



UNIVERSITAS INDONESIA

**SUBKLONING DAN EKSPRESI GEN L-ASPARAGINASE
DARI *BACILLUS CIRCULANS* KE *ESCHERICHIA COLI* DH5 α
DI BAWAH KONTROL PROMOTER *xyn* AQ1**

SKRIPSI

**ANNISA FAUZIAH
0806327143**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**SUBKLONING DAN EKSPRESI GEN L-ASPARAGINASE
DARI *BACILLUS CIRCULANS* KE *ESCHERICHIA COLI* DH5 α
DI BAWAH KONTROL PROMOTER *xyn* AQ1**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ANNISA FAUZIAH
0806327143**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Annisa Fauziah
NPM : 0806327143
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Subkloning dan Ekspresi Gen L-Asparaginase dari
Bacillus circulans ke *Escherichia coli* DH5α
di bawah Kontrol Promoter *xyn* AQ1

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Is Helianti, M.Sc (.....)
Pembimbing II : Dr. Abinawanto (.....)
Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc (.....)
Penguji II : Dr. Anom Bowolaksomo, M.Sc (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 20 Juni 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Annisa Fauziah

NPM : 0806327143

Tanda tangan : 

Tanggal : 20 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Is Helianti, M.Sc. dan Dr. Abinawanto, selaku Pembimbing I dan II yang senantiasa memberikan bimbingan, motivasi, saran, doa, dan dukungan, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Penguji I dan II, Dra. Setiorini, M.Kes. selaku Koordinator Seminar, dan Dra. Titi Soedjiarti, S.U selaku Ketua Sidang yang telah memberikan saran, dukungan, dan doa kepada penulis dalam penyusunan dan perbaikan skripsi ini.
3. Dr. Ariyanti Oetari, Ph.D selaku Pembimbing Akademik atas bimbingan dan saran yang sudah diberikan.
4. Dr.rer.nat Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, S.U selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI dan segenap staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI yang telah memberikan ilmu pengetahuan selama penulis menempuh pendidikan di Biologi. Terima kasih pula kepada Mba Asri, Ibu Ida, Ir. Rusmalina, Pak Taryana, Pak Taryono dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas segala bantuan yang telah diberikan.
5. Dr. Agus Masduki, M. Eng selaku direktur Pusat Teknologi Bioindustri (PTB) Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Serpong yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian di PTB BPPT

Serpong. Terima kasih kepada Dr. Niknik Nurhayati dan Dr. Astutiati Nurhasanah yang telah memberikan sambutan hangat dan bimbingan kepada penulis selama melakukan penelitian di PTB BPPT.

6. Mba Keis, Mba Mumu, Mba Lina, dan Kak Shafa yang dengan sabar memberikan bimbingan kepada penulis selama penelitian di Lab Galur. Teman-teman seperjuangan Nadia, Ahmad Nailul, Sinta, Tiara beserta jajaran peneliti dan karyawan di PTB BPPT Serpong yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis selama penelitian berlangsung.
7. Keluarga tercinta, Mamah dan Bapak serta Kakak-kakak yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, nasihat, dan motivasi, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
8. Seluruh teman-teman Laboratorium Genetika Biologi FMIPA UI (Ami, Maya, Refvi, Puji, Sintia, Awatif, Edys, Anas) atas dukungan dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi. Balqis, Dyfi, Winna dan Nisa (B D'WIN), sebagai inspirator dan motivator serta seluruh teman-teman Biologi 2008 (BIOSENTRIS) atas persahabatan dan dukungan yang telah diberikan.

Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun untuk perbaikan di masa depan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, Juni 2012

Penulis

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

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

Nama : Annisa Fauziah
NPM : 0806327143
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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 :

Subkloning dan Ekspresi Gen L-Asparaginase dari *Bacillus circulans* ke *Escherichia coli* DH5 α di bawah Kontrol Promoter *xyn* AQ1

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, 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 : 20 Juni 2012

Yang menyatakan



(Annisa Fauziah)

vii

ABSTRAK

Nama : Annisa Fauziah
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Subkloning dan Ekspresi Gen L-Asparaginase dari *Bacillus circulans* ke *Escherichia coli* DH5 α di bawah Kontrol Promoter *xyn* AQ1

Enzim L-asparaginase merupakan enzim yang menghidrolisis L-asparagin menjadi asam L-aspartat dan ammonia. Enzim tersebut berfungsi untuk kemoterapi penyakit *Acute Lymphoblastic Leukemia* (ALL). Penelitian bertujuan untuk melakukan subkloning dan ekspresi gen L-asparaginase yang berasal dari bakteri *Bacillus circulans* ke *Escherichia coli* DH5 α di bawah kontrol promoter *xyn* AQ1. Gen yang mengkode L-asparaginase dari *Bacillus circulans* yang digabungkan dengan promoter *xyn* AQ1 diamplifikasi dengan menggunakan metode *overlap* PCR. Produk PCR berhasil disubkloning ke vektor pGEM[®]-T Easy di dalam *E. coli* DH5 α . Hasil sekuensing menunjukkan bahwa gen sisipan memiliki persentase kemiripan sebesar 100 % dengan sekuen *B. subtilis strain* AQ1 endoxylanase glycosyl hydrolase family 11 (yang merupakan bagian promoter *xyn* AQ1) dan 99 % kemiripan dengan gen L-asparaginase dari *B. subtilis* BSn5. Aktivitas enzim L-asparaginase dari *E. coli* yang mengandung plasmid dengan promoter *xyn* AQ1 dan *open reading frame* (ORF) L-asparaginase dari *B. circulans* lebih tinggi daripada plasmid yang hanya mengandung ORF L-asparaginase dari *B. circulans*.

Kata kunci : *Bacillus circulans*, gen L-asparaginase, *overlap* PCR, pGEM[®]-T Easy, promoter *xyn* AQ1

xiii+109 halaman ; 26 gambar; 23 lampiran; 3 tabel

Daftar referensi : 82 (1976--2012)

ABSTRACT

Name : Annisa Fauziah
Study Program : Regular Biology S1
Title : Subcloning and Gene Expression of L-Asparaginase from *Bacillus circulans* into *Escherichia coli* DH5 α under The Control of *xyn* AQ1 Promoter

L-Asparaginase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia. It has important role in treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). The purpose of this research is to subclone the encoding gene of L-asparaginase and to express this gene in *Escherichia coli* DH5 α under the control of *xyn* AQ1 promoter. The gene encoding for L-asparaginase from *Bacillus circulans* combined with *xyn* AQ1 promoter have been amplified using overlap PCR. The PCR product successfully subcloned into pGEM[®]-T Easy vector in *E. coli* DH5 α . The sequencing results showed that the insert had 100% homology with sequence of *B. subtilis strain* AQ1 endoxylanase glycosyl hydrolase family 11 (part of *xyn* AQ1 promoter) and 99 % homology with L-asparaginase gene from *B. subtilis* BSn5. The activity of L-asparaginase enzyme from *E. coli* containing plasmid with *xyn* AQ1 promoter and L-asparaginase *open reading frame* (ORF) from *B. circulans* was higher than plasmid with L-asparaginase ORF from *B. circulans* only.

Keywords : *Bacillus circulans*, L-asparaginase gene, overlap PCR, pGEM[®]- T Easy, *xyn* AQ1 promoter

xii+109 pages ; 23 appendixes; 26 pictures; 3 tables

Bibliography : 82 (1976--2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUTAN	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Enzim L-Asparaginase	5
2.1.1 Klasifikasi Enzim L-Asparaginase	6
2.1.2 Sumber Enzim L-Asparaginase.....	6
2.2 Ekspresi Gen pada Prokariot	7
2.2.1 Sistem Operon	8
2.2.2 Promoter	8
2.3 Subkloning	10
2.3.1 Komponen-Komponen Subkloning	10
2.3.1.1 Sumber DNA.....	10
2.3.1.2 Vektor.....	10
2.3.1.3 Enzim Restriksi Endonuklease.....	12
2.3.1.4 Enzim Ligase.....	13
2.3.1.5 Sel Inang	13
2.3.2 Tahapan Subkloning	14
2.3.2.1 Isolasi DNA Plasmid.....	14
2.3.2.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	14
2.3.2.3 <i>Overlap PCR</i>	15
2.3.2.4 Digesti	16
2.3.2.5 Ligasi.....	16
2.3.2.6 Transformasi	17
2.3.2.7 <i>Screening</i>	18
2.4 Spektrofotometri	20
2.5 Elektroforesis	20
2.6 Sekuensing	21
2.7 Pengukuran Kadar Protein	22
2.8 Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase	23
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	24
3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian.....	24

3.2	Alat	24
3.3	Bahan	25
3.3.1	Sampel.....	25
3.3.2	Primer.....	25
3.3.3	Bahan Kimia	25
3.4	Skema Kerja Penelitian.....	27
3.5	Cara Kerja	28
3.5.1	Pembuatan <i>Buffer</i> dan Medium	28
3.5.2	Isolasi Plasmid pGEM [®] - T Easy <i>Asp</i> Klon 2.2.....	28
3.5.3	Konfirmasi Digesti Plasmid pGEM [®] - T Easy <i>Asp</i> Klon 2.2 dengan Enzim Restriksi <i>EcoRI</i>	29
3.5.4	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	29
3.5.4.1	Amplifikasi Gen L-Asparaginase.....	29
3.5.4.2	Amplifikasi Promoter <i>xyn</i> AQ1	30
3.5.4.3	<i>Overlap</i> PCR.....	31
3.5.5	Elektroforesis Gel Agarosa	31
3.5.6	Purifikasi Gel Hasil <i>Overlap</i> PCR	32
3.5.7	Pengukuran Konsentrasi DNA.....	33
3.5.8	<i>A-Tailing</i>	33
3.5.9	Ligasi Gen L-Asparaginase AQ1 ke dalam Vektor pGEM [®] - T Easy	33
3.5.10	Pembuatan Sel Kompeten (<i>E. coli</i> DH5 α).....	33
3.5.11	Transformasi Hasil Ligasi ke dalam Sel Kompeten <i>E. coli</i> DH5 α	34
3.5.12	Isolasi Plasmid Rekombinan.....	35
3.5.13	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR.....	35
3.5.14	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Enzim Restriksi ..	35
3.5.15	Purifikasi Plasmid Rekombinan Klon Positif untuk Sekuensing	35
3.5.16	Sekuensing dan Analisis Sekuen dengan Bioinformatika...	35
3.5.17	Produksi Enzim L-Asparaginase.....	36
3.5.18	Pengukuran Kadar Protein Enzim L-Asparaginase	37
3.5.19	Pengukuran Aktivitas Enzim L-Asparaginase	38
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1	Hasil	40
4.1.1	Isolasi Plasmid pGEM [®] - T Easy <i>Asp</i> Klon 2.2.....	40
4.1.2	Verifikasi Digesti Hasil Isolasi Plasmid pGEM [®] -T Easy <i>Asp</i> Klon 2.2.....	41
4.1.3	Amplifikasi Promoter <i>xyn</i> AQ1	42
4.1.4	Amplifikasi Gen L-Asparaginase.....	42
4.1.5	<i>Overlap</i> PCR	44
4.1.6	<i>A-Tailing</i> Dan Ligasi Gen L-Asparaginase AQ1 dengan Plasmid pGEM [®] -T Easy.....	47
4.1.7	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> DH5 α	47
4.1.8	Isolasi Plasmid Rekombinan Hasil Transformasi.....	48
4.1.9	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Teknik PCR	49
4.1.10	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Teknik Digesti	50

4.1.11	Sekuensing dan Analisis Sekuen dengan Bioinformatika...	52
4.1.12	Konstruksi Plasmid Rekombinan	53
4.1.13	Produksi Enzim L-Asparaginase Rekombinan.....	54
4.1.14	Pengukuran Kadar Protein.....	54
4.1.15	Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase secara Kuantitatif	55
4.2.15.1	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L- Asparaginase pGEM <i>Asp</i> klon 2.2 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1.....	55
4.2.15.2	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase pUC 19 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1 ...	56
4.2	Pembahasan.....	57
4.2.1	Isolasi Plasmid pGEM [®] -T Easy <i>Asp</i> Klon 2.2	57
4.2.2	Amplifikasi Promoter <i>xyn</i> AQ1	59
4.2.3	Amplifikasi Gen L-Asparaginase	60
4.2.4	<i>Overlap</i> PCR	61
4.2.5	Pengukuran Konsentrasi DNA	64
4.2.6	Ligasi Gen L-Asparaginase dan Vektor pGEM [®] -T Easy....	64
4.2.7	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> DH5 α	65
4.2.8	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Teknik PCR	66
4.2.9	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Teknik Digesti	67
4.2.10	Sekuensing dan Analisis Sekuen dengan Bioinformatika ...	68
4.2.11	Produksi Enzim L-Asparaginase Rekombinan.....	69
4.2.12	Pengukuran Kadar Protein.....	71
4.2.13	Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase Secara Kuantitatif	72
4.2.13.1	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L- Asparaginase pGEM <i>Asp</i> klon 2.2 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1.....	72
4.2.13.2	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase pUC 19 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1 ...	73
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	77
5.1	Kesimpulan	77
5.2	Saran.....	77
	DAFTAR REFERENSI.....	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mekanisme Kerja Enzim L-Asparaginase	5
Gambar 2.2	Struktur Gen Prokariot.....	7
Gambar 2.3.1.2	Vektor pGEM [®] -T Easy.....	12
Gambar 2.3.2.3	Mekanisme <i>Overlap</i> PCR.....	16
Gambar 2.3.2.6	Mekanisme Transformasi	18
Gambar 2.3.2.7	Mekanisme Resistensi terhadap Antibiotik Ampisilin .	19
Gambar 3.4	Skema Kerja Penelitian	27
Gambar 4.1.1	Visualisasi Hasil Isolasi Plasmid pGEM [®] -T Easy <i>Asp</i> Klon 2.2	40
Gambar 4.1.2	Visualisasi Hasil Digesti Plasmid pGEM [®] - T Easy <i>Asp</i> Klon 2.2	41
Gambar 4.1.3	Visualisasi Hasil PCR Promoter <i>xyn</i> AQ1	42
Gambar 4.1.4(1)	Visualisasi Hasil PCR Gen L-Asparaginase.....	43
Gambar 4.1.4(2)	Visualisasi Hasil Purifikasi PCR Gen L-Asparaginase	44
Gambar 4.1.5(1)	Visualisasi Hasil <i>Overlap</i> PCR.....	45
Gambar 4.1.5(2)	Visualisasi Hasil Purifikasi Gel <i>Overlap</i> PCR	46
Gambar 4.1.5(3)	Perbandingan Hasil PCR Gen L-Asparaginase dan <i>Overlap</i> PCR.....	46
Gambar 4.1.7	Hasil Transformasi	48
Gambar 4.1.8	Visualisasi Hasil Isolasi Plasmid pGEM [®] -T Easy <i>Asp</i> AQ1	49
Gambar 4.1.9	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Menggunakan Teknik PCR	50
Gambar 4.1.10(1)	Verifikasi Digesti dengan Enzim <i>Eco</i> RI	51
Gambar 4.1.10(2)	Verifikasi Digesti dengan Enzim <i>Nde</i> I.....	51
Gambar 4.1.12(1)	Konstruksi Plasmid Rekombinan pGEM [®] - T Easy <i>Asp</i> AQ1	53
Gambar 4.1.15.1	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari pGEM <i>Asp</i> klon 2.2 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1.....	55
Gambar 4.1.15(1)	Aktivitas Enzim L-Asparaginase Hasil Sonikasi.....	56
Gambar 4.1.15(2)	Aktivitas Enzim L-Asparaginase Hasil Panen Sel.....	57
Gambar 4.2.4	Skema <i>Overlap</i> PCR.....	64
Gambar 4.2.9	Orientasi <i>Insert</i> terhadap Vektor	69

DAFTAR TABEL

Tabel 4.2.2	Sekuen Primer untuk Amplifikasi Promoter <i>xyn</i> AQ1 .	60
Tabel 4.2.3	Sekuen Primer untuk Amplifikasi Gen L-Asparaginase	61
Tabel 4.2.4	Sekuen Primer untuk <i>Overlap</i> PCR.....	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Komposisi dan Cara Pembuatan Medium dan <i>Buffer</i> ..	85
Lampiran 2	Komposisi Reaksi PCR untuk Amplifikasi Promoter <i>xyn</i> AQ1	88
Lampiran 3	Program PCR untuk Amplifikasi Promoter <i>xyn</i> AQ1...	88
Lampiran 3	Komposisi Reaksi PCR untuk Amplifikasi Gen L-Asparaginase	89
Lampiran 4	Program PCR Untuk Amplifikasi Gen L-Asparaginase	
Lampiran 6	Komposisi Reaksi <i>Overlap</i> PCR	90
Lampiran 7	Program <i>Overlap</i> PCR	90
Lampiran 8	Komposisi Reaksi <i>A-Tailing</i>	91
Lampiran 9	Komposisi Reaksi Ligasi Vektor pGEM [®] -T Easy dan Gen L-Asparaginase AQ1	91
Lampiran 10	Komposisi Reaksi Konfirmasi Digesti Menggunakan Enzim <i>EcoRI</i>	92
Lampiran 11	Komposisi Reaksi Konfirmasi Digesti Menggunakan Enzim <i>NdeI</i>	92
Lampiran 12	Perhitungan Efisiensi Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> DH5 α	93
Lampiran 13	Hasil Sekuensing Gen L-Asparaginase AQ1 dari <i>B. circulans</i>	94
Lampiran 14	Hasil <i>Blastn</i> Gen L-Asparaginase AQ1 dari <i>B. circulans</i>	97
Lampiran 15	Hasil <i>Blastx</i> Gen L-Asparaginase AQ1 dari <i>B. circulans</i>	99
Lampiran 16	Hasil <i>Alignment</i> pGEM <i>Asp</i> AQ1	101
Lampiran 17	Kurva Standar BSA untuk Protein Standar	104
Lampiran 18	Kurva Standar BSA untuk Mikroprotein	104
Lampiran 19	Kurva Standar Asparagin	105
Lampiran 20	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari Supernatan pGEM <i>Asp</i> Klon 2.2 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1	106
Lampiran 21	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari Sonikasi pGEM <i>Asp</i> Klon 2.2 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1 ...	107
Lampiran 22	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari Supernatan pUC 19 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1	108
Lampiran 23	Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari Sonikasi pUC 19 dan pGEM <i>Asp</i> AQ1	109

BAB 1 PENDAHULUAN

Leukemia merupakan bentuk malignansi yang mempengaruhi pembentukan darah pada sumsum tulang. Leukemia terbagi menjadi leukemia mieloid, yaitu sel kanker yang berkembang dari *stem cell* mieloid dan leukemia limfoblastik, yaitu sel kanker yang berkembang dari *stem cell* limfosit, yang pada keadaan normal akan berkembang menjadi sel darah putih (leukosit). Leukemia dapat bersifat akut jika berkembang dari *stem cell* yang belum matang, sedangkan leukemia yang berasal dari *stem cell* yang sudah matang bersifat kronis (Horner & Ries 2008: 243). Prevalensi leukemia di Indonesia pada tahun 2008, yaitu 5,2 kasus per 100.000 penduduk (WHO 2010: 1). Salah satu jenis leukemia yang paling banyak diderita oleh anak-anak, yaitu *Acute Lymphoblastic Leukemia* (ALL). Penyakit ALL disebabkan karena sel darah putih yang belum matang dihasilkan dalam jumlah yang berlebihan di sumsum tulang (Jain *dkk.* 2012: 29). Prevalensi leukemia pada anak di Indonesia, yaitu 2.5 sampai dengan 4.0 kasus baru per 100 000 penduduk. Insiden tersebut meningkat menjadi 2000 sampai 3200 kasus ALL setiap tahun (Mostert *dkk.* 2006: e1601).

Salah satu agen antineoplastik yang digunakan dalam kemoterapi ALL adalah enzim L-asparaginase (Moorthy *dkk.* 2010: 1862). Enzim L-asparaginase (L-asparagin amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) adalah enzim yang menghidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan ammonia (El-Bessoumy *dkk.* 2004: 387). Sel leukemia memerlukan L-asparagin untuk pertumbuhannya. Oleh karena itu, kemoterapi dengan menggunakan enzim L-asparaginase secara intravena dapat menyebabkan sel malignan gagal menyelesaikan sintesis proteinnya. Hal tersebut disebabkan karena konsentrasi L-asparagin dalam darah berkurang (Sunitha *dkk.* 2010: 298), sehingga mengakibatkan kehancuran sel atau apoptosis pada sel malignan (Youssef & Al-Omair 2008: 338).

