.



Gambar 4.31 *Shaker*.



Gambar 4.32 *Laminar Air Flow*.



Gambar 4.33 Sentrifuse dengan pendingin.



Gambar 4.34 Autoklaf.

Tabel 4.1 *Alignment* nukleotida penyandi asparaginase dari bakteri : *Carotovorum wasabiae*, *Carotovorum carotovorum* (2 strain), dan *Pectobacterium atrosepticum* (Ansb2).

	10	20	30	40	50
wasabiae	atgcaactctcattcatcgctcgcaccatcaccgccgcttgccctgagtgt				
carotovorum	atgcaactctcattcatcgctcgcaccatcaccgccgcttgccctgagtgt				
carotovorum2	atgcaactctcattcatcgctcgcaccatcaccgccgcttgccctgagtgt				
ansb2	atgcaactctcatttcatcgctcgcaccatcaccgccgcttgccctgagtgt				
	60	70	80	90	100
wasabiae	atcatcccatgtactgctggccgatgacgccaaaacctggcgttacgat				
carotovorum	atcatcccatgtactgctggccgatgacgccaaaacctggcgttacgat				
carotovorum2	atcatcccatgtactgctggccgatgacgccaaaacctggcgttacgat				
ansb2	gtcgtctcattgctgctgacccgatgacgccaaaacctggcgttacgat				
	110	120	130	140	150
wasabiae	acgcaacaggggggaccatcgccggaaaggcagaatcctaatacggat				
carotovorum	acgcaacaggggggaccatcgccggaaaggcagaatcctaatacggat				
carotovorum2	acgcaacaggggggaccatcgccggaaaggcagaatcctaatacggat				
ansb2	acgcttacggcggcaccattgctggaaaggcagaatcctaatacggccacg				
	160	170	180	190	200
wasabiae	acaggctataaggcgggcgcatcggcattcaggaactgctgaacgctgt				
carotovorum	acaggctataaggcgggcgcatcggcattcaggaactgctgaacgctgt				
carotovorum2	acaggctataaggcgggcgcatcggcattcaggaactgctgaacgctgt				
ansb2	acaggctataaggcgggcgctatcggcattcaggaactgctgaacgctgt				
	210	220	230	240	250
wasabiae	accactattggcgatgtcgcgacggtaaccggtgagcaaatcgccaaca				
carotovorum	accactattggcgatgtcgcgacggtaaccggtgagcaaatcgccaaca				
carotovorum2	accactattggcgatgtcgcgacggtaaccggtgagcaaatcgccaaca				
ansb2	tccggctattggcgatgtcgcctacggtgacaggcgagcaaatcgccaaca				
	260	270	280	290	300
wasabiae	ccgccagcgggaataatcgatcaggctattctgttgaagctatccaaagcg				
carotovorum	ccgccagcgggaataatcgatcaggctattctgttgaagctatccaaagcg				
carotovorum2	ccgccagcgggaataatcgatcaggctattctgttgaagctatccaaagcg				
ansb2	ccgccagcgggaataatcgatcaaggcattctgttaagctatccaaagcg				
	310	320	330	340	350
wasabiae	attaacaaacaggttaagcgacgcaaacacacacggcgtcgttgtgactca				
carotovorum	attaacaaacaggttaagcgacgcaaacacacacggcgtcgttgtgactca				
carotovorum2	attaacaaacaggttaagcgacgcaaacacacacggcgtcgttgtgactca				
ansb2	attaacaaacaggttaggcgatctcaaaatcgcacggcgtcgctcatctactca				

	360	370	380	390	400
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cggcaccgatacgtttggaagagacggcgcttctttttggatctgacggtaa			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cggcaccgatacgtttggaagagacggcgcttctttttggatctgacggtaa			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cggcaccgatacgtttggaagagacggcgcttctttttggatctgacggtaa			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cggcaccgatacgtttggaagagacggcgcttctttttggatctgacggtaa			
	410	420	430	440	450
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	aaagtgagaaaaccggtgggtgatcgtttggcgcaatgcgctcccgccaccgcc			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	aaagtgagaaaaccggtgggtgatcgtttggcgcaatgcgctcccgccaccgcc			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	aaagtgagaaaaccggtgggtgatcgtttggcgcaatgcgctcccgccaccgcc			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	aaagcgagaaaaccagttggttgctcgtcggcgcaatgcgctcccgccaccgcc			
	460	470	480	490	500
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	atcagtgccggacggttccatgaacctgctggaagccgtcacgctggcgac			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	atcagtgccggacggttccatgaacctgctggaagccgtcacgctggcgac			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	atcagtgccggacggttccatgaacctgctggaagccgtcacgctggcgac			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	atcagcgccggaaggctcctatgaacctgctggaagccgtcacgctggcgac			
	510	520	530	540	550
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cagcaagaacgcggaaaaaacgcggcgcgatgggtgctgctcaacgaccgca			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cagcaagaacgcggaaaaaacgcggcgcgatgggtgctgctcaacgaccgca			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cagcaagaacgcggaaaaaacgcggcgcgatgggtgctgctcaacgaccgca			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	cagcaagaacgcggaaaaaacgcggcgcgatgggtgctgctcaacgaccgca			
	560	570	580	590	600
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	tgggttcgccttctataaccacaaaaaccaatgccacgtcgctggacacg			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	tgggttcgccttctataaccacaaaaaccaatgccacgtcgctggacacg			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	tgggttcgccttctataaccacaaaaaccaatgccacgtcgctggacacg			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	tgggttcgccttctataaccacaaaaaccaatgccacgtcgctggacacg			
	610	620	630	640	650
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ttcaaagccaatgaacaaggctatctcggctgccttctacggcggcggttcc			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ttcaaagccaatgaacaaggctatctcggctgccttctacggcggcggttcc			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ttcaaagccaatgaacaaggctatctcggctgccttctacggcggcggttcc			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	ttcaaagccaatgaacaaggctatctcggctgccttctacggcggcggttcc			
	660	670	680	690	700
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	acgcttcttctaccagccagccgctcccgaaaaacaaaccgcttcttttgacg			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	acgcttcttctaccagccagccgctcccgaaaaacaaaccgcttcttttgacg			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	acgcttcttctaccagccagccgctcccgaaaaacaaaccgcttcttttgacg			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	gcgcttcttctaccagccagccgctcccgaaaaacaaaccgcttcttttgacg			
	710	720	730	740	750
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	taagtaataaggaagcgctcgcgaaggctcgacattctgtacagctatcag			
carotovorum	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	taagtaataaggaagcgctcgcgaaggctcgacattctgtacagctatcag			
carotovorum2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	taagtaataaggaagcgctcgcgaaggctcgacattctgtacagctatcag			
ansb2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	taagcaataaggaacacgctcgcgaaggctcgacattctctacagctatcag			