Enzim L-asparaginase dapat ditemukan pada sel hewan, tanaman, *yeast*, fungi, dan bakteri (Sunitha *dkk.* 2010: 298). Namun, mikroorganisme merupakan sumber yang lebih baik untuk produksi enzim L-asparaginase karena mudah

dikultur, dapat diekstraksi dan dipurifikasi lebih baik, sehingga memungkinkan produksi dalam skala besar (Savitri *dkk.* 2003: 184). Enzim L-asparaginase yang telah banyak digunakan secara komersial, yaitu berasal dari bakteri *Escherichia coli* dan *Erwinia chrysanthemi* (Pieters *dkk.* 2008: 4832). Akan tetapi, enzim L-asparaginase yang berasal dari *E. coli* dan *E. chrysanthemi* memiliki keterbatasan, yaitu dapat menimbulkan respons imunologis. Enzim L-asparaginase yang berasal dari *E. coli* dan *E. chrysanthemi* dapat menyebabkan reaksi hipersensitifitas pada penggunaan jangka panjang, reaksi alergi, dan anafilaksis. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk mendapatkan sumber alternatif enzim L-asparaginase untuk mengurangi reaksi alergi (Ebrahiminezhad *dkk.* 2011: 307).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Prakasham *dkk.* (2010: 79) menunjukkan bahwa produksi enzim L-asparaginase yang berasal dari *Bacillus circulans* efektif dan memiliki aktivitas antineoplastik yang baik. Hal tersebut mengindikasikan bahwa enzim L-asparaginase yang berasal dari *B. circulans* potensial untuk produksi di bidang industri. Produksi enzim L-asparaginase untuk kemoterapi pada penyakit ALL belum diproduksi di Indonesia, sehingga masih dilakukan penggunaan produksi enzim L-asparaginase dari luar negeri. Hal tersebut mendorong Laboratorium Teknologi Bioindustri BPPT untuk mengembangkan produksi enzim L-asparaginase yang berasal dari *strain* bakteri lain melalui teknik DNA rekombinan.

Proses ekspresi gen asing di dalam sel inang seperti *E. coli* memerlukan adanya suatu promotor yang biasanya terdapat dalam suatu vektor ekspresi (Brown 1991: 221--223). Promotor tersebut berperan dalam mengenali RNA polimerase *E. coli* untuk memulai terjadinya transkripsi dan translasi gen asing sehingga akan dihasilkan protein rekombinan yang diinginkan (Yuwono 2005: 138). Penelitian Helianti *dkk.* (2010: 9) menunjukkan bahwa promotor *xyn* AQ1 adalah promotor yang kuat untuk mengekspresikan enzim endoxylanase ekstraselular pada *E. coli*, sehingga produksi enzim tersebut lebih mudah. Promotor *xyn* AQ1 tersebut digunakan untuk ekspresi gen endoxylanase yang berasal dari *B. subtilis* di *E. coli*. Penggunaan promotor *xyn* AQ1 akan dicoba

untuk diaplikasikan pada enzim L-asparaginase, sehingga diharapkan dapat menghasilkan enzim rekombinan dalam jumlah yang lebih banyak.

Pengklonaan gen L-asparaginase yang berasal dari bakteri *B. circulans* telah berhasil dilakukan dengan vektor pGEM[®]-T Easy di dalam sel inang *E. coli* DH5 α (Aprigiyonies 2011: 42). Penelitian tersebut juga berhasil melakukan sekuensing dari gen pengkode L-asparaginase yang berasal dari *B. circulans*. *Open reading frame* (ORF) dari gen yang mengkode L-asparaginase tersebut berukuran 987 bp. Namun permasalahannya, belum dilakukan pengujian penambahan promoter *xyn* AQ1 terhadap ekspresi gen L-asparaginase pada sel inang *E. coli* DH5 α . Oleh karena itu, perlu diketahui pengaruh dari promoter *xyn* AQ1 terhadap aktivitas enzim L-asparaginase pada sel inang *E. coli* DH5 α .

Penggabungan promoter *xyn* AQ1 dan gen L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan metode *overlap* PCR untuk selanjutnya dilakukan subkloning ke vektor pGEM[®]-T Easy. Metode *overlap* PCR dapat digunakan untuk *site directed mutagenesis* atau untuk menghasilkan konstruksi gen rekombinan. Dua fragmen DNA yang berasal dari sumber yang berbeda dapat diamplifikasi dan digabungkan menjadi produk tunggal dengan pemanjangan primer yang memiliki ujung komplementer tanpa menggunakan situs enzim restriksi atau reaksi ligasi (Vallejo *dkk.* 1994: S123).

Vektor pGEM[®]-T Easy adalah vektor kloning TA yang sangat efisien digunakan dalam kloning karena gen sisipan hasil PCR hanya perlu ditambahkan basa adenin (A) pada ujungnya (*A-tailing*), sehingga dapat menempel pada daerah *T-overhangs* dari vektor. *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. Proses tersebut dapat langsung dilakukan tanpa melalui proses digesti dengan menggunakan enzim restriksi (Kobs 1997: 15; Frackman & Kephart 1999: 8).

Penelitian mengenai subkloning dan ekspresi gen L-asparaginase dari *B. circulans* ke *E. coli* DH5 α di bawah promoter *xyn* AQ1 belum pernah dilakukan. Penelitian bertujuan untuk melakukan subkloning dan mengetahui ekspresi gen L-asparaginase yang berasal dari bakteri *B. circulans* ke sel inang *E. coli* DH5 α di bawah kontrol promoter *xyn* AQ1. Hipotesis penelitian yaitu gen

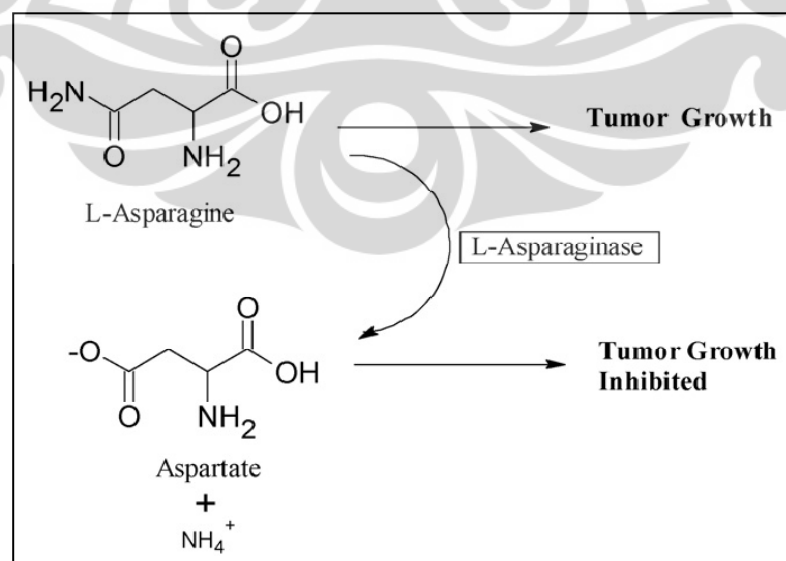
L-asparaginase dari *B. circulans* dapat disubkloning dan dieskpresikan di sel inang *E. coli* DH5 α dengan menggunakan vektor pGEM[®]-T Easy di bawah kontrol promoter *xyn* AQ1.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim L-Asparaginase

Enzim L-asparaginase (L-asparagin amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) adalah enzim yang menghidrolisis L-asparagin menjadi asam L-aspartat dan ammonia (El-Bessoumy *dkk.* 2004: 387). L-asparagin dihasilkan di dalam sel oleh enzim asparagin sintetase atau dapat diserap dari lingkungan luar, yaitu dari sumber makanan. Sel leukemia membutuhkan L-asparagin dalam jumlah banyak untuk menjaga pertumbuhan sel malignan. Oleh karena itu, kemoterapi dengan menggunakan enzim L-asparaginase dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia karena konsentrasi L-asparagin berkurang (Gambar 2.1). Sel leukemia memiliki sifat defisiensi terhadap aktivitas L-asparagin sintetase, sehingga mencegah kemampuan sel leukemia untuk mensintesis L-asparagin. Oleh karena itu, pertumbuhan sel leukemia sangat tergantung dari L-asparagin yang bersirkulasi di plasma darah (Manikandan *dkk.* 2010: 1). Hal tersebut berbeda dengan sel normal yang dapat menghasilkan L-asparagin dari L-asparagin sintetase untuk memenuhi kebutuhan metabolisme sel (Verma *dkk.* 2007: 46).



Gambar 2.1. Mekanisme kerja enzim L-asparaginase
[Sumber: Narta *dkk.* 2007: 210.]

2.1.1 Klasifikasi Enzim L-Asparaginase

Enzim L-asparaginase terdiri atas dua jenis, yaitu enzim L-asparaginase tipe I dan enzim L-asparaginase tipe II. Perbedaan utama antara enzim L-asparaginase tipe I dan enzim L-asparaginase tipe II adalah bentuk konformasi dan afinitas. Enzim L-asparaginase tipe I memiliki konformasi dimer dan memiliki afinitas yang rendah untuk menghasilkan L-asparagin serta bersifat konstitutif, sedangkan enzim L-asparaginase tipe II memiliki konformasi tetramer dengan 326 residu asam amino serta memiliki afinitas yang tinggi untuk menghasilkan L-asparagin. Enzim L-asparaginase tipe II disekresikan sebagai respon terhadap kekurangan nitrogen (Youssef & Al-Omair 2008: 337--338).

Enzim L-asparaginase tipe I dan tipe II juga dibedakan berdasarkan lokasi di dalam sel, solubilitas di dalam ammonium sulfat, sensitivitas terhadap inaktivasi suhu, kondisi untuk ekspresi, dan afinitas terhadap substrat L-asparagin. Enzim L-asparaginase tipe I merupakan enzim sitoplasmik, sedangkan enzim L-asparaginase tipe II bersifat periplasmik (Yano *dkk.* 2008: 711). Aktivitas enzim L-asparaginase tipe I optimal pada pH 6.8, sedangkan enzim L-asparaginase tipe II optimal pada pH 7.5--9 (Youssef & Al-Omair 2008: 347).

Genus *Bacillus* menghasilkan dua jenis L-asparaginase. Gen yang mengkode L-asparaginase tipe I yaitu gen *ansA*, sedangkan gen yang mengkode L-asparaginase tipe II yaitu gen *ansZ* (Ebrahiminezhad 2011: 311). *B. circulans* merupakan salah satu jenis bakteri Gram positif yang dapat menghasilkan enzim L-asparaginase (Prakasham *dkk.* 2010: 76). Sekuens asam amino *B. subtilis* *AnsA* mirip dengan sekuen L-asparaginase tipe I dari *E. coli* (EcAI), sedangkan L-asparaginase tipe II *AnsZ* mirip dengan sekuen L-asparaginase tipe II dari *E. coli* (EcAII) (Yano *dkk.* 2008: 712).

2.1.2 Sumber Enzim L-Asparaginase

Enzim L-asparaginase dapat dihasilkan dari serum marmut (Narta *dkk.* 2007: 208), tanaman (*Pisum sativum*) (Sieciechowicz *dkk.* 1985: 506; Cho *dkk.* 2007: 280), dan juga mikroorganisme seperti *yeast*, fungi, dan bakteri (Prakasham

dkk. 2010: 73; Sunitha *dkk.* 2010: 298). Beberapa jenis mikroorganisme yang dapat menghasilkan L-asparaginase, yaitu *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus* (Sarquis *dkk.* 2004: 399), *Erwinia carotovora* (Kotzia & Labrou 2005: 309), *E. coli* (Youssef & Al-Omair 2008: 337), *B. subtilis* (Yano *dkk.* 2008: 711), *Pseudomonas aeruginosa* (Moorthy *dkk.* 2010: 1862--1863), dan *B. circulans* (Prakasham *dkk.* 2010: 76).

2.2 Ekspresi Gen pada Prokariot

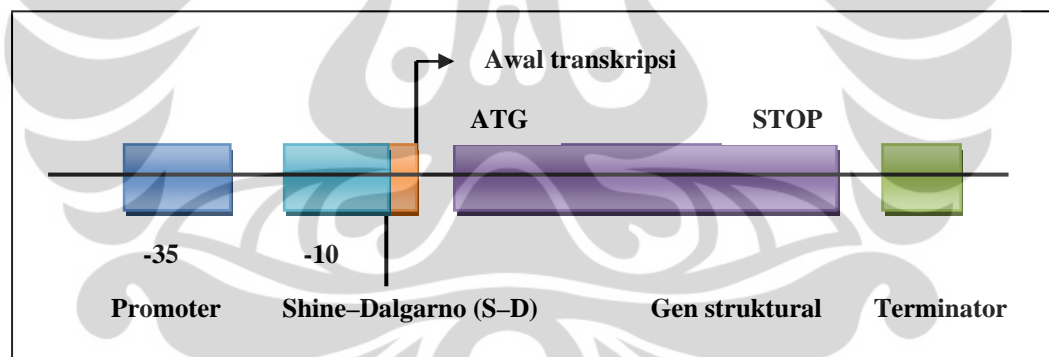
Ekspresi gen merupakan transfer informasi genetik dari DNA menjadi RNA (transkripsi) dan selanjutnya penerjemahan informasi genetik yang terdapat dalam RNA menjadi polipeptida (translasi) (Madigan *dkk.* 2009: 225). Transkripsi adalah proses yang mengawali ekspresi sifat-sifat genetik yang nantinya akan muncul sebagai fenotipe. Translasi hanya akan menerjemahkan mRNA menjadi asam amino-asam amino yang menyusun polipeptida, sedangkan rRNA dan tRNA tidak ditranslasi. Molekul mRNA merupakan transkrip (salinan) urutan DNA yang menyusun suatu gen dalam bentuk ORF (*open reading frame*) atau kerangka baca terbuka. Suatu ORF dicirikan oleh adanya kodon inisiasi translasi, yaitu urutan nukleotida ATG, terdapat serangkaian urutan nukleotida yang menyusun banyak kodon, dan terdapat kodon terminasi translasi yaitu TAA, TAG, atau TGA (Yuwono 2005: 134 & 211). Sistem ekspresi pada prokariot, misalnya bakteri *E. coli* banyak digunakan untuk industri dan produksi protein dalam bidang farmasi. Hal tersebut disebabkan *E. coli* memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat, telah dikarakterisasi dengan baik secara genetik, vektor kloning yang tersedia dalam jumlah banyak, dan *strain* sel inang mutan yang bervariasi (Walker & Raply 2009: 20).

2.2.1 Sistem Operon

Mekanisme dasar terhadap pengendalian ekspresi gen dalam prokariot dinamakan konsep operon, yaitu pengepresian gen struktural dengan menggunakan satu promoter yang sama. Gen utama yang berperan dalam konsep

operon ada dua tipe, yaitu gen struktural dan gen regulator. Gen struktural merupakan bagian yang berada di bagian hilir dari promoter dan mengandung urutan DNA spesifik yang akan ditranskripsi, sedangkan gen regulator berperan penting dalam mengatur proses ekspresi gen (Fairbanks & Andersen 1999: 218; Yuwono 2005: 134).

Gen regulator terdiri atas beberapa elemen utama, yaitu promoter, operator, dan terminator. Promoter adalah bagian gen yang berfungsi sebagai pengatur proses ekspresi genetik (transkripsi) bagian struktural. Bagian tersebut adalah bagian yang akan dikenali pertama kali oleh RNA polimerase dan protein regulator sebelum proses transkripsi (sintesis RNA dimulai). Bagian struktural adalah bagian gen yang membawa kode-kode genetik yang akan ditranskripsi dan kemudian ditranslasi. Bagian terminator adalah sekuen DNA yang terletak di sebelah hilir dari gen struktural dan berperan dalam memberikan sinyal terhadap RNA polimerase untuk menghentikan proses transkripsi (Gambar 2.2) (Yuwono 2005: 135).



Gambar 2.2. Struktur gen prokariot
[Sumber: Yuwono 2005: 138, telah diolah kembali.]

2.2.2 Promoter

Proses ekspresi gen asing dalam sel inang seperti *E. coli* memerlukan adanya suatu promoter yang biasanya terdapat dalam suatu vektor ekspresi. Promoter tersebut berperan dalam mengenali RNA polimerase *E. coli* untuk memulai terjadinya transkripsi dan translasi gen asing sehingga akan dihasilkan

protein rekombinan yang diinginkan (Brown 1991: 223). Promoter pada prokariot terdiri atas beberapa bagian penting yang sekuennya selalu ada (*conserved*) pada semua atau sebagian besar gen. Salah satu bagian penting promoter disebut sebagai kotak Pribnow (*Pribnow box*) pada urutan nukleotida posisi -10 dan posisi -35. Angka minus menyatakan letak suatu nukleotida di sebelah hulu dari titik awal transkripsi (pada posisi +1) dan tidak ditranskripsi (Yuwono 2005: 138).

Perubahan jarak antara kotak -35 dan -10 tersebut akan mengakibatkan perubahan aktivitas atau kekuatan promoter. Jarak optimum antara kedua kotak tersebut adalah 17 nukleotida. Urutan kotak Pribnow adalah TATAAT, sehingga kotak Pribnow sering disebut juga kotak TATA (*TATA box*). Kotak -10 dan -35 juga disebut sebagai elemen-elemen promoter inti. Kotak Pribnow merupakan daerah pada promoter yang berperan dalam mengarahkan enzim RNA polimerase sehingga arah transkripsinya adalah dari ujung 5' ke 3' seperti yang terjadi pada replikasi. Selain itu, daerah tersebut merupakan tempat pembukaan heliks DNA untuk membentuk kompleks promoter yang terbuka. Mutasi pada kotak Pribnow pada beberapa gen dapat menyebabkan penghambatan transkripsi (Yuwono 2005: 138--140). Sekuen lain yang sangat penting untuk proses translasi adalah sekuen Shine–Dalgarno (S–D). Sekuen tersebut terletak antara 5--10 basa nukleotida di bagian hulu dari kodon inisiasi, dengan urutan sekuen optimal 8 basa (Primrose *dkk.* 2001: 77). Tidak semua mRNA *E. coli* memiliki sekuen S-D yang sama, tetapi konsensusnya dapat diidentifikasi. Inisiasi translasi dapat berjalan optimal jika memiliki sekuen S-D UAAGGAGG (Walker & Raply 2009: 23). Situs S-D (Shine Dalgarno) pada *B. subtilis* memiliki urutan sekuen 5'AGGAGGT3' yang terletak antara posisi -6 dan -12 dari daerah hulu kodon inisiasi ATG (Ruller *dkk.* 2006: 12).

Promoter *xyn* AQ1 adalah promoter yang berasal dari *strain B. subtilis* xylanolitik. Promoter *xyn* AQ1 adalah promoter yang kuat untuk mengekspresikan enzim ekstraseluler dan digunakan untuk ekspresi gen endoxylanase yang berasal dari *B. subtilis* dan *E. coli*. Promoter *xyn* AQ1 menghasilkan ekspresi dari gen endoxylanase yang tinggi secara ekstraselular pada *E. coli*, sehingga produksi enzim tersebut lebih mudah. Promoter *xyn* AQ1 pada daerah hulu lebih pendek 9 bp daripada *B. subtilis* DB 104 yang merupakan derivat dari *B. subtilis strain*

168. Perbandingan antara rekombinan endoxylanase AQ1 menunjukkan terdapat perbedaan 10 asam amino, 4 asam amino adalah signal peptida, sedangkan 6 asam amino merupakan protein matang (Helianti *dkk.* 2010: 9--10).

2.3 Subkloning

Subkloning adalah suatu teknik pemindahan fragmen DNA dari satu vektor ke vektor lain. Hal tersebut bertujuan untuk mempelajari lebih lanjut mengenai DNA tersebut dan mendapatkan DNA sisipan yang diinginkan secara fungsional (Brooker 2005: 501). Subkloning bertujuan agar DNA rekombinan dapat diekspresikan pada sistem ekspresi sel inang yang digunakan, sehingga akan dihasilkan protein rekombinan (Wong 1997: 4). Teknik subkloning terdiri atas beberapa komponen, yaitu sumber DNA, enzim restriksi, enzim ligasi, vektor pengklonaan, dan sel inang (Simmons 2004: 1).

2.3.1 Komponen-komponen subkloning

2.3.1.1 Sumber DNA

Sumber DNA merupakan fragmen DNA atau gen yang ingin diperbanyak. Sumber DNA dapat berasal dari DNA kromosom suatu organisme dan juga dari mRNA yang dapat ditranskripsi balik menggunakan enzim *reverse transcriptase* sehingga menjadi komponen cDNA (*complementary DNA*) (Wong 1997: 140). Sumber DNA dapat juga berasal dari produk PCR atau hasil isolasi DNA yang dimanipulasi lebih lanjut dengan prosedur subkloning (Twyman 1998: 325).

2.3.1.2 Vektor

Vektor adalah pembawa gen yang akan diklona ke dalam sel inang. Vektor terdiri atas dua jenis, yaitu vektor kloning dan vektor ekspresi (Wong 1997: 4). Vektor kloning adalah vektor yang digunakan untuk memperbanyak atau mengkloning gen, sedangkan vektor yang memiliki daerah promoter disebut dengan vektor

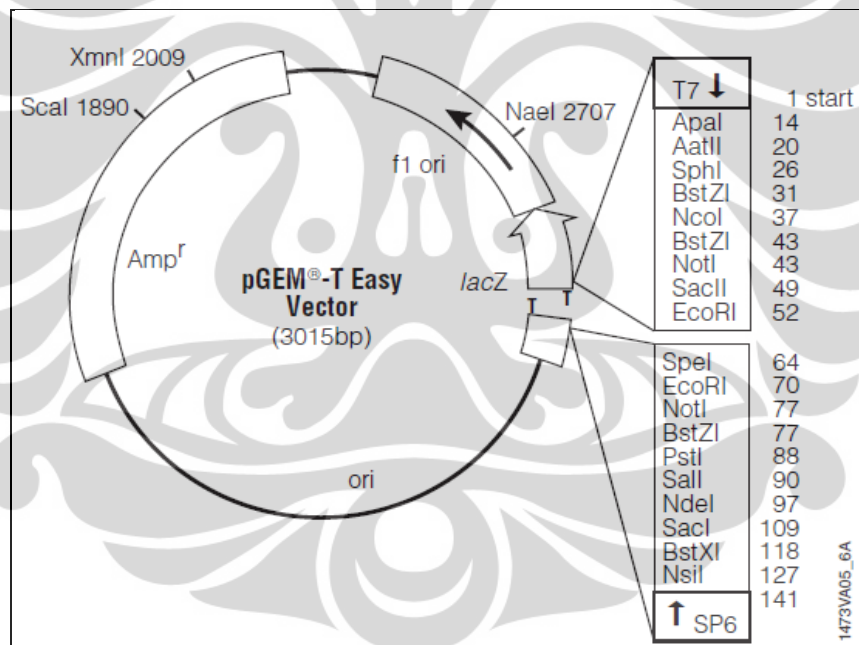
ekspresi. Vektor ekspresi merupakan vektor yang tidak hanya dapat bereplikasi sendiri, tetapi juga mengandung sinyal ekspresi, sehingga gen yang dikloning juga dapat ditranskripsi menjadi mRNA dan kemudian ditranslasi menjadi protein. Sinyal ekspresi yang penting antara lain promoter transkripsi, terminator transkripsi, dan tempat pengikatan ribosom (Brown 1987: 191).

Syarat suatu agen dapat dijadikan vektor pengklonaan, yaitu dapat bereplikasi dalam sel inang, memiliki *selectable marker*, misalnya gen resistensi antibiotik, memiliki situs *origin of replication* (ori) (Dale & Park 2004: 223), dan memiliki daerah promoter yang berfungsi sebagai situs pengenalan RNA polimerase untuk melakukan transkripsi. Vektor prokariot untuk pengklonaan dapat berupa plasmid atau bakteriofaga. Plasmid adalah molekul DNA ekstrakromosomal sirkular yang dapat bereplikasi secara autonom di dalam sel inang dan berukuran sekitar 2--4 kb (Snustad & Simmons 2003: 486--487). Plasmid dapat bereplikasi pada sel inang karena memiliki daerah pengenalan bagi DNA sisipan, yang disebut dengan sisi enzim restriksi atau disebut *Multiple Cloning Site* (MCS) (Brown 2006: 14).

Plasmid dapat diklasifikasikan berdasarkan angka penggandaan plasmid yang ditemukan pada sel inang, yang disebut dengan *copy number*. Hal tersebut bersifat spesifik bagi setiap plasmid (Alexander *dkk.* 2003: 245). Plasmid *low copy number* cenderung untuk mengontrol replikasi DNA, dengan replikasi DNA plasmid yang berhubungan dengan replikasi kromosom dari sel inang. Plasmid *high copy-number* disebut juga dengan *relaxed* plasmid, dengan replikasi DNA tidak tergantung pada DNA kromosomal sel inang (Nicholl 2008: 67).

Vektor pGEM[®]-T Easy merupakan plasmid linear yang mempunyai basa timin (T) menggantung (*overhang*) pada kedua ujungnya. Daerah *T-overhangs* pada situs pemasukan *insert* tersebut meningkatkan efisiensi ligasi untuk produk PCR karena mencegah terjadinya resirkulasi vektor sebelum penempelan gen sisipan. Gen sisipan yang merupakan hasil produk PCR hanya perlu dilakukan *A-tailing*, yaitu proses penambahan basa adenin (A) pada ujungnya agar dapat menempel pada daerah *T-overhangs* pada vektor pGEM[®]-T Easy tanpa harus memotong terlebih dahulu dengan menggunakan enzim restriksi (Kobs 1997: 15; Frackman & Kephart 1999: 8).

Keuntungan lain yang dimiliki oleh vektor pGEM[®]-T Easy dalam pengklonaan adalah tersediannya promotor T7 dan SP6 yang mengapit daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) yang di dalamnya terdapat gen *lacZ* yang menyandi enzim β -galaktosidase. Gen asing yang disisipkan pada daerah tersebut akan menginaktivasi pembentukan enzim β -galaktosidase, sehingga dapat dilakukan verifikasi hasil kloning dengan *blue white screening* atau penapiasan biru putih (Promega 2010: 2). Vektor pGEM[®]-T Easy juga memiliki situs pengikatan primer M13 *forward* dan *reverse* yang dapat digunakan pada saat proses sekuensing. Beberapa daerah kloning dari vektor pGEM[®]-T Easy diapit oleh sisi yang dikenal oleh enzim restriksi seperti *EcoRI*, *BstZI*, dan *NotI*. Hal tersebut akan mempermudah untuk verifikasi plasmid rekombinan digesti (Gambar 2.3.1.2). (Promega 2010: 2).



Gambar 2.3.1.2. Vektor pGEM[®]-T Easy
[Sumber: Promega 2010:11.]

2.3.1.3 Enzim Restriksi Endonuklease

Enzim restriksi endonuklease merupakan enzim yang memotong ikatan fosfodiester pada situs pengenalan spesifik dari DNA (Wong 1997: 69). Enzim

restriksi endonuklease memiliki situs pengenalan spesifik berjumlah 6--8 bp (Brooks *dkk.* 2001: 155). Enzim tersebut terdiri atas tipe I, II, dan tipe III. Enzim restriksi tipe II merupakan enzim yang sering digunakan dalam teknik rekayasa genetika karena memotong DNA pada situs pengenalan spesifik (Brown 1987: 53). Pemotongan dengan enzim restriksi menghasilkan dua macam ujung pemotongan, yaitu *sticky ends* dan *blunt ends*. Pemotongan *blunt end* memotong fragmen tepat pada tengah-tengah sekuen, sehingga akan menghasilkan ujung yang rata. Pemotongan tipe *sticky ends* memotong DNA tidak tepat pada daerah tengah DNA, sehingga menghasilkan ujung potongan DNA yang tidak rata atau kohesif (Weaver 2005: 65; Brown 2006: 60). Contoh enzim yang menghasilkan ujung kohesif, yaitu *EcoRI* dan *NdeI*. Enzim *EcoRI* merupakan enzim mengenali sekuen 5'GAATTC3', sedangkan enzim *NdeI* mengenali sekuen 5'CATATG3' (Wong 1997: 70).

2.3.1.4 Enzim Ligase

Proses ligasi atau penggabungan fragmen DNA memerlukan enzim ligase. Enzim tersebut memiliki peranan penting dalam teknologi DNA rekombinan, yaitu berfungsi untuk menghubungkan DNA target dan vektor pengklonaan (Dale & Park 2004: 222). Enzim DNA ligase berfungsi memperbaiki kerusakan yang terjadi pada salah satu untai DNA selama replikasi DNA. Hal tersebut dilakukan dengan membentuk ikatan fosfodiester antara ujung 3'OH dan ujung 5'P dari DNA (Sambrook & Russell 2001: A.431).

2.3.1.5 Sel Inang

Sel inang yang mampu dimasuki oleh vektor pengklonaan disebut sel kompeten. Sel kompeten dapat diperoleh dengan metode kimiawi, misalnya dengan menggunakan kalsium klorida (CaCl₂). Sel inang yang digunakan dalam subkloning dapat berasal dari bakteri Gram negatif seperti *E. coli* maupun dari bakteri Gram positif seperti *B. subtilis*. *E. coli* banyak digunakan dalam rekayasa genetika karena tingkat pertumbuhan yang cepat dan memiliki banyak *strain* yang

telah dikarakterisasi, misalnya *strain* DH5 α , DH1, BL21, JM105, JM83. *Strain* *E. coli* DH5 α digunakan sebagai sel inang karena memiliki gen *recA1* yang dapat meningkatkan stabilitas gen sisipan, sehingga dapat meningkatkan efisiensi transformasi. Hal tersebut menyebabkan DNA tidak akan berekombinasi dengan DNA sel inang (Karcher 1995: 94; Sambrook & Russell 2001: A.3.7).

2.3.2 Tahapan Subkloning

2.3.2.1 Isolasi DNA Plasmid

Isolasi plasmid merupakan metode pemisahan plasmid dari DNA kromosom, RNA, protein-protein, dan materi-materi kontaminan lainnya (Brown 1991: 31). Metode isolasi plasmid yang umum digunakan adalah dengan metode alkali lisis dengan SDS (Sambrook & Russell 2001: 1.16). Isolasi DNA plasmid terdiri atas tiga langkah utama, yaitu menumbuhkan kultur bakteri, memanen dan melisiskan sel bakteri, serta memurnikan DNA plasmid. Suspensi bakteri pada isolasi plasmid dengan metode alkali lisis akan dipapar dengan detergen anionik kuat dengan pH tinggi. Hal tersebut menyebabkan dinding sel terbuka, DNA kromosom dan protein terdenaturasi, sehingga DNA plasmid akan keluar dari sel dan berada di bagian supernatan (Sambrook & Russell 2001: 1.31).

2.3.2.2 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

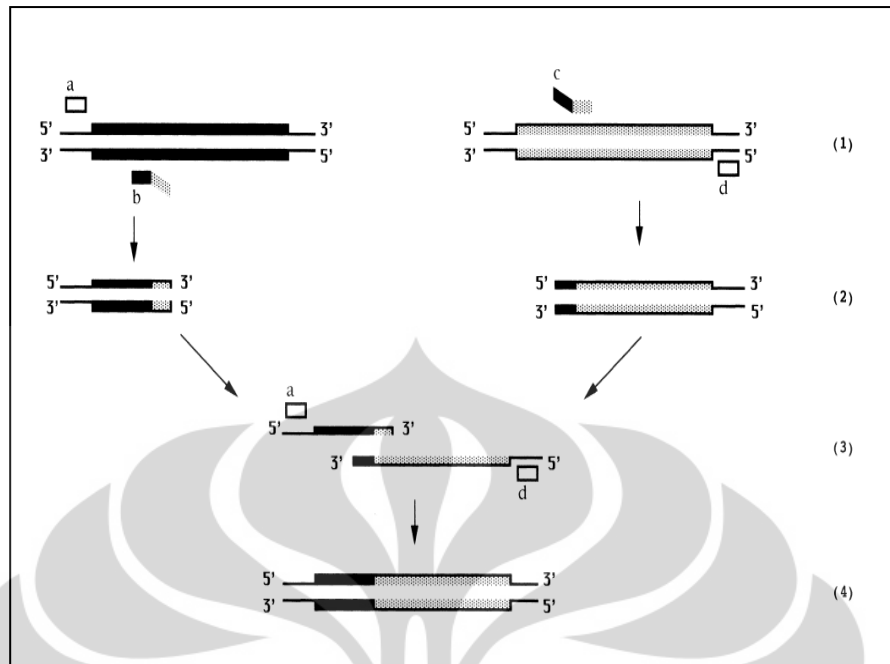
Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik biologi molekular yang digunakan untuk memperbanyak atau amplifikasi sekuens yang spesifik dari DNA (Wolfe 1993: 137). Proses PCR terdiri atas beberapa komponen penting, di antaranya DNA *template* sebagai fragmen DNA yang ingin diperbanyak, enzim DNA polimerase yang menyebabkan perpanjangan DNA *template*, sepasang primer yang mengakit DNA *template*, dan *deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs) yang membentuk basa komplemen pada DNA *template*. Proses tersebut juga membutuhkan kation divalen sebagai katalisator enzim DNA polimerase dan *buffer* yang diperlukan untuk mempertahankan kestabilan pH antara 8.3--8.8

selama PCR, serta ddH₂O sebagai pelarut (Sambrook & Russell 2001: 8.4--8.5).

Siklus PCR terdiri atas beberapa tahapan utama, yaitu denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi. *Template* DNA untai ganda didenaturasi pada suhu yang ditentukan oleh kandungan G+C. Proporsi dari G+C yang tinggi dan suhu yang tinggi merupakan syarat pemisahan untai ganda pada *template* DNA (Starr & Taggart 1992: 249). *Annealing* merupakan proses penempelan oligonukleotida primer pada untai DNA *template*. Proses optimum *annealing* ditentukan oleh *melting temperature* (T_m). Suhu *annealing* harus berkisar 4--5°C dibawah suhu *melting* (Hartl & Jones 2005: 66). Polimerisasi atau elongasi merupakan proses pemanjangan oligonukleotida primer. Pemanjangan dari oligonukleotida primer dilakukan pada suhu optimal untuk sintesis DNA yang dikatalis oleh enzim polimerase yang termostabil. Proses tersebut dilakukan pada suhu antara 72°C--78°C (Brock 1994: 265).

2.3.2.3 *Overlap* PCR

Overlap PCR merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk melakukan *site directed mutagenesis* atau untuk menghasilkan konstruksi gen rekombinan. Dua fragmen DNA yang berasal dari sumber yang berbeda dapat diamplifikasi dan digabungkan menjadi produk tunggal dengan pemanjangan primer yang memiliki ujung komplemen tanpa menggunakan situs enzim restriksi atau reaksi ligasi (Higuchi *dkk.* 1988: 7366; Vallejo *dkk.* 1994: S123). Cara yang dilakukan untuk melakukan *overlap* PCR, yaitu dengan membuat primer yang di dalamnya terdapat daerah *overlap* antara satu *template* dengan *template* yang lain. Primer yang digunakan untuk *overlap* PCR terdiri atas empat jenis primer yang berbeda, yaitu primer A dan B yang digunakan untuk mengamplifikasi *template* pertama serta primer C dan D digunakan untuk mengamplifikasi *template* kedua. Primer B dan C mengandung daerah yang *overlap* dari kedua *template* tersebut. Penggabungan kedua *template* DNA yang berbeda dengan metode *overlap* PCR dilakukan dengan menggunakan primer A (primer *forward*) dan D (primer *forward*) (Gambar 2.3.2.3).



Gambar 2.3.2.3. Mekanisme *overlap* PCR
[Sumber: Warren *dkk.* 1997: 30.]

2.3.2.4 Digesti

Digesti merupakan merupakan teknik pemotongan untai DNA dengan menggunakan bantuan enzim restriksi (Campbell *dkk.* 2002: 390). Enzim restriksi adalah enzim yang memotong molekul DNA pada situs yang spesifik (Dale & Park 2004: 127). Situs restriksi dari seluruh enzim restriksi berbentuk simetris. Urutan basa dari 5'--3' pada untai DNA satu sama dengan urutan basa dari 5' ke 3' pada untai komplementernya. Situs pengenalan enzim restriksi tersebut merupakan susunan 4--6 basa nukleotida yang disebut sebagai palindrom. Palindrom merupakan situs yang dikenali oleh banyak enzim restriksi. Palindrom mempunyai basa-basa nitrogen yang sama bila di baca ke kiri dan ke kanan (Russell 1994: 286--287; Campbell *dkk.* 2002: 390).

2.3.2.5 Ligasi

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

reaksi tersebut adalah enzim ligase (Brown 2006: 57). Proses ligasi berlangsung optimal pada suhu 14°C--16°C selama 1 jam atau lebih. Proses ligasi berjalan cepat ketika terdapat *overhang* pada vektor kloning dan DNA sisipan. Oleh karena itu, *sticky end* dapat meningkatkan efisiensi ligasi (Brown 2006: 78--80).

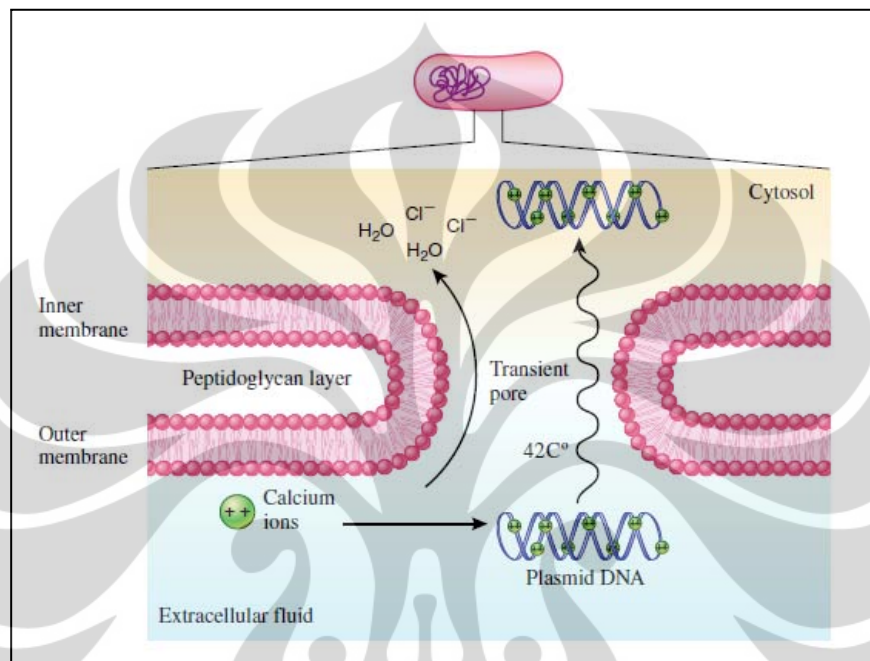
Ligasi dengan menggunakan vektor TA dilakukan dengan aktivitas ujung transferase pada beberapa tipe DNA polimerase, misalnya *Taq* DNA polimerase. Enzim tersebut menambahkan ujung tunggal 3'-A *overhang* pada masing-masing produk PCR. Sebagai hasilnya, produk PCR tersebut dapat secara langsung dikloning ke vektor linear yang memiliki basa tunggal 3'-T-*overhangs* pada masing-masing ujungnya (Karcher 1995: 52).

2.3.2.6 Transformasi

Transformasi merupakan proses memasukkan DNA yang berasal dari lingkungan sekitar ke dalam sel bakteri. Molekul DNA rekombinan dapat melakukan proses transformasi dengan diintroduksi ke dalam suatu sel inang. Sel inang yang mampu dimasuki oleh vektor pengklonaan disebut sel kompeten, yaitu bakteri yang telah diberi perlakuan fisika atau kimia untuk meningkatkan kemampuannya dalam menerima DNA rekombinan (Brown 2006: 90). Proses transformasi dapat dilakukan dengan metode *heat shock* atau pemberian kejutan panas pada suhu 38°C--42°C. Teknik transformasi dapat juga dilakukan dengan perlakuan fisik menggunakan metode elektroporasi. Metode tersebut menggunakan induksi muatan listrik untuk membentuk pori-pori pada membran sel, sehingga memudahkan DNA masuk ke dalam sel inang (Sambrook *dkk.* 1989: 1.25--1.26; Weaver 2005: 19).

Beberapa bakteri seperti *Streptococcus pneumoniae* secara alami dapat bersifat kompeten untuk dimasuki DNA. Akan tetapi, bakteri jenis lain seperti *E. coli*, harus diberikan perlakuan khusus supaya bersifat kompeten untuk transformasi. *E. coli* dapat dibuat kompeten dengan mensuspensikan sel di dalam *calcium chloride* (CaCl₂). Membran sel bakteri permeabel terhadap ion klorida, tetapi nonpermeabel terhadap ion kalsium. DNA plasmid yang bermuatan negatif akan berasosiasi dengan ion kalsium, sedangkan ion klorida dan air akan masuk

ke dalam sel. Hal tersebut menyebabkan DNA plasmid akan mengembang dengan mudah dan menjadi menyerap. Jika sel diberi perlakuan *heat-shocked* pada suhu 42°C selama 2 menit, molekul DNA yang bebas seperti plasmid akan masuk ke dalam sel bakteri melalui pori sementara (Gambar 2.3.2.6) (Alexander *dkk.* 2003: 254--255).



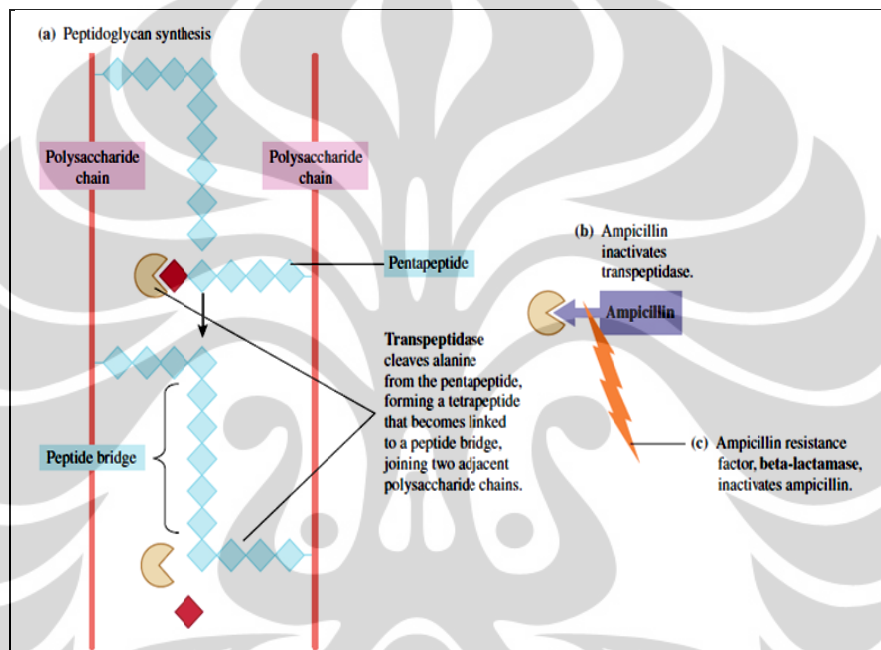
Gambar 2.3.2.6. Mekanisme transformasi
[Sumber: Alexander *dkk.* 2003: 255.]