	760	770	780	790	800
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
carotovorum	gatcaagacagcggcctgctgaatgccgcgattgaacagggcgcaaaagg				
carotovorum2	gatcaagacagcggcctgctgaatgccgcgattgaacagggcgcaaaagg				
ansb2	gatcaagacagtggtctgctgaatgccgcattgaacagggcgcaaaagg				
	810	820	830	840	850
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
carotovorum	gatcatcatcgcgggtagcggtaacggttctacgccaacgcgta tcaaaag				
carotovorum2	gatcatcatcgcgggtagcggtaacggttctacgccaacgcgta tcaaaag				
ansb2	catcatcatcgcgggtagcggtaacggttctacgccaacgcgta tcaaaag				
	860	870	880	890	900
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
carotovorum	aagacatcaagaaagcggtagccaaaggattccggtggtgatcagcaca				
carotovorum2	aagacatcaagaaagcggtagccaaaggattccggtggtgatcagcaca				
ansb2	aagacatcaagaaagcggtagccaaaggattccggtggtgatcagcaca				
	910	920	930	940	950
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
carotovorum	cgcaccggcaacggctatgtaacggataagaagaaagacggtgctatcgg				
carotovorum2	cgcaccggcaacggctatgtaacggataagaagaaagacggtgctatcgg				
ansb2	cgcaccggcaacggctatgtaacggataagaagaaagacggtgctatcgg				
	960	970	980	990	1000
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
carotovorum	cagtggattctacaaccgcagaaaagcccgcattctgctctctctggcgt				
carotovorum2	cagtggattctacaaccgcagaaaagcccgcattctgctctctctggcgt				
ansb2	cagcggattctacaaccgcagaaaagcccgcattctgctctctctggcgt				
	1010	1020	1030	1040	1050
wasabiae	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
carotovorum	tgttctaacggcgacgatatcgagaaaaatccgcagctatcttcgagcagtaa				
carotovorum2	tgttctaacggcgacgatatcgagaaaaatccgcagctatcttcgagcagtaa				
ansb2	tgttctaacggcgacgatatcgagaaaaatccgcagctatcttcgagcagtaa				

Keterangan : 30 nukleotida bagian depan digunakan untuk mendesain primer *forward*. 31 nukleotida bagian belakang digunakan untuk mendesain primer *reverse*.

[Sumber: CLUSTALW [www.genome.jp](http://www.genome.jp), Bioedit]

Tabel 4.2 *Alignment* nukleotida penyandi asparaginase dari bakteri : *Erwinia amylovora* (2 strain), *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia tasmaniensis*, *Erwinia billingiae*.

	10	20	30	40
amylovora_ATT49946	atgcaaaagaaa	tccat	tttacgtcgcctata	tactggcggga
amylovora_CFBP1430	atgcaaaagaaa	tccat	tttacgtcgcctata	tactggcggga
pyrifoliae_Ep1/96	atgcaaaagaaa	tccat	tttacgtcgcctata	tactggcggga
tasmaniensis_Et1/99	atgcaaaagaaa	tccat	tttacgtcgcctata	cacggcggga
billingiae_Eb661	atgcaaaagaaa	tccat	tttacgtcgcctata	cggcggga
	50	60	70	80
amylovora_ATT49946	ccatcggcatgcagcgt	tccgaacaggg	ttttattccgg	t
amylovora_CFBP1430	ccatcggcatgcagcgt	tccgaacaggg	ttttattccgg	t
pyrifoliae_Ep1/96	ccatcggcatgcagcgt	tccgaacaggg	ttttattccgg	t
tasmaniensis_Et1/99	ctatcggcatgcagcgt	tccgaacaggg	ttttattccgg	t
billingiae_Eb661	ccatcggcatgcagcgt	tccgaacaggg	ttttattccgg	t
	90	100	110	120
amylovora_ATT49946	ctccgggcatctgcagaaa	cagctggccaata	tggccagag	
amylovora_CFBP1430	ctccgggcatctgcagaaa	cagctggccaata	tggccagag	
pyrifoliae_Ep1/96	ttccgggcatctgcagaaa	cagctggccaata	tggccagag	
tasmaniensis_Et1/99	ttccgggcatctgcagaaa	cagctggccaata	tggccagag	
billingiae_Eb661	ttccgggcatctgcagaaa	cagctggccaata	tggccagag	
	130	140	150	160
amylovora_ATT49946	ttccaccggccagaaa	tgccctgatttcaccat	ccaatgaa	t
amylovora_CFBP1430	ttccaccggccagaaa	tgccctgatttcaccat	ccaatgaa	t
pyrifoliae_Ep1/96	ttccaccggccagaaa	tgccctgatttcaccat	ccaatgaa	t
tasmaniensis_Et1/99	ttccaccggccagaaa	tgccctgatttcaccat	ccaatgaa	t
billingiae_Eb661	ttccaccggccagaaa	tgccctgatttcaccat	ccaatgaa	t
	170	180	190	200
amylovora_ATT49946	atcagcctttgattgact	catcagatatgac	ccccagga	
amylovora_CFBP1430	atcagcctttgattgact	catcagatatgac	ccccagga	
pyrifoliae_Ep1/96	atcagcctttgattgact	catcagatatgac	ccccagga	
tasmaniensis_Et1/99	atcagcctttgattgact	catcagatatgac	ccccagga	
billingiae_Eb661	atcagcctttgattgact	catcagatatgac	ccccagga	
	210	220	230	240
amylovora_ATT49946	ctggcaaaccaatcgccgagg	atataaaagcaaa	actacgat	
amylovora_CFBP1430	ctggcaaaccaatcgccgagg	atataaaagcaaa	actacgat	
pyrifoliae_Ep1/96	ctggcagaccatcgccgat	atataaaagcaaa	actacgat	
tasmaniensis_Et1/99	ctggcagaccatcgccgat	atataaaagcaaa	actacgat	
billingiae_Eb661	ctggcaaaccaatcgccgagg	atataaaagcaaa	actacgat	