2.3.2.7 Screening

Identifikasi koloni bakteri yang mengandung DNA rekombinan dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu analisis dengan menggunakan seleksi antibiotik, α -complementation, dan analisis restriksi (Wong 2006: 96--97). Metode seleksi antibiotik dilakukan pada vektor pengklonaan yang memiliki gen resistensi terhadap suatu antibiotik tertentu. Klon pembawa DNA rekombinan akan tumbuh pada medium yang mengandung antibiotik tersebut (Sambrook & Russell 2001: 1.148).

Uji sensitivitas dan resistensi terhadap antibiotik dapat dilakukan apabila vektor pengklonaan membawa sedikitnya satu gen penyebab resistensi terhadap

antibiotik pada sel inang, misalnya ampisilin (amp^r). Antibiotik ampisilin akan menghambat sintesis peptidoglikan. Antibiotik tersebut mengandung cincin beta-lactam yang berikatan secara *irreversibel* dengan enzim pada bakteri, yaitu transpeptidase yang menghambat tahapan kunci dalam sintesis peptidoglikan. *Ampicillin resistance factor* akan menginaktivasi ampisilin melalui β -lactamase. Hal tersebut dilakukan dengan menghancurkan cincin β -lactam (Gambar 2.3.2.7) (Alexander *dkk.* 2003: 256).



Gambar 2.3.2.7. Mekanisme resistensi terhadap antibiotik ampisilin [Sumber: Alexander *dkk.* 2003: 255.]

Seleksi biru putih atau α -komplementasi terjadi ketika dua fragmen yang inaktif bersatu membentuk enzim β -galaktosidase yang fungsional. Enzim β -galaktosidase menghidrolisis laktosa menjadi glukosa. Aktivitas enzim tersebut dapat diuji dengan menggunakan senyawa 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktosidase (X-gal) yang menghasilkan warna biru pada medium. Enzim tersebut dihasilkan oleh gen *lacZ* pada MCS vektor pengklonaan. Isopropil-1-tio- β -galaktosidase (IPTG) juga digunakan sebagai *inducer* untuk menonaktifkan represor *lacZ*. Bakteri yang mengandung plasmid rekombinan tidak menghasilkan enzim β -galaktosidase sehingga pada medium akan berwarna putih,

sedangkan bakteri yang tidak mengandung vektor rekombinan tetap menghasilkan enzim β -galaktosidase yang dapat memecah senyawa X-gal, sehingga koloni akan berwarna biru (Sambrook & Russell 2001: 1.149--1.150).

2.4 Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah metode yang berfungsi untuk menghitung intensitas cahaya yang berasal dari objek tertentu. Prinsip kerja dari spektrofotometer, yaitu mengukur nilai absorpsi atau cahaya yang diserap dan cahaya yang dilewati suatu objek dari sumber cahaya. Spektrofotometer dapat menguraikan cahaya putih menjadi spektrum warna dengan panjang gelombang tertentu. Pengukuran konsentrasi suatu zat terlarut di dalam larutan dapat dilakukan dengan penyinaran secara langsung menggunakan spektrum cahaya spesifik dengan panjang gelombang tertentu (Vodopich & Moore 2005: 67).

Spektrofotometri dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA (Brown 2006: 37). Perbandingan rasio absorpsi antara panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dapat digunakan untuk mengukur kemurnian DNA. Rasio A_{260}/A_{280} antara 1,8--2,0 menunjukkan karakter DNA yang murni. Rasio di atas 2,0 menunjukkan terjadinya kontaminasi sampel dengan RNA, sedangkan rasio di bawah 1,8 menunjukkan kontaminasi sampel dengan protein (Sambrook & Russell 2001: A8.20).

2.5 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA, RNA, dan protein yang bermuatan dalam sebuah medan listrik (Fairbanks & Andersen 1999: 278). Prinsip kerja elektroforesis, yaitu 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: 5.2).

Faktor yang mempengaruhi elektroforesis, yaitu ukuran molekul dari DNA, pori-pori gel, konformasi DNA, adanya etidium bromida (EtBr), voltase, konsentrasi dari agarosa, tipe dari agarosa, dan *buffer* elektroforesis (Sambrook & Russell 2001: 5.5--5.7). Fragmen DNA hasil gel elektroforesis dapat dilihat dengan bantuan sinar UV serta menggunakan etidium bromida sebagai senyawa yang akan berpendar jika terpapar sinar UV. Zat warna etidium bromida merupakan agen interkalasi yang dapat menyisip di antara pasangan basa dari DNA untai ganda (Sambrook & Russell 2001: 1.151). Ukuran molekul DNA dapat diketahui dengan cara membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi *marker* pada gel yang digunakan untuk elektroforesis (Ausubel *dkk.* 2003: 2.5.A.7).

2.6 Sekuensing

Teknik DNA sekuensing merupakan metode yang digunakan untuk menentukan sekuen nukleotida dalam molekul DNA (Passarge 2007: 62). Teknik DNA sekuensing terdiri atas metode Maxam-Gilbert, metode Sanger, dan metode *automated DNA sequencing*. Metode Maxam-Gilbert berbasis pada modifikasi zat kimia dari DNA dan pembelahan pada basa-basa spesifik. Metode tersebut membutuhkan pelabelan radioaktif pada salah satu ujung fragmen DNA (Ghatak 2011: 566).

Metode Sanger mensintesis DNA dari DNA *template* menggunakan deoksinukleotida (dNTP) dan dideoksinukleotida (ddNTP) yang akan menghasilkan untai DNA dalam berbagai ukuran akibat terminasi sintesis DNA pada nukleotida spesifik (Cheng & Zhang 2008: 106). Perbedaan antara metode Sanger dan Maxam Gilbert, yaitu metode Maxam-Gilbert menggunakan reaksi kimia yang berfungsi untuk memotong DNA pada situs yang berbeda, sedangkan metode Sanger melibatkan pemanjangan primer secara enzimatik (Wolfe 1995: 143--145). Prinsip kerja metode Sanger adalah proses penghentian sintesis DNA pada basa tertentu dengan menggunakan ddNTP (Passagre 2007: 2). *Automated DNA sequencing* dilakukan berdasarkan metode Sanger dengan menggunakan mesin otomatis. Perbedaan dengan metode Sanger, yaitu tidak digunakan primer

yang diberi label radioaktif, tetapi diberi label dengan menggunakan pewarna *fluorescent* yang berbeda (Griffin & Griffin 1993: 4--5; Fairbanks & Andersen 1999: 287).

2.7 Pengukuran Kadar Protein

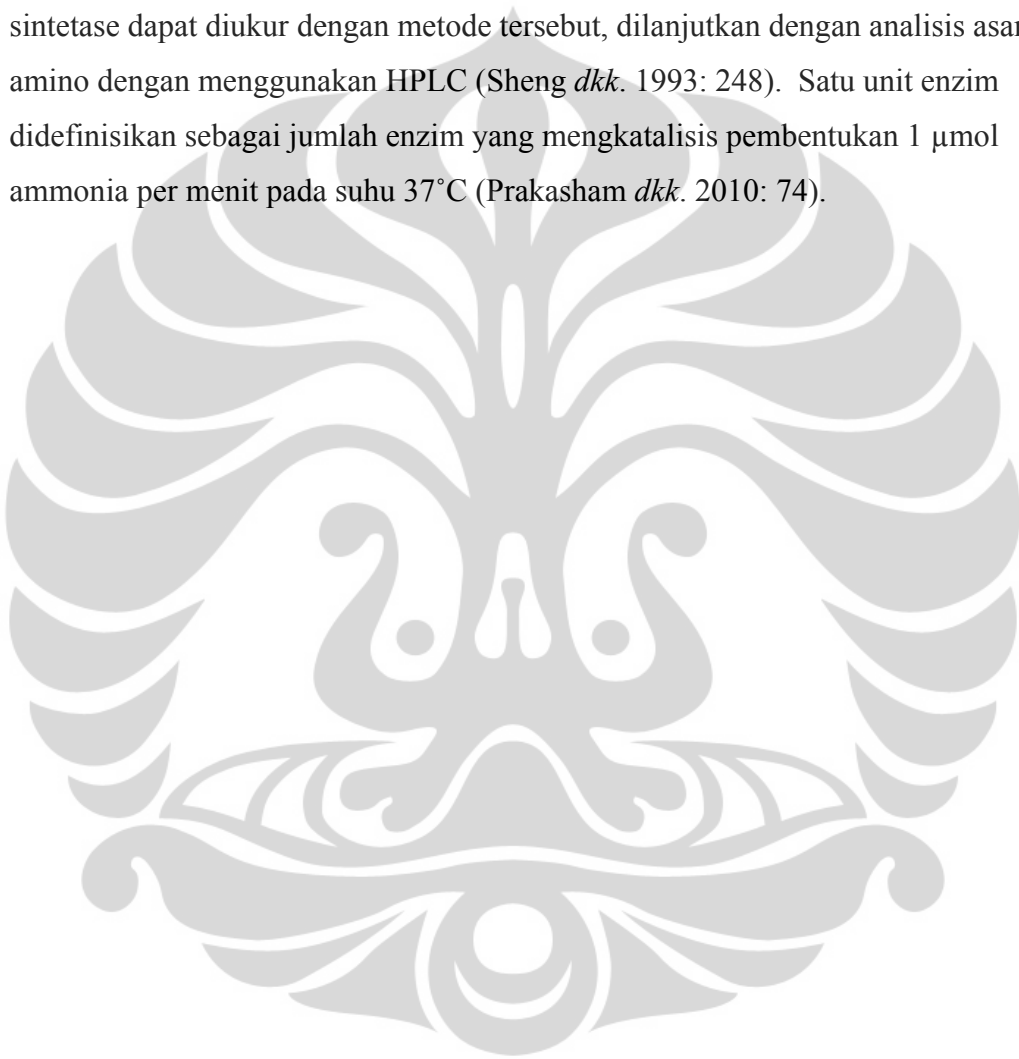
Pengukuran kadar protein dapat dilakukan dengan beberapa metode, misalnya metode Bradford, metode Biuret dan metode Lowry. Metode Bradford lebih sensitif daripada metode Lowry dan Biuret. Pengukuran kadar protein menggunakan reagen Bradford tergantung pada pembentukan kompleks antara pewarna *Coomassie Brilliant Blue G-250* dan protein dalam larutan. Pengikatan tersebut menyebabkan pengalihan absorpsi maksimum dari pewarna dari panjang gelombang 465 nm sampai dengan panjang gelombang 595 nm (Thermo Scientific 2011: 1).

Akurasi kuantifikasi dengan reagen Bradford tergantung dari protein yang diukur. Respon dari protein tersebut tergantung pada sekuen asam amino, titik isoelektrik, struktur, dan gugus prostetik. Kuantifikasi secara pasti konsentrasi protein dapat ditentukan dengan menggunakan protein standar untuk menghasilkan kurva kalibrasi. Protein yang sudah diketahui konsentrasinya, yaitu *Bovine Serum Albumin* (BSA) atau *Bovine Gamma Globulin* (BGG) pada umumnya digunakan sebagai standar untuk menentukan kurva standar protein (Thermo Scientific 2011: 1--7).

2.8 Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase

Aktivitas enzim L-asparaginase dan L-asparagin dapat diuji dengan menggunakan beberapa metode, misalnya analisis asam amino dengan HPLC, *gas chromatography* dan *mass spectrometry*, serta pengujian dengan radiometrik. Akan tetapi, pengujian dengan beberapa metode tersebut pada umumnya mahal dan membutuhkan waktu yang lama. Kuantifikasi asam amino dapat dilakukan dengan metode lain, yaitu ninhidrin kolorimetrik. Ninhidrin (triketohidriden hidrat) akan bereaksi dengan amina primer dan sekunder untuk menghasilkan

warna ungu Ruhemann. Metode tersebut juga dapat digunakan untuk identifikasi secara spesifik dari L-asparagin. Reaksi tersebut juga dapat menghasilkan ammonia (Sheng *dkk.* 1993: 242). Pengukuran kuantitatif L-asparagin secara spesifik dengan metode kolorimetrik dilakukan dengan mencampurkan L-asparagin dengan dilusi larutan etanol ninhidrin dan diukur pada panjang gelombang maksimum 340--350 nm. Aktivitas L-asparaginase dan asparagin sintetase dapat diukur dengan metode tersebut, dilanjutkan dengan analisis asam amino dengan menggunakan HPLC (Sheng *dkk.* 1993: 248). Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengkatalisis pembentukan 1 μmol ammonia per menit pada suhu 37°C (Prakasham *dkk.* 2010: 74).



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular, Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek), Serpong. Penelitian dilakukan selama 11 bulan, terhitung sejak bulan Juli 2011 hingga Mei 2012.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian, antara lain mikropipet 0,1--2.5 μ l, 0,5--10 μ l, 10--200 μ l, 100--1000 μ l [Bio-rad], tips mikropipet [Sorenson Bioscience, Inc.], sentrifugator [Sorval Fresco], *cool centrifuge* [Hitachi CR-21G], mini sentrifugator [Mini Spin], konsentrator [Eppendorf Concentrator 5301], spektrofotometer UV-VIS [Hitachi U-4001], *thermal cycler* [Eppendorf Master Cycler Personal], elektroforesis [Mupid ex U Submarine Electrophoresis System], *shaker incubator* [Koehner Shaker, Heidolph Unimax 1010], neraca analitik [RAD WAG WAS 220/C/2], *thermomixer* [Eppendorf Thermomixer Comfort], vorteks [Supermixer K], milipore [Simpak 1], pH meter [Inolab], autoklaf [Iwaki Autoclave ACV-2450], kamera digital [Canon Ixus 115 HS], *freezer* -85°C [NUAIRE Ultralow Freezer], *freezer* 4°C [Sharp], *freezer* -20°C [Sharp], *laminar air flow* [ESCO Class II BSC], *microwave* [Sharp], inkubator [Mettler], *magnetic stirrer*, lemari asam [ESCO], tabung falkon ukuran 50 ml [Corning], tabung mikrosentrifugasi dan tabung PCR [Sorenson], *water bath* [Kottermann Labortechnik], spektrofotometer [NanoDrop-ND 1000], UV Transilluminator [BIO-RAD], sonikator [Handy Sonic], labu erlenmeyer dan botol berbagai ukuran [Schott Duran], gelas ukur 100 ml dan 500 ml [Iwaki Pyrex], komputer [Samsung], laptop [Dell inspiron 1420], perangkat dokumentasi gel [Kodak], sarung tangan [SENSI gloves], *wrap plastic* [Klin Pak], parafilm [Sigma], *test tube* [Iwaki Pyrex], *aluminium foil*, *timer*, ose, pinset, *scalpel*,

tusuk gigi, *tissue* [Tessa], korek api, *triangle spreader*, *ice maker* [NordCap SPR 80], *cool box* [Coleman], masker [SENSI Mask], dan alat tulis.

3.3 Bahan

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 sebagai sumber DNA sisipan L-asparaginase, plasmid pGEM[®]- T Easy *xyn* AQ1 sebagai DNA *template* promoter *xyn* AQ1, plasmid pGEM[®]- T Easy sebagai vektor pengklonaan, plasmid pUC 19 sebagai kontrol negatif aktivitas enzim L-asparaginase, dan bakteri *E. coli strain* DH5 α sebagai sel inang.

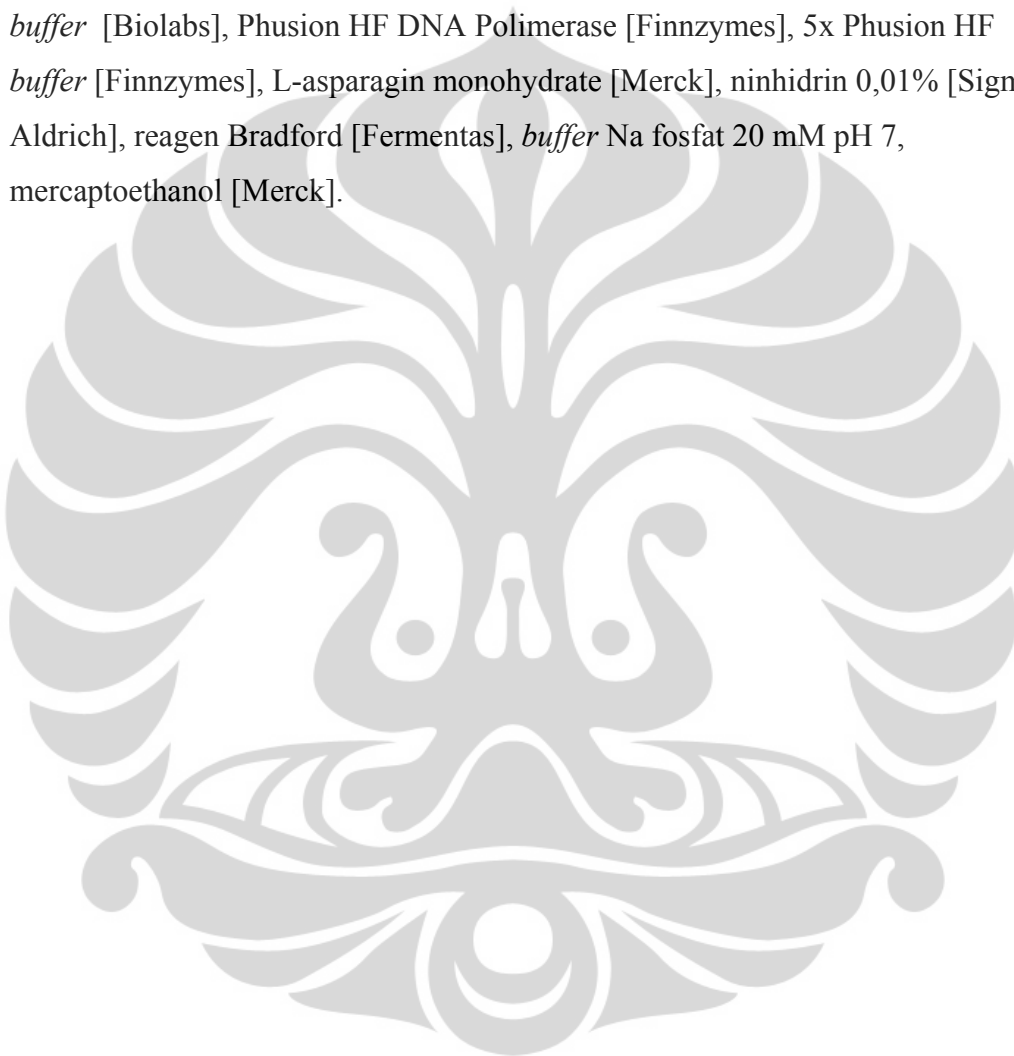
3.3.2 Primer

Primer yang digunakan dalam proses PCR terdiri atas primer untuk amplifikasi promoter AQ1 (Tabel 4.2.2), primer untuk amplifikasi gen L-asparaginase (Tabel 4.2.3), dan primer untuk *overlap* PCR (Tabel 4.2.4).