	250	260	270	280
amylovora_ATT49946	..... ..... ..... ..... .....	cgctacgacgggttttgc	atcctgcacgggacgg	acacca
amylovora_CFBP1430	..... ..... ..... ..... .....	cgctacgacgggttttgc	atcctgcacgggacgg	acacca
pyrifoliae_Ep1/96	..... ..... ..... ..... .....	cgctacgacgggttttgc	atcctgcacgggtact	gacacca
tasmaniensis_Et1/99	..... ..... ..... ..... .....	cgcttacgatggggtttg	tatcctgcacggcacc	gacacga
bilingiae_Eb661	..... ..... ..... ..... .....	caatagcagcggctttg	gatcctgcatggcacc	gacacca
	290	300	310	320
amylovora_ATT49946	..... ..... ..... ..... .....	tggcgtttacgcctcgg	cactctcatttatgct	tggaaaa
amylovora_CFBP1430	..... ..... ..... ..... .....	tggcgtttacgcctcgg	cactctcatttatgct	tggaaaa
pyrifoliae_Ep1/96	..... ..... ..... ..... .....	tggcgtttacgcctcgg	cactctcatttatgct	tggaaaa
tasmaniensis_Et1/99	..... ..... ..... ..... .....	tggcattcacgcctcag	cgctctcgtttatgct	tggaaaa
bilingiae_Eb661	..... ..... ..... ..... .....	tggcgttcactgcttc	ggcactgctcatttat	gctggagaa
	330	340	350	360
amylovora_ATT49946	..... ..... ..... ..... .....	cctcgccaagccggttat	cgtgaccgggtcacaga	taccg
amylovora_CFBP1430	..... ..... ..... ..... .....	cctcgccaagccggttat	cgtgaccgggtcacaga	taccg
pyrifoliae_Ep1/96	..... ..... ..... ..... .....	cctcgccaagccggttat	cgtgacagggtcacaga	taccg
tasmaniensis_Et1/99	..... ..... ..... ..... .....	cctggccaagccggtgat	tgtgacagggtcacaaa	tcccg
bilingiae_Eb661	..... ..... ..... ..... .....	tcttgccaagccggta	aatcgtgacagggtc	acaaaattccg
	370	380	390	400
amylovora_ATT49946	..... ..... ..... ..... .....	cttgaacagctgcgctcc	gacgggcagcagaa	tttgctga
amylovora_CFBP1430	..... ..... ..... ..... .....	cttgaacagctgcgctcc	gacgggcagcagaa	tttgctga
pyrifoliae_Ep1/96	..... ..... ..... ..... .....	cttgaacagctgcgctcc	gacgggcagcagaa	tttgctga
tasmaniensis_Et1/99	..... ..... ..... ..... .....	cttgaacagcttcgctcc	gatggacagcagaa	tttgctaa
bilingiae_Eb661	..... ..... ..... ..... .....	ctcgaacagcttgcttc	ggatgggcagcaaaa	cctgctaa
	410	420	430	440
amylovora_ATT49946	..... ..... ..... ..... .....	attctctgtttgtcgcg	ctaactaccggatta	atgaagt
amylovora_CFBP1430	..... ..... ..... ..... .....	attctctgtttgtcgcg	ctaactaccggatta	atgaagt
pyrifoliae_Ep1/96	..... ..... ..... ..... .....	attcgttattcgtttgc	ccgcaactaccggatta	atgaagt
tasmaniensis_Et1/99	..... ..... ..... ..... .....	attcactgtttcgtcgc	gctaactaccgata	ccaggaagt
bilingiae_Eb661	..... ..... ..... ..... .....	acgccttttctcgtcgc	gctaataatccgatta	atgaagt
	450	460	470	480
amylovora_ATT49946	..... ..... ..... ..... .....	cacgctgtttcttcaata	aacctgtaccgcgga	aaccgc
amylovora_CFBP1430	..... ..... ..... ..... .....	cacgctgtttcttcaata	aacctgtaccgcgga	aaccgc
pyrifoliae_Ep1/96	..... ..... ..... ..... .....	cacgctgtttcttcaata	aacctgtaccgcgga	aaccgc
tasmaniensis_Et1/99	..... ..... ..... ..... .....	gacgctgtttcttcaata	aacacactataccg	cggtaaacgt
bilingiae_Eb661	..... ..... ..... ..... .....	ggcgctgtttcttcaaa	caacacctgtaccg	cggaaccgc
	490	500	510	520
amylovora_ATT49946	..... ..... ..... ..... .....	accaccaaggcaca	tgccgatggcttca	acgcttttgcct
amylovora_CFBP1430	..... ..... ..... ..... .....	accaccaaggcaca	tgccgatggcttca	acgcttttgcct
pyrifoliae_Ep1/96	..... ..... ..... ..... .....	accaccaaggcaca	tgccgacggctt	taacgcttttgcct
tasmaniensis_Et1/99	..... ..... ..... ..... .....	accactaaggcctca	tgccgacggctt	taacgcttttgcct
bilingiae_Eb661	..... ..... ..... ..... .....	accaccaaggcaca	tgccgatggattca	acgcttttgcct



	530	540	550	560
amylovora_ATT49946	cgcccaatctgccc	cccttgctggaagcggg	tatccata	t
amylovora_CFBP1430	cgcccaatctgccc	cccttgctggaagcggg	tatccata	t
pyrifoliae_Ep1/96	cgcccaatctgccc	cccttgctggaagcggg	tatccata	t
tasmaniensis_Et1/99	cgcccaatctgccc	cccttgctggaagcggg	tatccata	t
bilingiae_Eb661	caccgaatctggc	cccttgctggaagcggg	tatccata	t
	570	580	590	600
amylovora_ATT49946	tgcgacgtctcaata	cccttccggccccctg	ctggcgatgga	
amylovora_CFBP1430	tgcgacgtctcaata	cccttccggccccctg	ctggcgatgga	
pyrifoliae_Ep1/96	tgcgacgtctcaata	cccttccggccccctg	ctggcgatgga	
tasmaniensis_Et1/99	ccgcccgcctgaac	accgctccctgcccc	aacgggtgggggt	
bilingiae_Eb661	tgcgacgtctcaata	cccttccggccccctg	ctggcgatgga	
	610	620	630	640
amylovora_ATT49946	gcattgggtgggtt	caaccctatc	acccccgcagccga	tcgggg
amylovora_CFBP1430	gcattgggtgggtt	caaccctatc	acccccgcagccga	tcgggg
pyrifoliae_Ep1/96	gaattgggtgggtt	caaccctatc	acccccgcagccga	tcgggg
tasmaniensis_Et1/99	gagcttgggtgggtt	caaccctatc	acccccgcagccga	tcgggg
bilingiae_Eb661	gaattaatcgttca	accgattacccctc	agccgatcgggtg	
	650	660	670	680
amylovora_ATT49946	tcggttaccctctat	cccgggtatttc	ggccgaagtgggtgcg	
amylovora_CFBP1430	tcggttaccctctat	cccgggtatttc	ggccgaagtgggtgcg	
pyrifoliae_Ep1/96	tcggttaccctctat	cccgggtatttc	ggccgaagtgggtgcg	
tasmaniensis_Et1/99	tcggttaccctctat	cccgggtatttc	ggccgaagtgggtgcg	
bilingiae_Eb661	tagtcaccatctat	cccgggtatttc	ctcggacgtgggtcag	
	690	700	710	720
amylovora_ATT49946	taattttcttcagc	agccgggttaaagcgc	tgatccttgcgc	
amylovora_CFBP1430	taattttcttcagc	agccgggttaaagcgc	tgatccttgcgc	
pyrifoliae_Ep1/96	caattttcttcagc	agccgggttaaagcgc	tgatccttgcgc	
tasmaniensis_Et1/99	aaattttcttcagc	agccgggttaaagcgc	tgatccttgcgc	
bilingiae_Eb661	caaatttcttcagc	agccgggttaaagcgc	tgatccttgcgc	
	730	740	750	760
amylovora_ATT49946	tcttatggcgctggg	taatgcccgcagaa	taaagcgtttc	
amylovora_CFBP1430	tcttatggcgctggg	taatgcccgcagaa	taaagcgtttc	
pyrifoliae_Ep1/96	tcttatggcgctggg	taatgcccgcagaa	taaagcgtttc	
tasmaniensis_Et1/99	tcttatggcgctggg	taatgcccgcagaa	taaagcgtttc	
bilingiae_Eb661	tcttatggcgctggg	taatgcccgcagaa	cccggcctttc	
	770	780	790	800
amylovora_ATT49946	ttcaggagctgtgtg	acgcccaccggcg	ggcatttggtggt	
amylovora_CFBP1430	ttcaggagctgtgtg	acgcccaccggcg	ggcatttggtggt	
pyrifoliae_Ep1/96	ttcaggagctgtgtg	acgcccaccggcg	ggcatttggtggt	
tasmaniensis_Et1/99	ttcaggagctgtgtg	acgcccaccggcg	ggcatttggtggt	
bilingiae_Eb661	tgaagagctgtgtg	acgcccaccggcg	ggcatttggtggt	
	810	820	830	840

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
amylovora_ATT49946	ggtgaatctgactcagtgatctccggtaaagtcaataatg
amylovora_CFBP1430	ggtgaatctgactcagtgatctccggtaaagtcaataatg
pyrifoliae_Ep1/96	ggtgaatctgaccagtgatctccggcaaagtgcaataatg
tasmaniensis_Et1/99	ggtcaatctcaccagtgatctccggtaaagtgcaataatg
bilingiae_Eb661	ggtaaaactgacgcagtgatctccggtaaagtgcaataatg
	850 860 870 880
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
amylovora_ATT49946	ggcggttacgccaccggaaaagcgttggcgcatgcagggtg
amylovora_CFBP1430	ggcggttacgccaccggaaaagcgttggcgcatgcagggtg
pyrifoliae_Ep1/96	ggcggttacgccaccggaaaagcgttggcgcatgcagggtg
tasmaniensis_Et1/99	ggaggctacgccaccgggaatgcgctggcgcatgcggggc
bilingiae_Eb661	ggcggttacgccaccaggcaatgcgctggcgctggcggggtg
	890 900 910 920
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
amylovora_ATT49946	tggtgagcggcgagatctgaccgttgaagccacgctgac
amylovora_CFBP1430	tggtgagcggcgagatctgaccgttgaagccacgctgac
pyrifoliae_Ep1/96	tggtgagcggcgagatctgaccgttgaagccacgctgac
tasmaniensis_Et1/99	tggtgagcggagccgatttaaccgtcgaagctacgctgac
bilingiae_Eb661	tgatcagtggttatgatttaaccggtggaagcgacgctgac
	930 940 950 960
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
amylovora_ATT49946	caagctgcactacctgctgagccaggatctgaccagcga
amylovora_CFBP1430	caagctgcactacctgctgagccaggatctgaccagcga
pyrifoliae_Ep1/96	caagctgcactacctgctgagccaggatctgaccagcga
tasmaniensis_Et1/99	caagctgcattatctgctgagccaggatctgaccagcga
bilingiae_Eb661	caagctgcacttacctgctcagccagaacctctccagtgat
	970 980 990 1000
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
amylovora_ATT49946	gaaatccgccagctgatgaagcaaaaatttgcgcggcggaac
amylovora_CFBP1430	gaaatccgccagctgatgaagcaaaaatttgcgcggcggaac
pyrifoliae_Ep1/96	gaaatccgccagctgatgaagcaaaaatttgcgcggcggaac
tasmaniensis_Et1/99	gaaatccgccagctgatgaagcaaaaatttgcgcggcggaac
bilingiae_Eb661	gaggctgcggcgactgatgcagctcaatctgcgcggctgaac
	1010 1020
	..... ..... ..... .....
amylovora_ATT49946	tgaccccgactga
amylovora_CFBP1430	tgaccccgactga
pyrifoliae_Ep1/96	tgaccccgactga
tasmaniensis_Et1/99	taacccctgactga
bilingiae_Eb661	tgactcctgacgagaagtga