3.3.3 Bahan Kimia

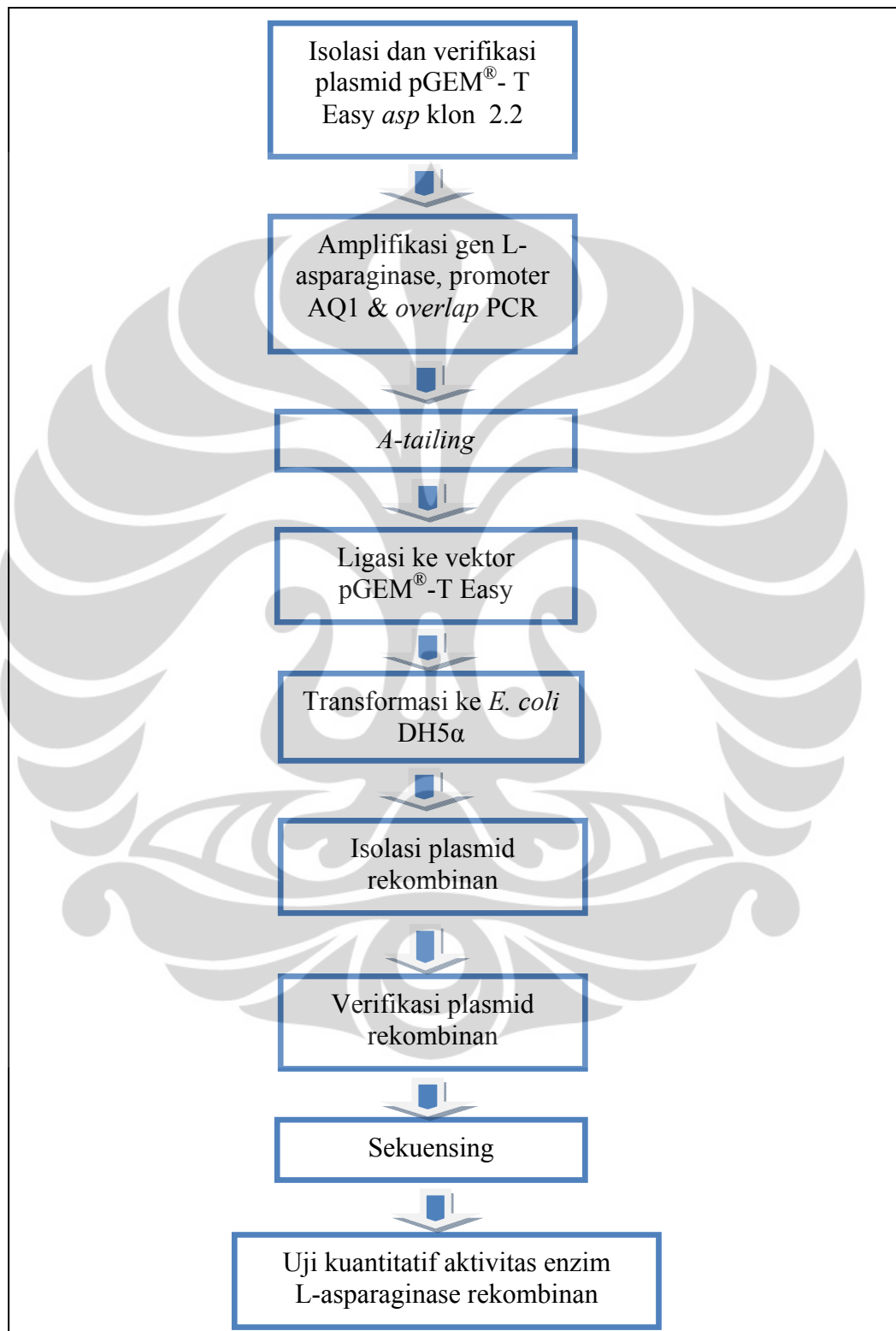
Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian adalah *yeast extract* [Scharlau], tripton [bactotryptone], NaCl [Merck], KCl [Merck], MgCl₂ [Merck], Na₂HPO₄ · 2H₂O [Merck], KH₂PO₄ [Merck], NH₄Cl [Merck], CaCl₂ · 2 H₂O [Merck], MgSO₄ · 7 H₂O [Merck], agar, agarosa [Invitrogen, 1st BASE], glukosa [Merck], EDTA [Merck], Tris HCl 10 mM pH 8, RNase [Geneaid], HCl [Merck], NaOH [Merck], SDS (sodium dodesil sulfat) 1%, kalium asetat [Merck], asam asetat glasial [Merck], isopropanol, Tris BASE [Biomatix], etanol 70 %, 96 %, 100 % [Merck], gliserol [Sigma], 1x TAE *buffer*, TE (Tris-EDTA) *buffer*, TB *buffer*, EtBr (etidium bromide) [MERCK], dNTP *mix* 10 mM [Promega], KAPA *Taq* polimerase [Biosistems], KAPA *Taq buffer with Mg*²⁺ [Biosistems],

GeneAid Gel/PCR *purification kit* [Geneaid], 2x *buffer* T4 DNA ligase [Promega], T4 DNA ligase [Promega], ampisilin [Sigma-Aldrich], DMSO (dimetil sulfoksida) [Sigma-Aldrich], IPTG [Invitrogen], X-Gal [invitrogen], 6x *loading dye* [Fermentas], marka DNA 1 kb [Fermentas], marka DNA 50 pb [Fermentas], akuabides steril, miliQ, *bovine serum albumin* (BSA) [Biolabs], *buffer* 4 [Biolabs], enzim restriksi *NdeI*, enzim restriksi *EcoRI* [Biolabs], *EcoRI buffer* [Biolabs], Phusion HF DNA Polimerase [Finnzymes], 5x Phusion HF *buffer* [Finnzymes], L-asparagin monohydrate [Merck], ninhidrin 0,01% [Sigma-Aldrich], reagen Bradford [Fermentas], *buffer* Na fosfat 20 mM pH 7, mercaptoethanol [Merck].



3.4 Skema Kerja Penelitian

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada gambar 3.4.



Gambar 3.4. Skema kerja penelitian

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan *Buffer* dan Medium

Proses pembuatan *buffer* dan medium yang digunakan selama penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

3.5.2 Isolasi Plasmid pGEM[®]- T Easy *Asp* Klon 2.2

Plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 dari penelitian sebelumnya di *streak* pada medium LB agar yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml kemudian diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh kemudian diinokulasi ke dalam 5 ml medium LB cair yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 16 jam. Isolasi plasmid dilakukan dengan metode *alkaline lysis mini preparation* (Sambrook & Russell 2001: 1.32--1.34). Sebanyak 3 ml hasil seleksi koloni putih yang telah ditumbuhkan dalam LB ampisilin cair dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml (dilakukan dalam 2 kali tahapan) dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian dibuang menggunakan pipet dan selanjutnya ditambahkan 100 µl *solution* I pada masing-masing tabung. Campuran tersebut kemudian disuspensi dengan menggunakan vorteks sampai seluruh pelet tercampur sempurna dengan *solution* I dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 5 menit. Suspensi tersebut ditambahkan *solution* II sebanyak 200 µl dan dikocok ke atas ke bawah sebanyak 5 kali kemudian diinkubasi di dalam es selama 5 menit. Hasil suspensi akan menjadi bening dan pada tutup tabung akan tampak benang-benang lengket. Sebanyak 150 µl *solution* III ditambahkan pada suspensi dan dikocok segera dengan kuat sebanyak 5 kali. Suspensi diinkubasi kembali di es selama 5 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifugasi yang baru. Isopropanol sebanyak 300 µl ditambahkan ke dalam supernatan lalu dihomogenkan dan didiamkan pada suhu

ruang selama 30 menit. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang. Pelet dibilas dengan etanol 70 % sebanyak 0,5 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet dikeringkan dengan konsentrator. Pelet yang sudah kering kemudian dilarutkan dalam Tris-HCl 10 mM pH 8 sebanyak 50 µl + RNase 1 mg/ml (Sambrook & Russell 2001: 1.32--1.35).

3.5.3 Konfirmasi Digesti Plasmid pGEM[®]- T Easy *Asp* Klon 2.2 dengan Enzim Restriksi *EcoRI*

Metode yang digunakan untuk digesti plasmid dan DNA target adalah berdasarkan Alexander *dkk.* (2003: 207) yang telah dimodifikasi. Plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 hasil isolasi dikonfirmasi digesti dengan enzim restriksi *EcoRI*. Reaksi digesti dilakukan dengan membuat *master mix* pada tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml, kemudian dilakukan *short spin* selama 10 detik. Campuran reaksi digesti kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1,5 jam di dalam *thermomixer*. Hasil digesti kemudian divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% pada tegangan 100 V selama 25 menit. Komposisi reaksi digesti dapat dilihat pada lampiran 10.

3.5.4 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Amplifikasi gen L-asparaginase dan promoter *xyn* AQ1 dilakukan dengan metode PCR. Proses PCR yang dilakukan terdiri atas tiga tahap, yaitu amplifikasi promoter *xyn* AQ1, amplifikasi gen L-asparaginase, dan penggabungan kedua fragmen hasil amplifikasi tersebut dengan *overlap* PCR.

3.5.4.1 Amplifikasi Promoter *xyn* AQ1

Template DNA yang digunakan untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1, yaitu plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *xyn* AQ1. Amplifikasi promoter *xyn*

AQ1 menggunakan primer *forward* yang sudah ditambahkan adaptor enzim restriksi *KpnI*. Primer *forward* terdiri atas beberapa basa yang menjadi ORF (*open reading frame*) dari promoter *xyn* AQ1, sedangkan primer *reverse* yang digunakan memiliki daerah *overlap* dengan primer *forward* untuk amplifikasi gen L-asparaginase. Komposisi reaksi amplifikasi promoter *xyn* AQ1 dapat dilihat pada lampiran 4, sedangkan reaksi PCR dapat dilihat pada lampiran 5. Hasil amplifikasi promoter *xyn* AQ1 kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarosa 2%, 100 V selama 25 menit.

3.5.4.2 Amplifikasi Gen L-Asparaginase

Proses PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik yang sudah didesain sebelumnya (Tabel 4.2.3). *Template* yang digunakan untuk amplifikasi gen L-asparaginase, yaitu hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM[®]-T Easy *asp* klon 2.2. Primer tersebut akan mengamplifikasi ORF pengkode gen L-asparaginase pada klon 2.2. Enzim yang digunakan dalam PCR adalah enzim polimerase HF (*High fidelity*). Proses PCR dimulai dengan membuat *reaction mixture*. Komposisi PCR secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 2. Optimasi PCR dilakukan dengan melakukan pengenceran dari DNA *template* dan pengaturan suhu *annealing*. *Template* DNA yang akan digunakan dalam reaksi PCR diencerkan menjadi 20x menggunakan akuabides, yaitu *template* DNA 1 µl ditambahkan dengan akuabides steril sebanyak 19 µl. Program PCR dapat dilihat pada lampiran 3. Penambahan *enzim* HF DNA polimerase dilakukan 30 detik setelah campuran bahan sebelumnya dimasukkan ke dalam *thermal cycler* (*hotstart*). Uji adanya kontaminasi genom dilakukan dengan cara mengganti komposisi *template* DNA dengan akuabides steril (Sambrook & Russell 2001: 8.21). Hasil amplifikasi gen L-asparaginase kemudian divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%, 100 V selama 25 menit. Fragmen DNA hasil amplifikasi kemudian dipurifikasi dengan menggunakan *Gel/ PCR Fragment Extraction Kit* (Geneaid 2003: 1--3).

3.5.4.3 *Overlap* PCR

Penggabungan promoter *xyn* AQ1 dan gen L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan teknik *overlap* PCR. Primer *forward* yang digunakan untuk *overlap* PCR, yaitu primer *forward* yang digunakan untuk amplifikasi promoter AQ1, sedangkan primer *reverse* merupakan primer *reverse* yang digunakan untuk amplifikasi gen L-asparaginase. DNA *template* yang digunakan dalam *overlap* PCR, yaitu hasil amplifikasi promoter *xyn* AQ1 dan hasil amplifikasi gen L-asparaginase. Kedua DNA *template* tersebut masing-masing diencerkan sebanyak 5x. Hal tersebut dilakukan dengan menambahkan akuabides steril 4 μ l ke dalam DNA *template* sebanyak 1 μ l. Komposisi reaksi PCR dapat dilihat pada lampiran 6. Program PCR yang digunakan, yaitu dengan PCR *touchdown* (dengan penurunan suhu *annealing* sebesar -0,2 $^{\circ}$ C setiap siklusnya). Suhu *annealing* berkisar antara 67 $^{\circ}$ C--63 $^{\circ}$ C. Program *overlap* PCR dapat dilihat pada lampiran 7. Hasil *overlap* PCR dapat divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%, 100 V selama 25 menit.

3.5.5 Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis gel agarosa yang dilakukan berdasarkan pada metode Sambrook *dkk.* (1989: 5.9) dengan modifikasi. Sebanyak 0,25 g agarosa dilarutkan dalam 25 ml *buffer* TAE 1x, kemudian larutan dipanaskan di dalam *microwave* sekitar 2 menit. Larutan kemudian didinginkan dan dituang ke dalam cetakan gel yang telah diberi sisir. Gel agarosa yang telah mengeras dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi *buffer* TAE 1x.

Sampel DNA rekombinan sebanyak 2 μ l hasil isolasi plasmid atau PCR ditambahkan dengan 6 x *loading buffer* sebanyak 2 μ l. Campuran dihomogenisasi dengan pemipetan kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarosa. Sumur pada gel agarosa yang sudah berisi sampel dan marker 1 kb atau 50 pb kemudian ditutup dan dihubungkan dengan sumber arus listrik bertegangan 100 V selama 25 menit. Gel agarosa hasil elektroforesis dimasukkan ke dalam larutan etidium bromida selama 15 menit kemudian dibilas dengan menggunakan miliQ

atau akuabides. Gel hasil elektroforesis dapat divisualisasikan di bawah sinar UV, kemudian didokumentasikan dengan kamera digital (Sambrook & Russell 1989: 5.9).

3.5.6 Purifikasi Gel Hasil *Overlap* PCR

Purifikasi DNA dari gel agarosa dilakukan dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit* (Geneaid 2003: 2). Gel agarosa yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan dipotong (berat ± 300 mg) dengan *scalpel* kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Gel tersebut kemudian ditambahkan larutan DF *buffer* sebanyak 500 μ l. Gel kemudian divorteks dan diinkubasi di dalam *thermomixer* pada suhu 55°C selama 10--15 menit sampai mencair. Gel yang sudah mencair kemudian didiamkan pada suhu ruang sampai dingin. Tahapan selanjutnya, yaitu memindahkan gel yang sudah mencair ke dalam kolom DF yang pada bagian bawahnya telah diletakkan tabung koleksi 2 ml. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14500 rpm selama 30 detik. Cairan dari kolom DF akan berpindah ke tabung koleksi. Residu di tabung koleksi kemudian dibuang.

Sampel pada kolom DF kemudian ditambahkan *washing buffer* (yang telah ditambahkan etanol) sebanyak 600 μ l dan disentrifugasi dengan kecepatan 14500 rpm selama 30 detik. Cairan di tabung koleksi dibuang kemudian tabung koleksi dipasang kembali dengan kolom DF. Tabung disentrifugasi kembali selama 3 menit dengan kecepatan 14500 rpm untuk mengeringkan membran pada kolom. Kolom DF kemudian dipindahkan ke tabung mikrosentrifugasi berukuran 1,5 ml. Tahapan elusi DNA dilakukan dengan menambahkan *elution buffer* sebanyak 15--50 μ l pada tengah membran dan dilakukan tanpa mengenai dinding tabung. Proses tersebut dilakukan selama 2 menit sampai *elution buffer* terserap dan disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 14500 rpm (Geneaid 2003: 2). Residu yang tertampung di dalam tabung mikrosentrifugasi berupa produk hasil restriksi yang telah dipurifikasi. Hasil purifikasi sebanyak 3 μ l kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% pada tegangan 100 V selama 25 menit.

3.5.7 Pengukuran Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA diukur menggunakan alat NanoDrop *spectrophotometer*. Sebanyak 1 μ l sampel DNA dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur konsentrasinya. Konsentrasi sampel dapat diketahui dalam satuan ng/ μ l dan kemurnian sampel DNA juga dapat diketahui.

3.5.8 A-Tailing

Sebelum dilakukan ligasi gen L-asparaginase ke vektor pGEM[®]- T Easy, perlu dilakukan proses *A-tailing*, yaitu menambahkan basa adenin (A) pada ujung 3' gen sisipan. Komposisi reaksi *A-tailing* dapat dilihat pada lampiran 8. Seluruh campuran reaksi dimasukkan ke dalam mesin PCR untuk dilakukan *annealing* pada suhu 72°C selama 30 menit (Promega 2010: 4--6).

3.5.9 Ligasi Gen L-Asparaginase AQ1 ke dalam Vektor pGEM[®]- T Easy

Ligasi gen L-asparaginase AQ1 ke dalam vektor pGEM[®]- T Easy dilakukan berdasarkan protokol dari Promega. Campuran reaksi ligasi dapat dilihat pada lampiran 9. Campuran dihomogenkan dan dilakukan *short spin* selama beberapa detik, kemudian diinkubasi 16 jam pada suhu 4°C (Promega 2010: 4--5). Hasil reaksi ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α .

3.5.10 Pembuatan Sel Kompeten (*E. coli* DH5 α)

Sel kompeten dibuat berdasarkan metode Inoue *dkk.* (1990: 23--28). Sebanyak satu koloni *E. coli* DH5 α hasil *streak* pada medium LB agar, diinokulasi ke dalam medium SOB 50 ml, kemudian dimasukkan ke dalam *shaker incubator* selama selama 18 jam pada suhu 25--30°C dengan kecepatan 70-100 rpm. Proses selanjutnya, yaitu mengukur *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm, hingga OD mencapai 0,4--0,8. Sampel diinkubasi di dalam es, kemudian

dipindahkan ke dalam tabung falkon masing-masing sebanyak 50 ml untuk disentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan cara aseptis di *laminar air flow*. Pelet disuspensi menggunakan pipet dengan menambahkan *buffer* TB dingin sebanyak 16,75 ml kemudian diinkubasi di es selama 10 menit. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan cara aseptis, sedangkan pelet disuspensi kembali menggunakan pipet dengan menambahkan *buffer* TB dingin sebanyak 4 ml. kemudian ditambahkan DMSO sebanyak 0,3 ml dan dinkubasi di es selama 10 menit. Sampel kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml masing-masing sebanyak 200 µl dan disimpan dalam nitrogen cair atau lemari pendingin khusus (-80°C) (Sambrook & Russell 4001: 1.112--1.115).

3.5.11 Transformasi Hasil Ligasi ke dalam Sel Kompeten *E. coli* DH5α

Hasil ligasi gen L-asparaginase AQ1 ke vektor pGEM[®]- T Easy ditransformasikan ke sel kompeten DH5α dengan cara *heatshock*. Sel kompeten yang disimpan beku di lemari pendingin khusus (-80°C), dicairkan di dalam es. Hasil ligasi pGEM[®]- T Easy dan L-asparaginase sebanyak 10 µl dimasukkan ke dalam sel kompeten dan disuspensi hingga tercampur sempurna. Campuran tersebut diinkubasi di dalam es selama 30 menit kemudian diinkubasi di *thermomixer* pada suhu 42°C selama 60 detik. Setelah diinkubasi di *thermomixer*, campuran tersebut diinkubasi kembali dalam es selama 2 menit. Medium SOC sebanyak 800 µl ditambahkan pada campuran tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam *shaker incubator* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi sebanyak 800 µl dibuang, sedangkan sisanya sebanyak 200 µl diresuspensi. Hasil suspensi sebanyak 100 µl kemudian disebar secara merata ke dalam medium LB agar yang mengandung ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µl/mg dan ditambahkan dengan IPTG dan X-Gal masing-masing sebanyak 30 µl. Hasil transformasi di medium agar disimpan di inkubator pada suhu 37°C selama 16 jam (Sambrook & Russell 4001: 1.117).

3.5.12 Isolasi Plasmid Rekombinan

Koloni putih hasil transformasi yang tumbuh dipindahkan ke medium LB cair sebanyak 5 ml yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µl/mg, kemudian diinkubasi di dalam *shaker incubator* pada suhu 37° C dengan kecepatan 150 rpm selama 12--18 jam untuk dilakukan isolasi plasmid. Isolasi plasmid dilakukan dengan metode *alkaline mini preparation* (Sambrook & Russell 2001: 1.32--1.34).

3.5.13 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR

Plasmid rekombinan yang sudah diisolasi kemudian dilakukan verifikasi melalui PCR. *Template* DNA yang digunakan dalam PCR adalah hasil isolasi plasmid rekombinan. Komposisi reaksi dapat dilihat pada lampiran 6 dan program PCR dapat dilihat pada lampiran 7.

3.5.14 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Enzim Restriksi

Hasil subkloning dikonfirmasi dengan melakukan digesti plasmid rekombinan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dan *NdeI*. Komposisi reaksi digesti dapat dilihat pada lampiran 10 dan lampiran 11. Semua campuran reaksi dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml kemudian dilakukan *short spin*. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 1,5 jam. Hasil restriksi kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 1% pada tegangan 100 V selama 25 menit.

3.5.15 Purifikasi Plasmid Rekombinan Klon Positif untuk Sekuensing

Plasmid rekombinan klon positif harus dipurifikasi terlebih dahulu dengan PEG 20% sebelum dilakukan sekuensing. Hasil isolasi plasmid rekombinan klon positif dengan metode *alkaline lysis mini preparation* dipurifikasi dengan menambahkan PEG 20% sebanyak 30 µl kemudian diinkubasi di es selama 1

jam. Plasmid yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Plasmid tersebut ditambahkan etanol 70% sebanyak 20 µl dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, sedangkan pelet dikeringkan dengan menggunakan konsentrator. Pelet yang sudah kering kemudian ditambahkan TrisHCl 10 mM, pH 8 sebanyak 20 µl.