Keterangan : 24 nukleotida bagian muka digunakan untuk mendesain primer *forward*. 24 nukleotida bagian belakang digunakan untuk mendesain primer *reverse*..

[Sumber: CLUSTALW [www.genome.jp](http://www.genome.jp), Bioedit]

Tabel 4.3 Primer *Erwinia* sp.

No	Sekuens	Tm(°C)	GC(%)	µg
1	Erw-asp-f1 5'-ATG CAA CTC TCA TTY ATC GCY CGC ACC-3'	67,6	51,9	195,3
2	Erw-asp-r1 5'-CTA CTG CTC GAA ATA GST RCG3'	61,6	50	195,6
3	Erw-asp-f2 5'-ATG CAA AAG AAA TCY ATT TAC GTY GC-3'	59,9	34,6	259
4	Erw-asp-r2 5'-TCA RTC MGG GGT YAR YTC GCC RCG-3'	69,7	62,5	248,3

Keterangan :

R: A/G                      M: A/C                      W: A/T  
H: A/T/C                    V: G/A/C                    D: G/A/T  
Y: C/T                        K: G/T                        S: G/C  
B: G/T/C                    N: A/G/C/T

[Sumber: *First Base sequencing service* (Genetika Science)]

Tabel 4.4 Primer *Bacillus sp.*

No	Sekuens	Tm(°C)	GC(%)	µg
1	Bacasp-nde-f1 5'-ATG AAA AAR TTA YTG MTG TTR ACM ACY G-3'	60,2	32,1	161,8
2	Basasp-nsi-r1 5'-CTA CAK KAY DAY RTC WGD DAT YGG	62,3	44,4	222,5

Keterangan :

R: A/G                      M: A/C                      W: A/T  
H: A/T/C                    V: G/A/C                    D: G/A/T  
Y: C/T                        K: G/T                        S: G/C  
B: G/T/C                    N: A/G/C/T

[Sumber: *First Base sequencing service* (Genetika Science)]

Tabel 4.5 Hasil BLAST nukleotida hasil sekuens *Erwinia raphontici*.

Description	Query coverage	Max Ident
<i>Erwinia tasmaniensis</i> strain ET1/99 complete chromosome	100 %	82%
<i>Erwinia bilingiae</i> strain Eb661 complete chromosome	93%	80%
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Atroseptica</i> SCRI1043, complete genome	98%	73%

[Sumber: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]

Tabel 4.6 Hasil BLAST nukleotida hasil sekuens *Bacillus circulans*.

Description	Query coverage	Max ident
-------------	----------------	-----------

Bacillus subtilis BSn5, complete genome	99%	99%
Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 complete genome	99%	98%
Bacillus megaterium QM B1551, complete genome	92%	71%

[Sumber: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]



## Lampiran 1: Cara pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Dapar Tris EDTA (TE)	Sebanyak 1 ml tris-HCl 1,0 M (pH 8) dan 0,2 ml EDTA 0,5 M (pH 8) dilarutkan dalam aquabidestilata steril hingga 100 ml. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
2.	Lisozim 10 mg/ml	Sebanyak 10 mg lisozim dilarutkan dalam 1 ml tris-HCl 10 mM, pH 8. Larutan disimpan dalam <i>freezer</i> .
3.	Tris HCl pH 8 1 M	Sebanyak 12,1 g <i>tris-base</i> ditimbang dan ditambahkan HCl hingga volume 100 ml kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
4.	Tris-base 1 M	Sebanyak 22,228 g <i>tris-base</i> dilarutkan dalam aquabidestilata steril hingga tepat 200 ml. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
5.	STEP	SDS 10 %, tris-HCl 1 M, dan EDTA 0,5 M masing-masing sebanyak 2,5 ml; 2,5 ml; 20 ml dicampurkan dan ditambahkan aquabidestilata steril hingga volume 50 ml kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
6.	Sodium Dodesil Sulfat (SDS)	Sebanyak 10 g sodium dodesil sulfat dilarutkan dalam aquabidestilata steril hingga tepat 100 ml
7.	Proteinase K 25	Sebanyak 25 ml proteinase K dilarutkan dalam 1 ml

	mg/ml	aquabidestilata steril sambil divortex. Larutan disimpan dalam <i>freezer</i> .
8.	Na asetat 3 N	Sebanyak 23,124 g Na asetat ditambahkan aquabidestilata steril hingga volume 100 ml.
9.	<i>Loading dye</i>	Dicampurkan gliserol 30 % sebanyak 0,6 ml, brom fenol biru sebanyak 0,005 g, sian xilenol sebanyak 0,005 g dan ditambahkan aquabidestila steril hingga volume 2 ml. Dihomogenkan dengan divortex.
10.	Marker DNA	Dicampurkan <i>loading dye</i> 6x sebanyak 10 µl, stok <i>marker</i> DNA sebanyak 12 µl dan ditambahkan aquabidestilata hingga 60 µl.
11.	Etidium Bromida (EtBr)	Sebanyak 50 µl stok EtBr ditambahkan dengan aquabidestilata sebanyak 500 ml.
12.	Dapar Transformasi (TB)	PIPES, CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O, KCl masing-masing sebanyak 1,5 g; 1,1 g; 9,3 g dilarutkan dalam aquabidestilata steril sebanyak 450 ml dan diatur pH dengan HCl hingga 6,7. Kemudian ditambahkan MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O sebanyak 5,45 g dan ditambahkan aquabidestilata steril hingga volume 500 ml. Larutan disterilisasi menggunakan filter.
13.	IPTG	Sebanyak 23,8 mg IPTG dilarutkan dalam aquabidestilata steril sebanyak 1 ml kemudian tube dilapisi dengan aluminium foil.
14.	X-Gal	Sebanyak 40 mg X-gal dilarutkan dalam DMSO sebanyak 1 ml kemudian tube dilapisi dengan aluminium foil.
15.	Ampisilin	Sebanyak 100 mg ampisilin dilarutkan dalam 1 ml

		aquabidestilata steril, kemudian tube dilapisi alumunium foil.
16.	Larutan I (Isolasi plasmid)	Sebanyak 2,5 ml glukosa 2M; 2 ml EDTA 0,5 M; 2,5 ml tris HCl 1 M ditambahkan dengan aquabidestilata hingga 100 ml. Disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Larutan I disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C.
17.	Larutan II (Isolasi plasmid)	Sebanyak 150 µl NaOH 2 N, 150 µl SDS 10 % ditambahkan dengan aquabidestilata steril hingga volume 1,5 ml. Larutan II dibuat sebelum melakukan reaksi.
18.	Larutan III (Isolasi plasmid)	Sebanyak 60 ml kalium aseetat; 11,5 ml asam asetat glasial, ditambahkan dengan aquabidestilata 28,5 ml. Disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Larutan I disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C.

#### Lampiran 2 : Komposisi PCR

##### Genom *Erwinia nimipressuralis* , primer *forward* dan *reverse*

a.	10 x dapar dengan Mg <sup>2+</sup>	2,5 µl
b.	dNTP 10 mM promega	0,5 µl
c.	10 µM primer <i>forward</i>	1 µl
d.	10 µM primer <i>reverse</i>	1 µl
e.	Genom <i>Erwinia nimipressuralis</i>	1 µl
f.	KAPA Taq (5 U/µl)	0,1 µl
g.	ddH <sub>2</sub> O	18,9 µl

Total	25	μl
-------	----	----

Genom *Erwinia cypripedii*, primer *forward* dan *reverse*

a.	10 x dapar dengan Mg <sup>2+</sup>	2,5	μl
b.	dNTP 10 mM promega	0,5	μl
c.	10 μM primer <i>forward</i>	1	μl
d.	10 μM primer <i>reverse</i>	1	μl
e.	Genom <i>Erwinia cypripedii</i>	1	μl
f.	KAPA Taq (5 U/μl)	0,1	μl
g.	ddH <sub>2</sub> O	18,9	μl
Total		25	μl

Genom *Erwinia raphontici*, primer *forward* dan *reverse*

a.	10 x dapar dengan Mg <sup>2+</sup>	2,5	μl
b.	dNTP 10 mM promega	0,5	μl
c.	10 μM primer <i>forward</i>	1	μl
d.	10 μM primer <i>reverse</i>	1	μl
e.	Genom <i>Erwinia raphontici</i>	1	μl
f.	KAPA Taq (5 U/μl)	0,1	μl
g.	ddH <sub>2</sub> O	18,9	μl
Total		25	μl

Untuk melihat spesifitas, digunakan primer *forward* atau *reverse* saja pada masing-masing reaksi

a.	10 x dapar dengan Mg <sup>2+</sup>	2,5	μl
b.	dNTP 10 mM promega	0,5	μl
c.	10 μM primer <i>forward/reverse</i>	1	μl
d.	Genom <i>Erwinia sp</i>	1	μl
e.	KAPA Taq (5 U/μl)	0,1	μl
f.	ddH <sub>2</sub> O	19,9	μl
Total		25	μl

Untuk kontrol negatif, digunakan air steril sebagai pengganti genom



a.	10 x dapar dengan Mg <sup>2+</sup>	2,5 µl
b.	dNTP 10 mM promega	0,5 µl
c.	10 µM primer <i>forward</i>	1 µl
d.	10 µM primer <i>reverse</i>	1 µl
e.	ddH <sub>2</sub> O	1 µl
f.	KAPA Taq (5 U/µl)	0,1 µl
g.	ddH <sub>2</sub> O	18,9 µl
h.	Total	25 µl

Untuk *Bacillus circulans*

Primer yang digunakan adalah primer yang sebelumnya telah dirancang.