3.5.16 Sekuensing dan Analisis Sekuen dengan Bioinformatika

Sampel yang digunakan untuk sekuensing adalah plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 klon positif yang sudah dipurifikasi dengan PEG 20%. Sampel tersebut dianalisis dengan menggunakan *automated sequencing*. Proses sekuensing menggunakan primer M13. Hasil sekuensing berupa kromatogram yang menggambarkan urutan nukleotida dari gen L-asparaginase dan promoter *xyn* AQ1. Kromatogram tersebut dibuka dengan program Chromas lite kemudian dicari sekuen primer *forward* maupun primer *reverse* dari gen tersebut. Sekuen nukleotida tersebut kemudian di BLAST menggunakan program BLASTN pada situs *online* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Sekuens *forward* dan *reverse* dapat di *alignment* dengan aplikasi *align* pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov atau CLUSTALW pada www.genome.net. Kromatogram hasil sekuensing dibuka dengan menggunakan perangkat lunak CHROMAS atau Bioedit untuk verifikasi pembacaan *peak* nukleotida yang terbaca oleh mesin *sequencer*. 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, dan PDRAW32.

3.5.17 Produksi Enzim L-Asparaginase

Produksi enzim L-asparaginase dilakukan dengan melakukan inokulasi 1 koloni tunggal hasil *streak* plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 ke dalam medium LB cair 10 ml yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µl/ml. Produksi enzim L-asparaginase menggunakan

plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 (kontrol negatif promoter *xyn* AQ1) dan plasmid pUC 19 (kontrol negatif L-asparaginase dan promoter *xyn* AQ1). Hasil inokulasi tersebut kemudian diinkubasi di dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 16 jam.

Kultur dari medium LB ampisilin kemudian diukur *optical density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Sebanyak 2 ml kultur tersebut kemudian diinokulasikan ke 20 ml medium M9 yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml dan diinkubasi kembali di dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm hingga OD mencapai 0,6--0,8. Kultur tersebut sebanyak 15 ml kemudian diinokulasikan kembali ke medium M9 cair 150 ml yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml. *Starter* tersebut diinkubasi di dalam *shaker incubator* selama 16 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm.

Sel bakteri kemudian dipanen dengan melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit. Panen dilakukan pada saat OD kedua sampel antara 0,6--0,8. Pelet kemudian diresuspensi dengan *buffer* Na fosfat pH sebanyak 15 ml yang sudah ditambahkan mercaptoetanol 1 mM. Pelet kemudian disonikasi selama 5 menit, dengan 20 detik *on* dan 20 detik *off* (skala 8 Hz dari 10 Hz). Hasil sonikasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Pelet hasil sentrifugasi dibuang, sedangkan supernatannya digunakan untuk uji aktivitas enzim L-asparaginase (Yano *dkk.* 2008: 712).

3.5.18 Pengukuran Kadar Protein Enzim L-Asparaginase

Pengukuran aktivitas spesifik enzim L-asparaginase rekombinan dilakukan dengan terlebih dahulu mengukur kadar protein pada kontrol enzim maupun sampel enzim L-asparaginase rekombinan setelah penambahan promoter *xyn* AQ1. Uji protein hasil produksi enzim L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan reagen Bradford. Sampel enzim L-asparaginase dari plasmid rekombinan (pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1) dan kontrol (pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2) atau (pUC 19) sebanyak 20 µl ditambahkan masing-masing reagen Bradford

sebanyak 1 ml kemudian divorteks. Sampel enzim kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Hasil inkubasi sampel enzim kemudian diukur kadar proteinnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein pada sampel ditentukan dengan membandingkan absorbansi dengan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumine*) (Thermo Scientific 2011: 4).

Jika hasil pengukuran protein standar tidak termasuk ke dalam kisaran kurva standar BSA, yaitu nilai absorbansi sampel dikurangi blanko lebih kecil dari kurva standar BSA, maka harus dilakukan uji mikroprotein. Uji tersebut dilakukan dengan menambahkan sampel enzim L-asparaginase dari plasmid rekombinan (pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1) dan kontrol negatif (pUC 19) atau (pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2) ke dalam masing-masing reagen Bradford 750 µl kemudian divorteks. Sampel enzim kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Pengukuran blanko dilakukan dengan menambahkan *buffer* Na fosfat pH 7 sebanyak 750 µl dengan reagen Bradford 750 µl kemudian divorteks. Sampel enzim kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Hasil inkubasi sampel enzim kemudian diukur kadar proteinnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein pada sampel ditentukan dengan membandingkan absorbansi dengan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumine*). Pengenceran sampel enzim dilakukan jika pengurangan nilai absorbansi sampel dengan blanko yang lebih besar dari kurva standar BSA (Thermo Scientific 2011: 6).

3.5.19 Pengukuran Aktivitas Enzim L-Asparaginase

Pengukuran aktivitas enzim L-asparaginase secara kuantitatif dilakukan berdasarkan modifikasi metode Sheng *dkk.* (1993: 242--249). Uji aktivitas enzim L-asparaginase dilakukan dengan 3 perlakuan, yaitu blanko air (BA), kontrol enzim (KE), dan sampel (S). Prosedur uji aktivitas untuk blanko air (BA), yaitu L-asparagin 15mM pH 7 sebanyak 400 µl diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit kemudian ditambahkan 200 µl mili-Q. Kontrol enzim (KE) hanya berisi enzim L-asparaginase 400 µl, sedangkan sampel (S) merupakan campuran dari

L-asparagin 15mM pH 7 sebanyak 400 μ l yang ditambahkan dengan enzim L-asparaginase 200 μ l setelah prainkubasi pada suhu 37°C selama 1 menit. Sampel (S) kemudian diinkubasi pada suhu 15°C selama 15 menit. Semua perlakuan, baik blanko air (BA), kontrol enzim (KE), maupun sampel (S) diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit kemudian masing-masing *tube* dimasukkan ke dalam air mendidih (suhu 100 °C) selama 2 menit. Campuran tersebut sebanyak 100 μ l ditambahkan dengan ninhidrin 0.01 % sebanyak 900 μ l dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit.

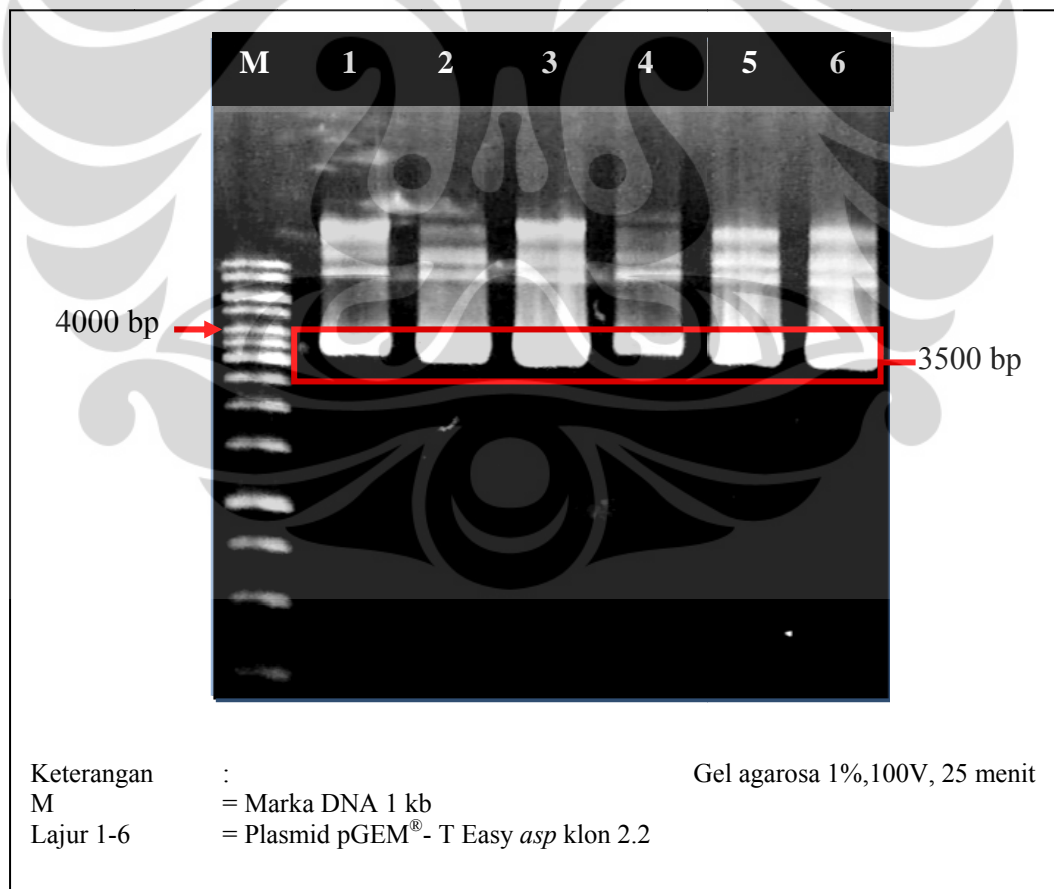
Pengukuran aktivitas enzim L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Akuabides sebanyak 500 μ l diletakkan di dalam kuvet, kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi *autozero*. Sampel enzim untuk semua perlakuan kemudian dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur konsentrasinya (Sheng *dkk.* 1993: 244). Aktivitas spesifik enzim (U/mg) didapat dengan cara membagi hasil aktivitas enzim (U/ml) dengan kadar protein enzim.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Isolasi Plasmid pGEM[®]- T Easy *Asp* Klon 2.2

Tahap awal dalam penelitian adalah melakukan isolasi plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 untuk mendapatkan gen L-asparaginase yang sudah berhasil dikloning ke sel inang *E. coli* DH5 α pada penelitian sebelumnya (Aprigiyonies 2011: 44). Hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 dapat divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa (Gambar 4.1.1). Hasil visualisasi pada gel agarosa 1% menunjukkan ukuran pita DNA 4004 bp.

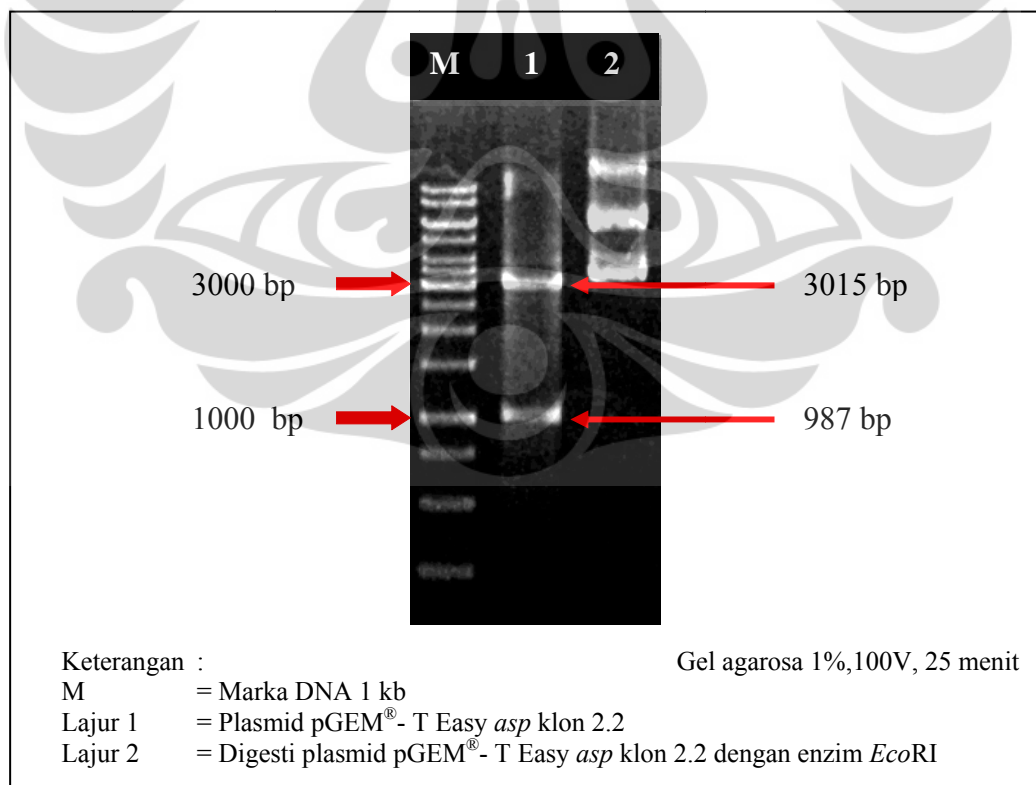


Gambar 4.1.1. Visualisasi hasil isolasi plasmid pGEM[®]-T Easy *asp* klon 2.2

Hasil isolasi plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan alat *nanodrop spectrophotometer*. Hasil isolasi plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 menunjukkan konsentrasi DNA 3176, 9 ng/ μ l dan kemurnian DNA (A_{260}/A_{280}) = 1,92.

4.1.2 Verifikasi Digesti Hasil Isolasi Plasmid pGEM[®]- T Easy *Asp* Klon 2.2

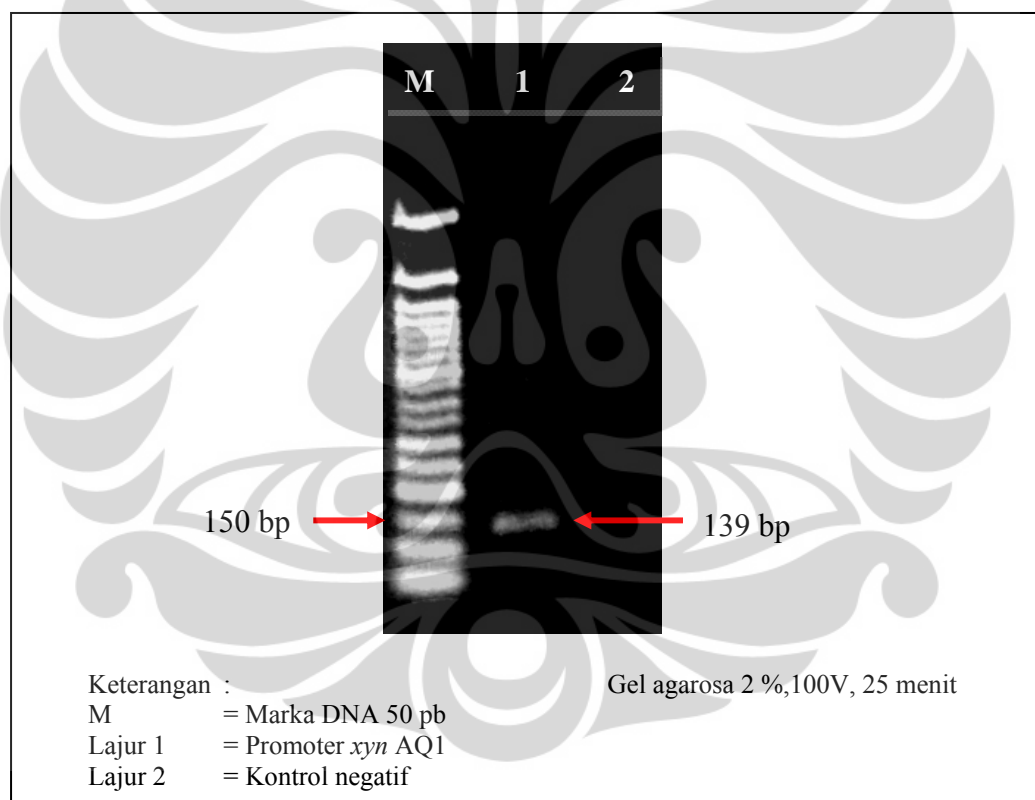
Verifikasi ukuran gen L-asparaginase dilakukan dengan melakukan digesti hasil isolasi plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 dengan menggunakan enzim restriksi enzim *EcoRI*. Hasil visualisasi digesti pada gel agarosa 1% menunjukkan dua fragmen DNA yang berukuran 3015 bp dan 987 bp (Gambar 4.1.2, lajur 1). Fragmen DNA yang berukuran 3015 bp merupakan ukuran fragmen plasmid pGEM[®]- T Easy, sedangkan fragmen DNA yang berukuran 987 bp merupakan fragmen gen L-asparaginase. Lajur 2 menunjukkan plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 yang belum dilakukan digesti (Gambar 4.1.2, lajur 2).



Gambar 4.1.2. Visualisasi hasil digesti plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2

4.1.3 Amplifikasi Promoter *xyn* AQ1

Amplifikasi promoter *xyn* AQ1 dilakukan dengan suhu *annealing* sebesar 63°C. Primer *forward* yang digunakan untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1 adalah primer yang sudah ditambahkan adaptor situs restriksi *Kpn*I. Primer tersebut sama dengan primer *forward* yang digunakan untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1 pada penelitian sebelumnya (Helianti *dkk.* 2010: 2). Hasil visualisasi elektroforesis pada gel agarosa 2% menunjukkan terbentuknya pita DNA berukuran 139 bp (Gambar 4.1.3). Hasil amplifikasi promoter AQ1 menunjukkan konsentrasi DNA 958 ng/μl dan kemurnian DNA (A_{260}/A_{280}) = 1,57.

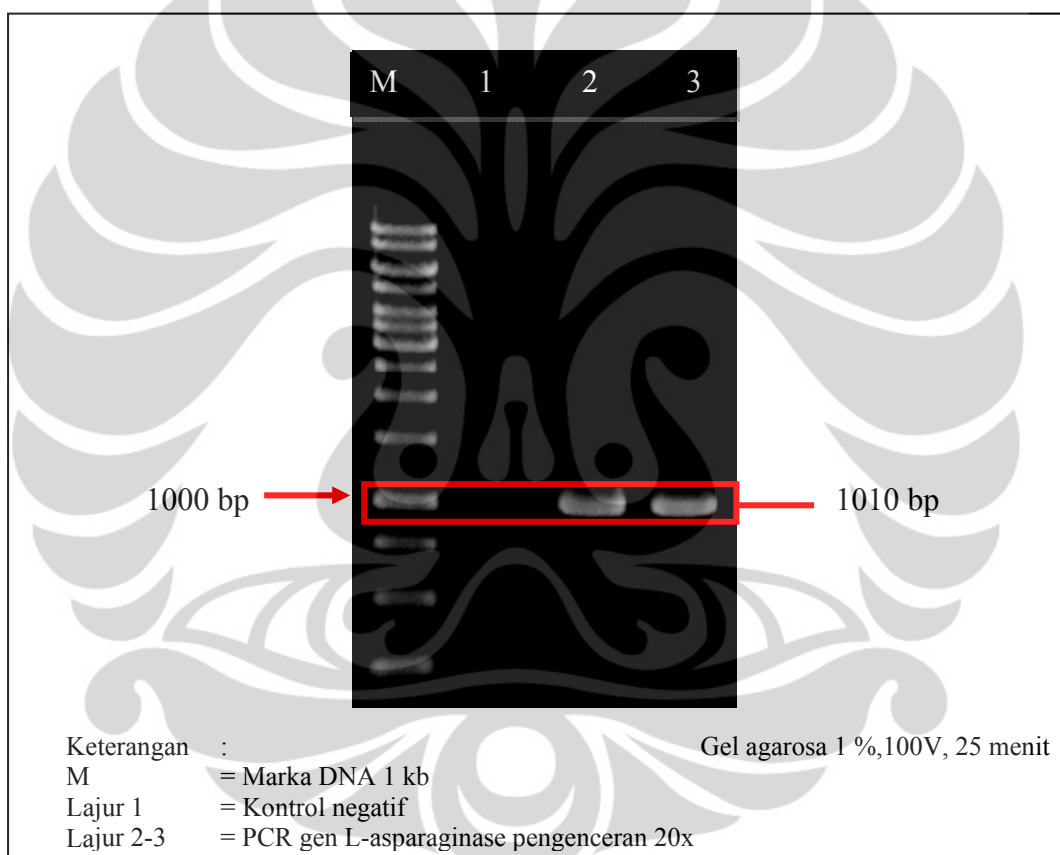


Gambar 4.1.3. Visualisasi hasil PCR promoter *xyn* AQ1

4.1.4 Amplifikasi Gen L-Asparaginase

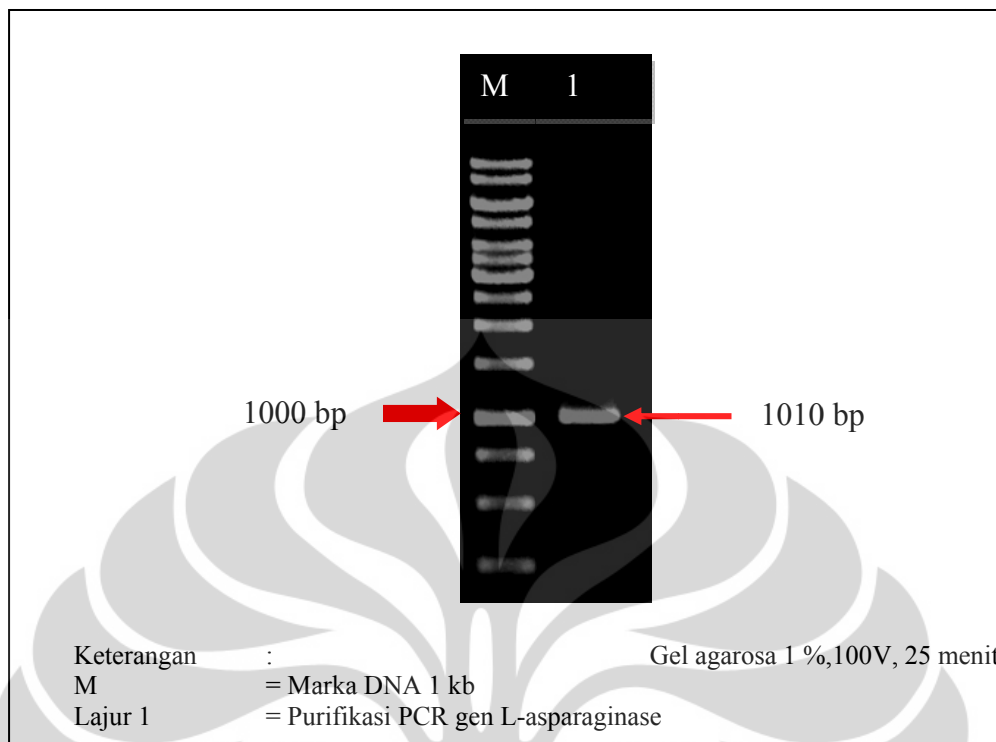
Amplifikasi gen L-asparaginase dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Proses PCR dilakukan dengan menggunakan primer

spesifik yang akan mengamplifikasi ORF dari gen L-asparaginase. *Template* yang digunakan untuk amplifikasi gen L-asparaginase, yaitu hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2. Enzim yang digunakan dalam PCR adalah enzim polimerase jenis HF (*high fidelity*). Sintesis dan amplifikasi gen L-asparaginase diawali dengan melakukan optimasi pengenceran *template* untuk mendapatkan kondisi PCR yang tepat dalam proses amplifikasi. Hasil amplifikasi gen L-asparaginase dengan pengenceran *template* 20 x menghasilkan pita DNA spesifik berukuran 1010 bp (Gambar 4.1.4(1)).