Komposisi PCR

Genom *Bacillus circulans* , primer *forward* dan *reverse*

a.	10 x dapar dengan Mg <sup>2+</sup>	2,5 µl
b.	dNTP 10 mM promega	0,5 µl
c.	10 µM primer <i>forward</i>	1 µl
d.	10 µM primer <i>reverse</i>	1 µl
e.	Genom <i>Bacillus circulans</i>	1 µl
f.	KAPA Taq (5 U/µl)	0,1 µl
g.	ddH <sub>2</sub> O	18,9 µl
Total		25 µl

Untuk melihat spesifitas, digunakan primer *forward* atau *reverse* saja pada masing-masing reaksi

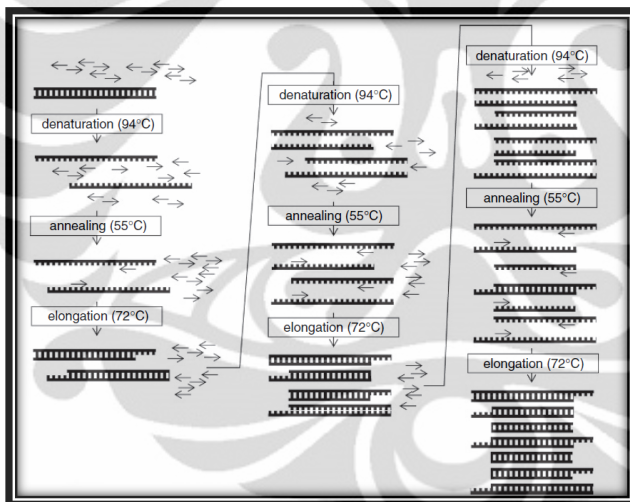
a.	10 x dapar dengan Mg <sup>2+</sup>	2,5 µl
b.	dNTP 10 mM promega	0,5 µl
c.	10 µM primer <i>forward/reverse</i>	1 µl
d.	Genom <i>Bacillus circulans</i>	1 µl
e.	KAPA Taq (5 U/µl)	0,1 µl
f.	ddH <sub>2</sub> O	19,9 µl

Total 25  $\mu$ l

Untuk kontrol negatif, digunakan air steril sebagai pengganti genom

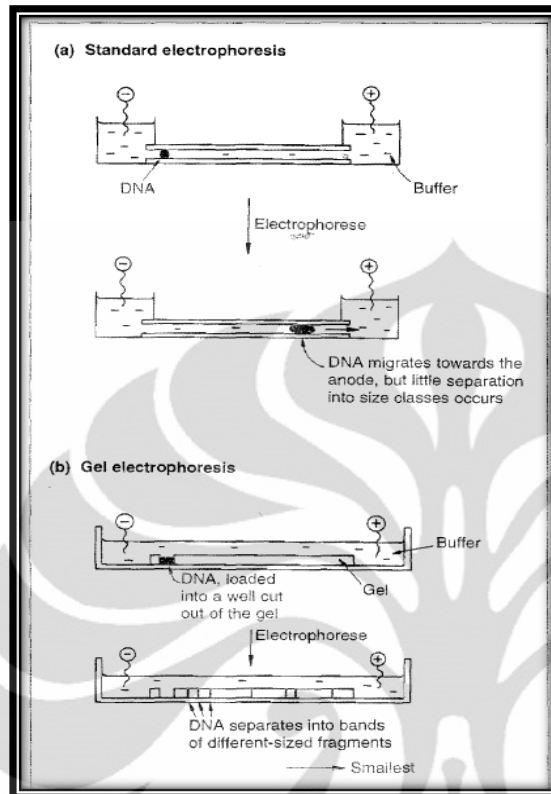
a.	10 x dapar dengan $Mg^{2+}$	2,5 $\mu$ l
b.	dNTP 10 mM promega	0,5 $\mu$ l
c.	10 $\mu$ M primer <i>forward</i>	1 $\mu$ l
d.	10 $\mu$ M primer <i>reverse</i>	1 $\mu$ l
e.	ddH <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l
f.	KAPA Taq (5 U/ $\mu$ l)	0,1 $\mu$ l
g.	ddH <sub>2</sub> O	18,9 $\mu$ l
h.	Total	25 $\mu$ l

### Lampiran 3 : Proses PCR



[Sumber: Moelhard, 2007]

## Lampiran 4 : Proses elektroforesis

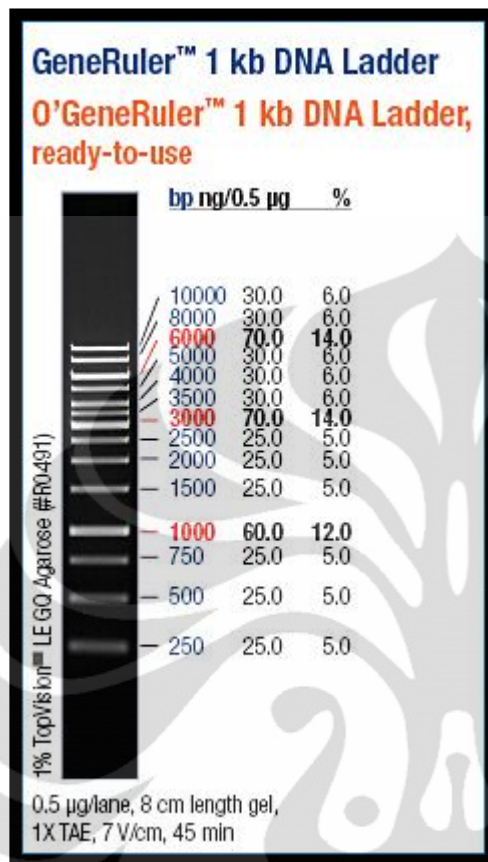


[Sumber: Brown, 2006]

## Lampiran 5 : Hubungan antara konsentrasi agarose dalam gel dengan pemisahan DNA linear

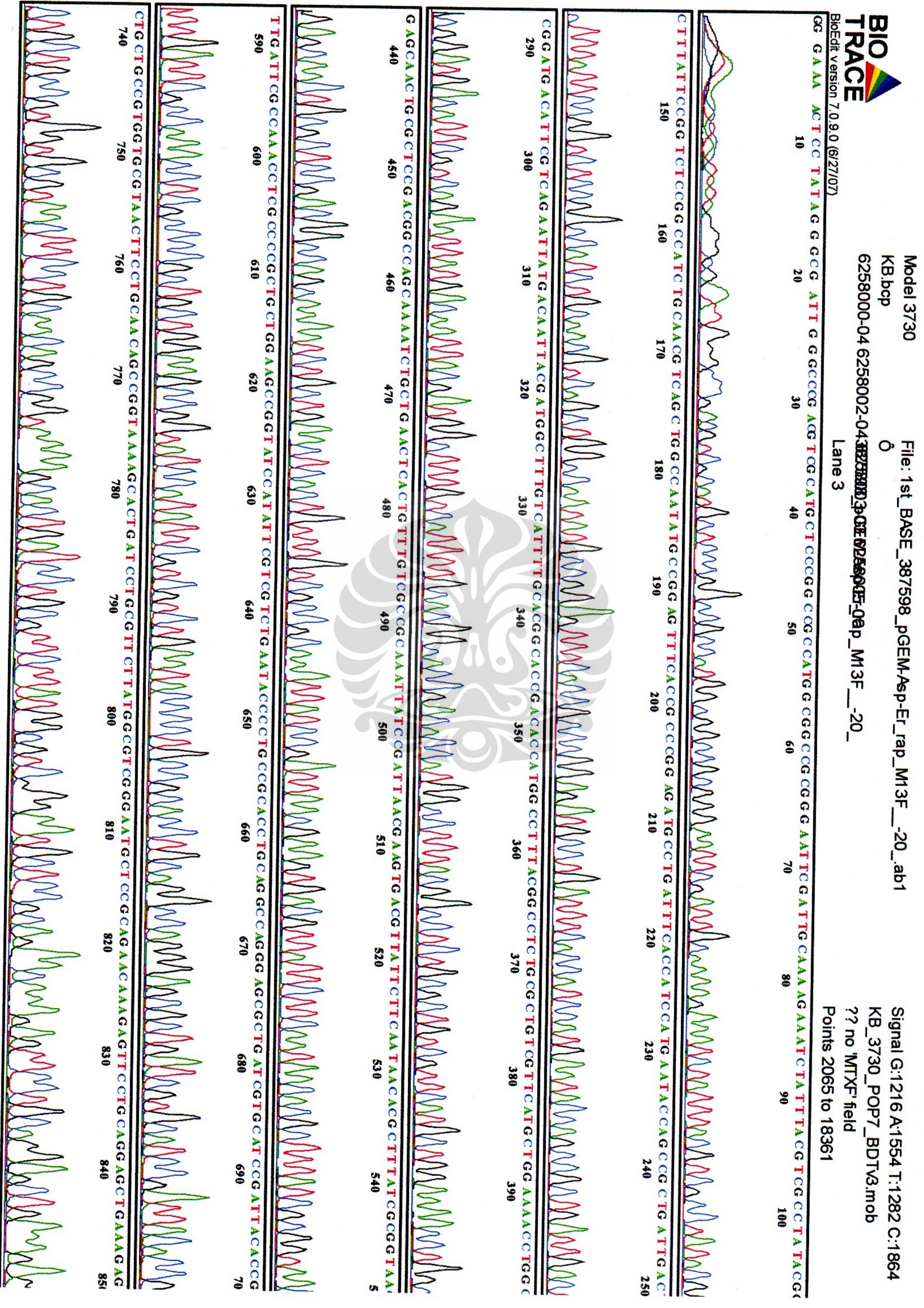
Konsentrasi agarose dalam gel (% w/v)	Pemisahan DNA linear (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

[Sumber: Sambrook & Russell, 2001]

Lampiran 6 : DNA *marker*

[Sumber: Protokol Fermentas]

Lampiran 7 : Kromatogram hasil sekuensing *Erwinia raphontici*



**BIO**  
**TRACE**

BioEdit version 7.0.9.0 (6/27/07)

Model 3730

KB.bcp

6258000-04 6258002-04

Lane 3

File: 1st\_BASE\_387598\_pGEM-Asp-Er\_rap\_M13F\_-20\_.ab1

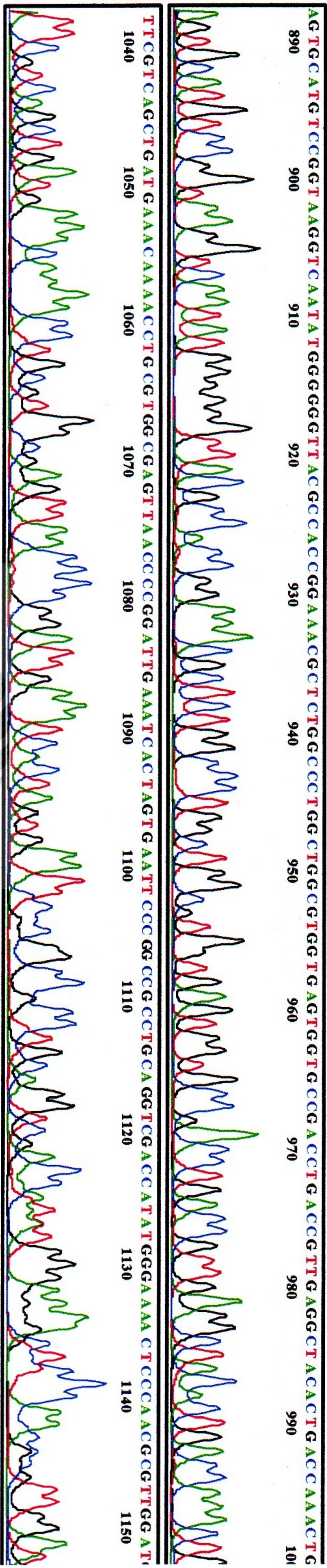
Q

Signal G:1216 A:1554 T:1282 C:1864

KB\_3730\_POP7\_BDTV3.mob

?? no 'MTXF' field

Points 2065 to 18361



Lampiran 8 : Kromatogram hasil sekuensing *Bacillus circulans*.