Gambar 4.1.4(1). Visualisasi hasil PCR gen L-asparaginase

Fragmen DNA hasil amplifikasi kemudian dipurifikasi dengan menggunakan *Gel/ PCR Fragment Extraction Kit* [Geneaid]. Hasil purifikasi kemudian divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 4.1.4(2)). Hasil purifikasi gen L-asparaginase menunjukkan konsentrasi DNA 22,7 ng/ μ l dan kemurnian DNA sebesar (A_{260}/A_{280}) = 1,13.



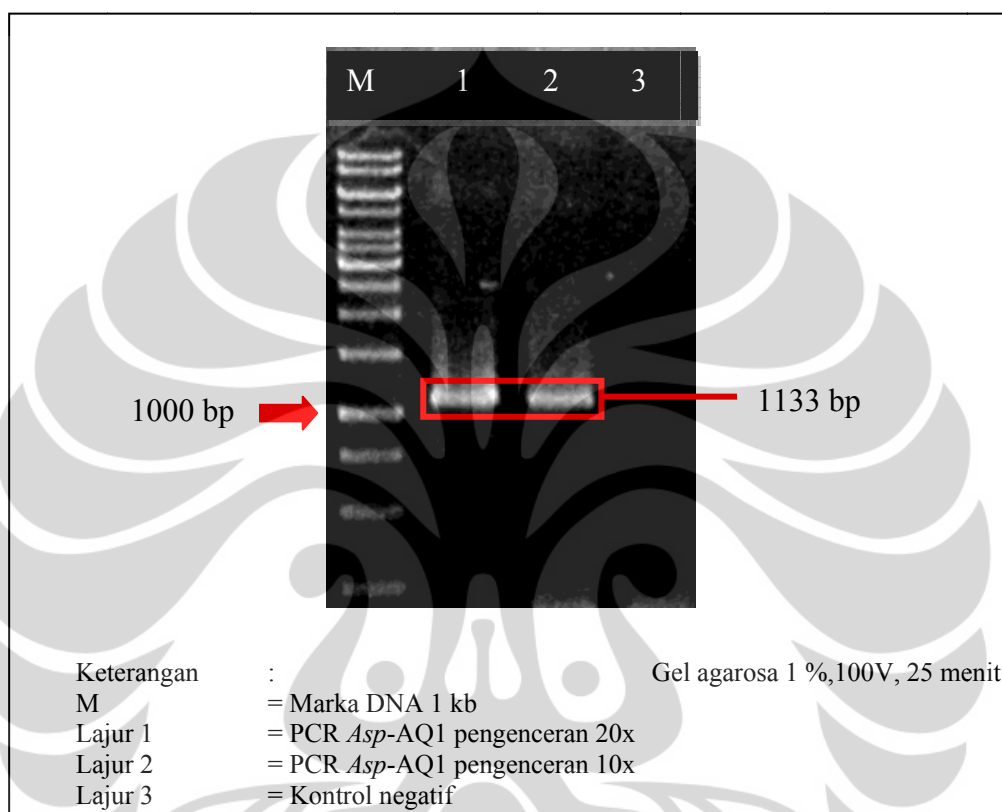
Gambar 4.1.4(2). Visualisasi hasil purifikasi PCR gen L-asparaginase

4.1.5. *Overlap* PCR

Amplifikasi promoter *xyn* AQ1 dan gen L-asparaginase dengan menggunakan *overlap* PCR. Primer *forward* yang digunakan untuk *overlap* PCR, yaitu primer *forward* yang digunakan untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1, sedangkan primer *reverse* merupakan primer *reverse* yang digunakan untuk amplifikasi gen L-asparaginase. DNA *template* yang digunakan dalam amplifikasi promoter *xyn* AQ1 adalah plasmid pGEM[®]- T Easy *xyn* AQ1.

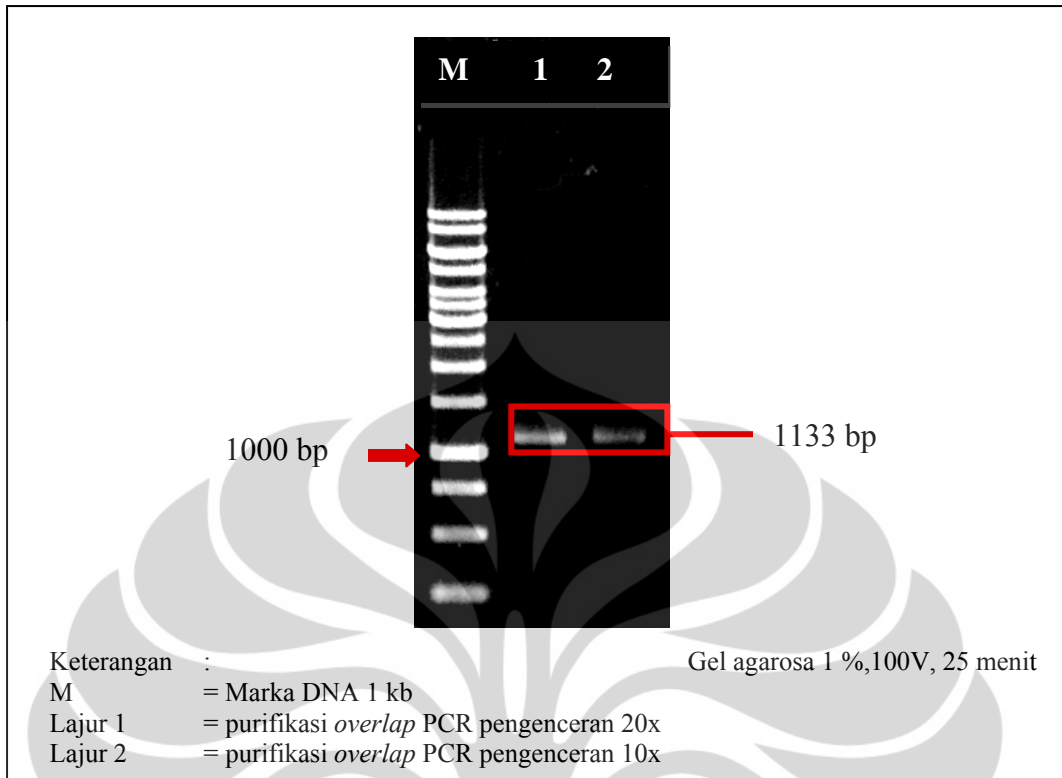
Tahap optimasi PCR dilakukan dengan menggunakan variasi suhu *annealing*, pengenceran DNA *template*, dan program PCR yang digunakan. Program PCR yang digunakan, yaitu dengan PCR *touchdown* (dengan penurunan suhu *annealing* sebesar -0,2°C setiap siklusnya). Suhu *annealing* yang digunakan berkisar antara 67°C--63°C. Hasil visualisasi elektroforesis pada gel agarosa 1% menunjukkan bahwa amplifikasi gen L-asparaginase AQ1 menghasilkan pita DNA lebih tebal jika dilakukan pengenceran *template* sebesar 20x. Hasil amplifikasi gen L-asparaginase-AQ1 dengan *overlap* PCR menunjukkan

terbentuknya pita DNA berukuran 1133 bp (Gambar 4.1.5(1)), yang merupakan penggabungan dari gen L-asparaginase dan promoter *xyn* AQ1. Lajur 3 merupakan kontrol negatif, yang tidak ditambahkan *template* L-asparaginase saat reaksi PCR.

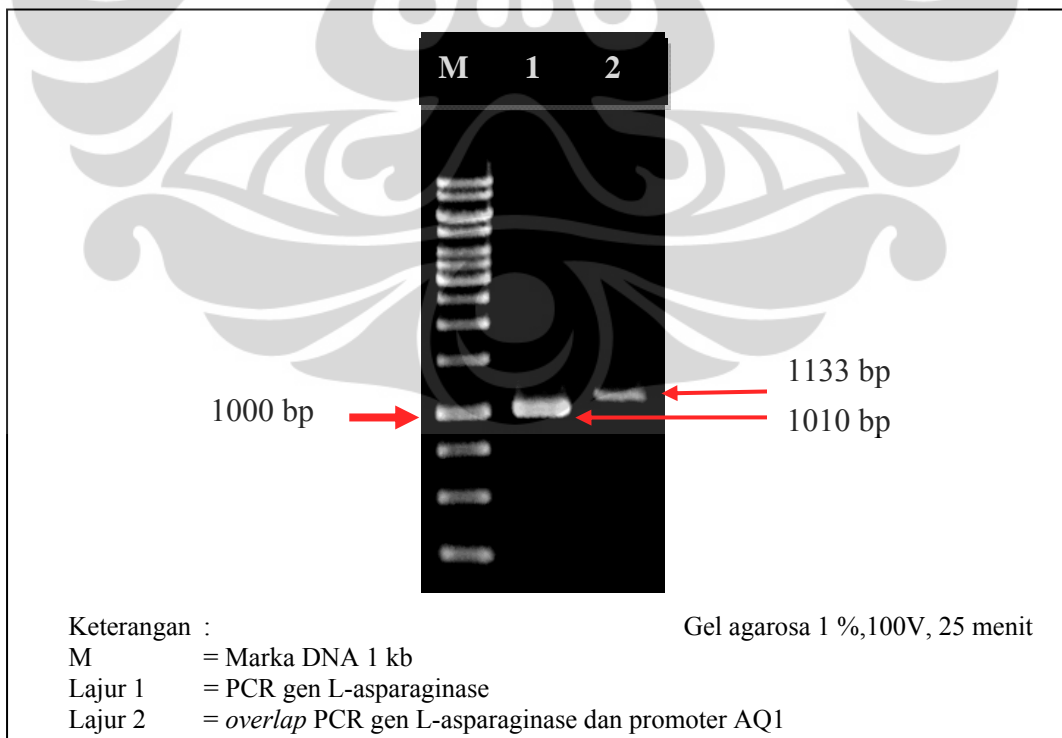


Gambar 4.1.5(1). Visualisasi hasil *overlap* PCR

Fragmen DNA hasil amplifikasi kemudian dipurifikasi dengan menggunakan *Gel PCR Fragment Extraction Kit* [Geneaid]. Hasil purifikasi kemudian divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% dan menunjukkan fragmen DNA yang spesifik yang berukuran 1133 bp (Gambar 4.1.5(2)). Perbandingan hasil *overlap* PCR (setelah penambahan promoter *xyn* AQ1) menunjukkan fragmen DNA yang berukuran lebih tinggi (1133 bp) daripada hasil PCR gen L-asparaginase sebelum penambahan promoter *xyn* AQ1 (1010 bp) (Gambar 4.1.5(3)). Hasil *overlap* PCR menunjukkan konsentrasi DNA 100,4 ng/ μ l dan kemurnian DNA (A_{260}/A_{280})= 1,84.



Gambar 4.1.5(2) Visualisasi hasil purifikasi gel *overlap* PCR



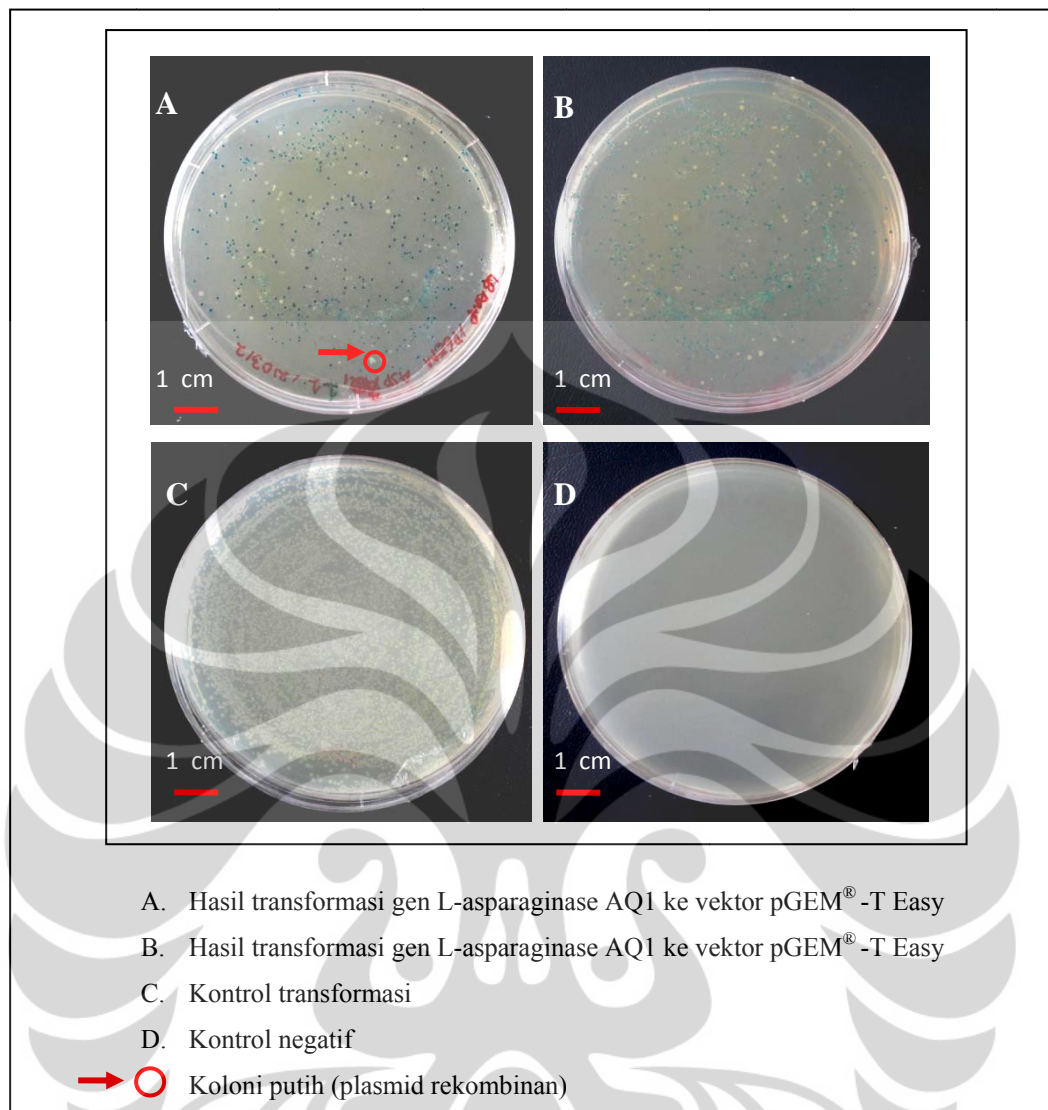
Gambar 4.1.5(3). Perbandingan hasil PCR gen L-asparaginase dan *overlap* PCR

4.1.6 *A-tailing* dan Ligasi Gen L-Asparaginase AQ1 dengan Plasmid pGEM[®]- T Easy

Produk hasil purifikasi *overlap* PCR kemudian dilakukan proses *A-tailing*, yaitu menambahkan basa adenin (A) pada ujung 3' gen sisipan pada suhu 72°C selama 30 menit dengan menambahkan dNTP *mix* dan *Taq* DNA polimerase. Produk hasil *A-tailing* tidak diverifikasi dengan elektroforesis gel agarosa karena langsung digunakan sebagai untuk reaksi ligasi yang kemudian ditransformasikan ke *E. coli* DH5 α . Ligasi dilakukan pada suhu 4°C selama 16 jam.

4.1.7 Transformasi ke dalam *E. coli* DH5 α

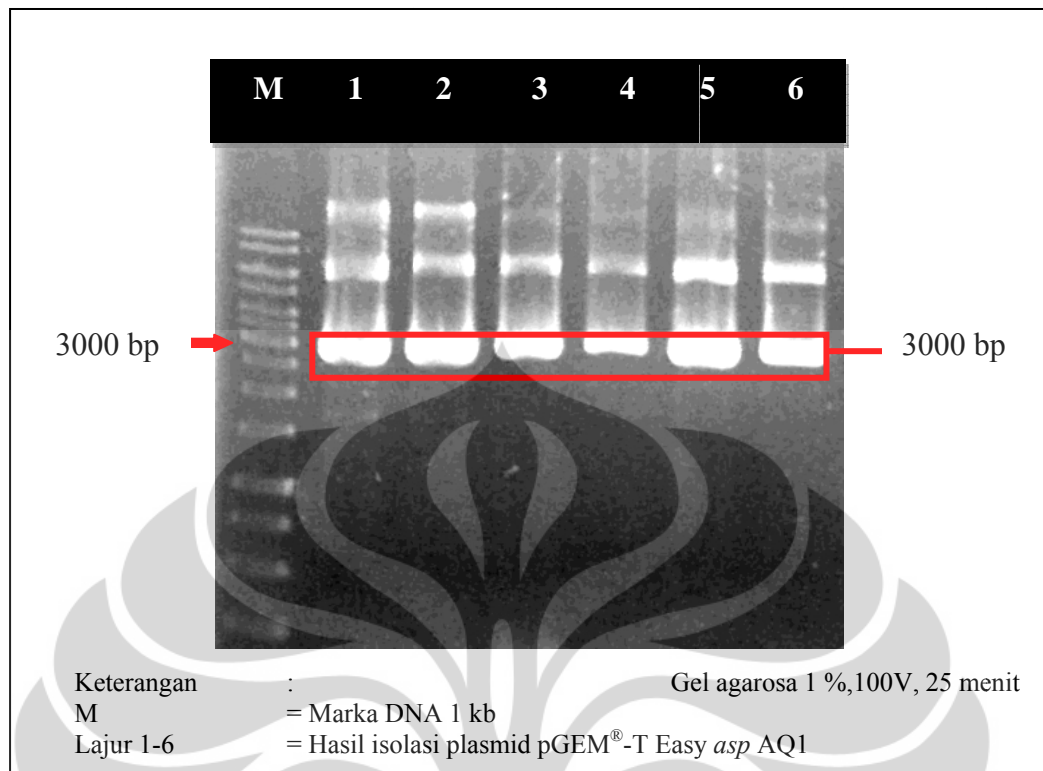
Hasil ligasi vektor pGEM[®]- T Easy dan DNA sisipan gen L-asparaginase selama 16 jam kemudian ditransformasikan ke dalam sel *E. coli* DH5 α . Proses transformasi dilakukan dengan metode *heatshock*. Transforman hasil transformasi yang tumbuh pada medium LB agar yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g/ml}$ serta ditambahkan IPTG dan X-Gal masing-masing sebanyak 30 μl adalah 94 koloni putih dan 298 koloni biru (Gambar 4.1.7). Efisiensi transformasi dari sel kompeten dapat diketahui dengan melakukan transformasi pada plasmid yang belum direstriksi dan dihitung dalam satuan cfu/ μg DNA. Plasmid yang digunakan sebagai kontrol transformasi adalah plasmid pUC19 dengan konsentrasi 10 pg. Perhitungan efisiensi transformasi dapat dilihat pada lampiran 12. Kontrol transformasi menunjukkan nilai efisiensi transformasi dari sel kompeten yang digunakan yaitu $1,02 \times 10^8$ cfu/ μg .



Gambar 4.1.7. Hasil transformasi

4.1.8 Isolasi Plasmid Rekombinan Hasil Transformasi

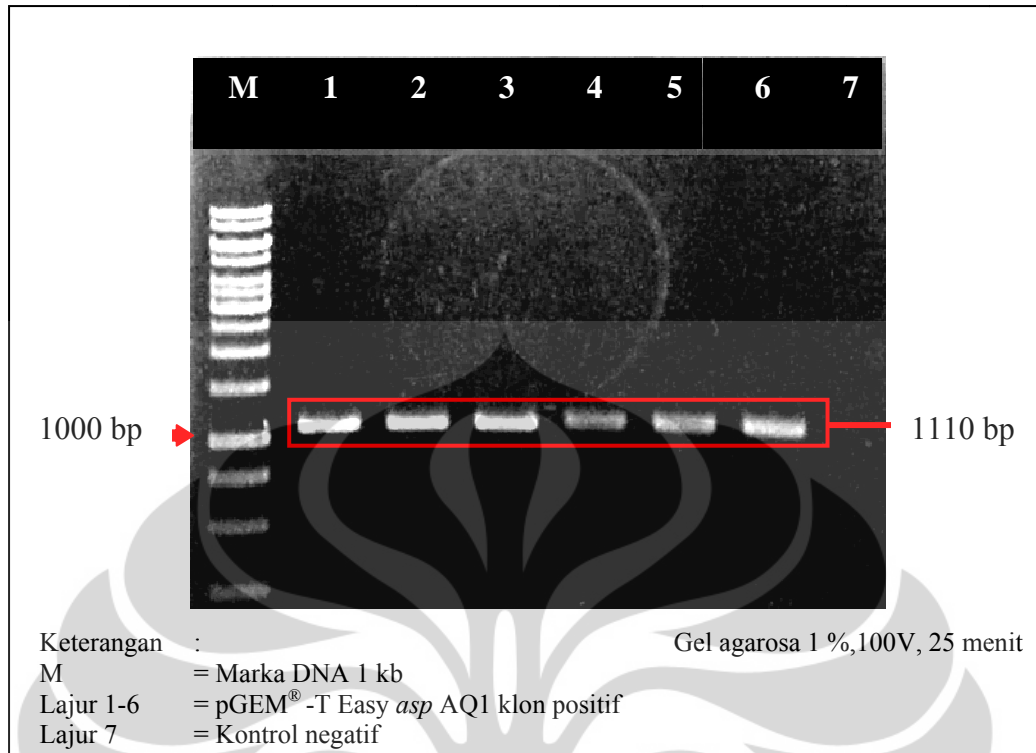
Hasil isolasi plasmid rekombinan dengan metode alkali lisis kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 4.1.8). Hasil visualisasi pada gel agarosa 1 % menunjukkan pita DNA yang berukuran 3000 bp dan *supercoiled*. Keenam sampel tersebut kemungkinan merupakan sampel positif, yaitu plasmid rekombinan yang membawa fragmen gen L-asparaginase AQ1. Akan tetapi, perlu dilakukan verifikasi dengan digesti dan PCR untuk memastikan gen sisipan sudah berhasil diklona ke vektor pGEM[®]-T Easy.



Gambar 4.1.8. Visualisasi hasil isolasi plasmid pGEM[®]-T Easy *asp* AQ1

4.1.9 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR

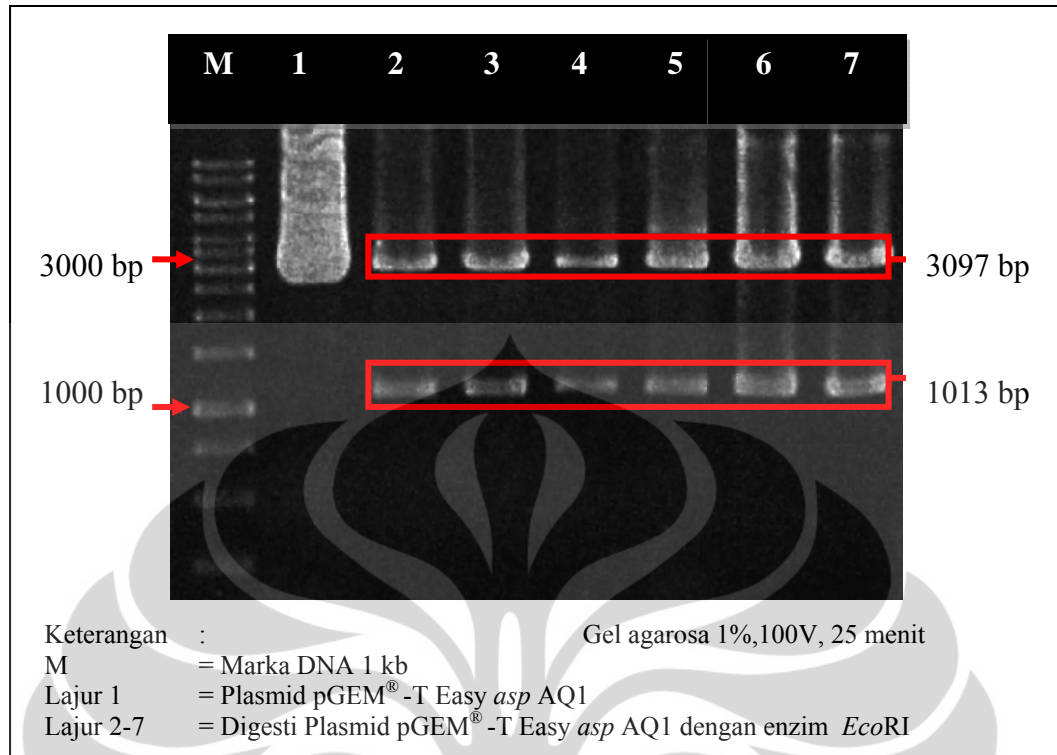
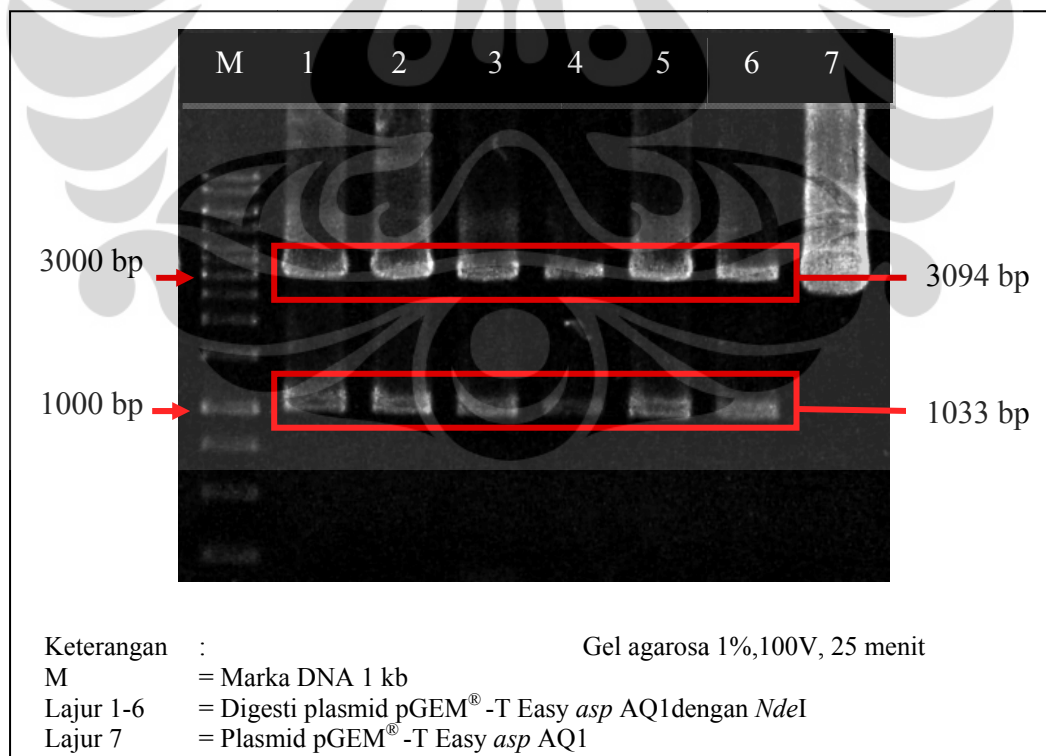
Verifikasi DNA rekombinan dengan teknik PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen L-asparaginase AQ1 dengan *overlap* PCR. Primer tersebut akan mengamplifikasi daerah promoter dan juga gen L-asparaginase. DNA *template* yang digunakan adalah hasil isolasi plasmid rekombinan. Hasil elektroforesis pada gel agarosa 1%, 100 V selama 25 menit menunjukkan keenam sampel memiliki ukuran fragmen DNA berukuran 1110 bp (Gambar 4.1.9). Hasil tersebut menunjukkan keenam sampel merupakan klon positif yang membawa gen L-asparaginase AQ1. Fragmen DNA hasil *overlap* tersebut berhasil diklona ke vektor pGEM[®]-T Easy. Kontrol negatif PCR pada lajur 7 tidak menunjukkan adanya fragmen DNA. Hal tersebut disebabkan *template* yang digunakan dalam PCR adalah akubides yang tidak mengandung DNA *insert*, sehingga fragmen DNA tidak teramplifikasi. Tidak adanya pita DNA pada kontrol negatif PCR menunjukkan tidak adanya kontaminasi (Yuwono 2006: 23).



Gambar 4.1.9. Verifikasi plasmid rekombinan dengan menggunakan teknik PCR

4.1.10 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Digesti

Verifikasi plasmid rekombinan yang mengandung gen L-asparagainase AQ1 dilakukan dengan digesti menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Visualisasi hasil digesti pada gel agarosa 1% menunjukkan terbentuknya fragmen DNA berukuran sekitar 1110 bp dan 3015 bp (Gambar 4.1.10(1)). Fragmen DNA berukuran 17 bp tidak dapat terlihat pada visualisasi dengan gel agarosa 1% karena ukuran tersebut sangat kecil dan berada di bawah kisaran marka DNA 1 kb. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel telah berhasil terdigesti. Lajur 1 adalah yaitu plasmid rekombinan yang tidak dilakukan digesti. Plasmid tersebut menunjukkan ukuran fragmen DNA 3000 bp.

Gambar 4.1.10(1). Verifikasi digesti dengan enzim *Eco*RIGambar 4.1.10(2). Verifikasi digesti dengan enzim *Nde*I

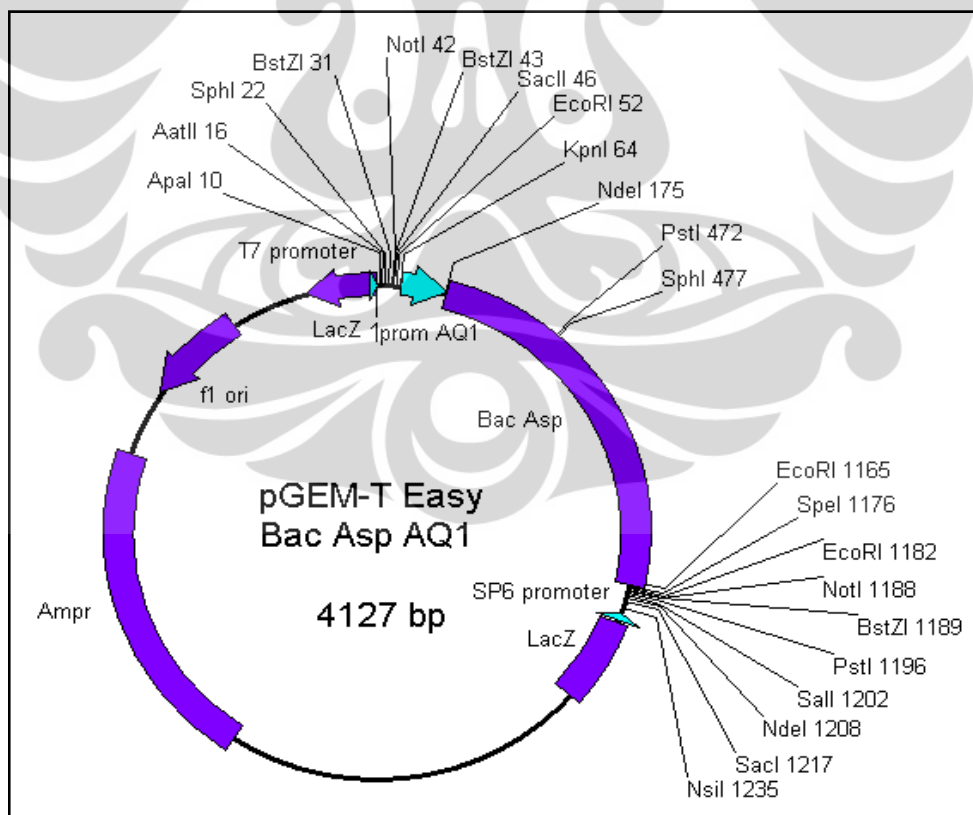
Verifikasi digesti juga dilakukan dengan menggunakan enzim *NdeI*. Hal tersebut disebabkan enzim *NdeI* terdapat pada MCS vektor pGEM[®]- T Easy dan gen sisipan L-asparaginase-AQ1. Digesti dengan enzim *NdeI* menghasilkan dua pita, yaitu berukuran 3094 bp dan 1033 bp. Hasil elektroforesis pada gel agarosa 1 %, 100 V selama 25 menit menunjukkan keenam sampel berhasil terdigesti dan memiliki orientasi yang benar (Gambar 4.1.10(2)).

4.1.11 Sekuensing dan Analisis Sekuen dengan Bioinformatika

Verifikasi plasmid rekombinan hasil subkloning ke vektor pGEM[®]- T Easy kemudian disekuensing. Proses tersebut dilakukan pada salah satu klon positif yang menunjukkan adanya DNA sisipan promoter AQ1-*asp* serta memiliki orientasi yang tepat setelah verifikasi dengan digesti dan PCR. Primer yang digunakan untuk sekuensing plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 adalah primer universal M13. Kromatogram hasil sekuensing dapat dilihat pada lampiran 13. Hasil *alignment* menunjukkan hanya terdapat perbedaan 3 basa pada ORF L-asparaginase dari *B. circulans* dengan *B. subtilis* Bsn5 (Lampiran 16). Hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan program BLASTN pada situs *online* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Analisis *blastn* menunjukkan bahwa sekuen promoter AQ1-*asp* memiliki persentase kemiripan (*maximum identity*) 100 % dengan sekuen *B. subtilis strain* AQ1 endoxylanase glycosyl hydrolase family 11 yang merupakan daerah promoter (GenBank: FJ644630.1) dan 99 % kemiripan dengan gen L-asparaginase dari *B. subtilis* Bsn5 dan 98% kemiripan dengan gen L-asparaginase dari *B. subtilis* (*ansA*), *complete* CDS; gen L-aspartase (*ansB*), *complete* CDS (Lampiran 14). Hasil tersebut menunjukkan bahwa promoter *xyn* AQ1 yang sudah digabungkan dengan gen sisipan L-asparaginase saat *overlap* PCR sudah berhasil disubkloning ke vektor pGEM[®]- T Easy. Persentase kemiripan sebesar 100% menunjukkan bahwa promoter *xyn* AQ1 yang hasil subkloning tidak mengalami mutasi atau perbedaan urutan nukleotida dengan sekuen awal. Hasil analisis *blastx* menunjukkan bahwa sekuen gen L-asparaginase AQ1 memiliki produk protein L-asparaginase tipe I yang memiliki kemiripan 99% dengan L-asparaginase yang dihasilkan oleh *B. subtilis* (Lampiran 15).

4.1.12 Konstruksi Plasmid Rekombinan pGEM[®]- T Easy *Asp* AQ1

Konstruksi plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak GENETYX VERSION 7, pDRAW, dan PLASDRAW . Konstruksi plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 menghasilkan ukuran plasmid rekombinan sebesar 4127 bp (Gambar 4.1.12), terdiri atas vektor pGEM[®]- T Easy yang berukuran 3015 bp dan gen sisipan L-asparaginase AQ1 yang berukuran 1110 bp, serta penambahan nukleotida T (timin) pada ujung 3' vektor dan nukleotida A (adenin) pada ujung 3' gen sisipan. Hasil konstruksi plasmid rekombinan menunjukkan bahwa gen L-asparaginase yang berasal dari *B. circulans* yang digabungkan dengan promoter *xyn* AQ1 sudah berhasil disubkloning ke vektor pGEM[®]- T Easy. Pembuatan konstruksi plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 bertujuan untuk menggambarkan MCS, situs enzim restriksi yang berfungsi untuk penggunaan plasmid rekombinan tersebut pada tahap selanjutnya.



Gambar 4.1.12. Konstruksi plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1

4.1.13 Produksi Enzim L-asparaginase Rekombinan

Produksi enzim L-asparaginase dilakukan dua kali, yaitu produksi pertama menggunakan plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2. sebagai kontrol negatif promoter *xyn* AQ1 dan produksi kedua menggunakan pUC 19 sebagai kontrol negatif yang tidak mengandung enzim L-asparaginase dan promoter *xyn* AQ1. *Starter* yang digunakan saat produksi enzim L-asparaginase pertama, yaitu pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2. dengan OD₆₀₀=0,820 dan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 dengan OD₆₀₀=0,814. Sampel pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 dipanen saat OD₆₀₀=0,706, sedangkan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 dipanen saat kondisi OD₆₀₀=0,701. *Starter* yang digunakan saat produksi enzim L-asparaginase kedua, yaitu pUC19 dengan OD₆₀₀=0,805 dan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 dengan OD₆₀₀=0,826. Sampel pUC 19 dipanen saat OD₆₀₀=0,753, sedangkan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 dipanen saat kondisi OD₆₀₀=0,784.

4.1.14 Pengukuran Kadar Protein

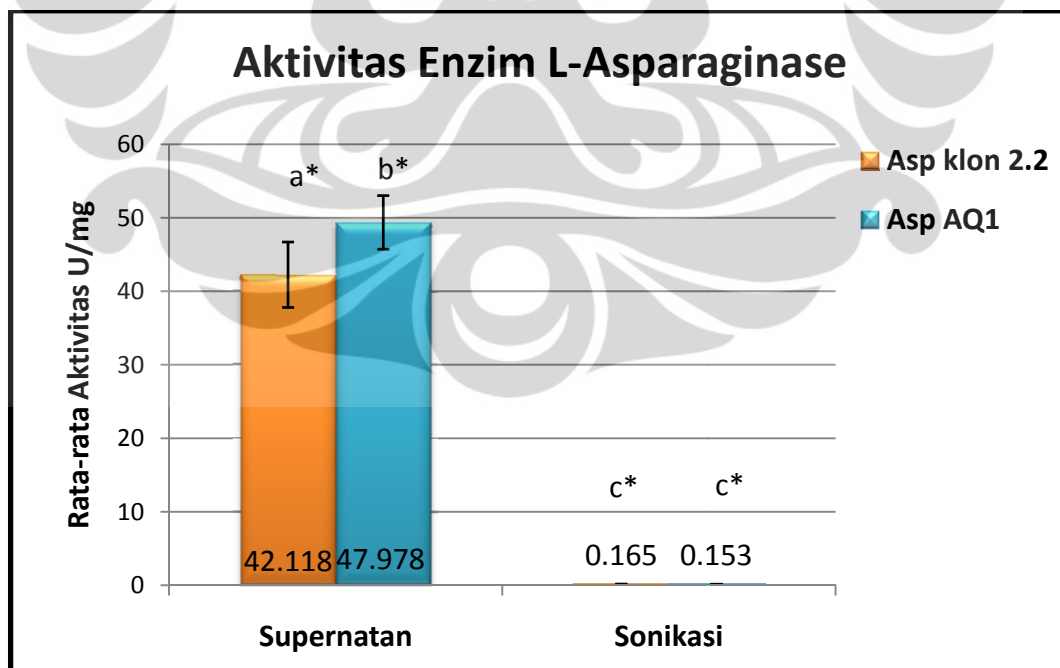
Uji protein hasil produksi enzim L-asparaginase dilakukan berdasarkan protokol Fermentas (Thermo Scientific 2011: 1--7). Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Bradford (1976) dengan modifikasi. Kadar protein dalam enzim dapat diketahui dengan membandingkan hasil pengukuran absorbansi sampel pada panjang gelombang 595 nm dengan kurva standar BSA (Lampiran 17 & 18). Protein yang diukur, yaitu dari supernatan hasil panen sel dan hasil sonikasi. Hasil pengukuran kadar protein pada panjang gelombang 595 nm menunjukkan bahwa kadar protein enzim L-asparaginase rekombinan hasil sonikasi lebih tinggi daripada kadar protein kontrol negatif (pUC19). Kadar protein enzim L-asparaginase rekombinan hasil sonikasi, yaitu 1,233 mg/ml, sedangkan kadar protein kontrol (pUC19) yaitu 1,052 mg/ml (Lampiran 23). Kadar protein enzim L-asparaginase rekombinan hasil panen sel juga lebih tinggi daripada kadar protein kontrol. Kadar protein enzim L-asparaginase rekombinan hasil panen sel, yaitu 0,0316 mg/ml, sedangkan kadar protein kontrol (pUC19) yaitu 0,0294 mg/ml (Lampiran 22). Jika dibandingkan dengan kadar protein hasil

sonikasi, kadar protein hasil panen sel lebih kecil, baik pada sampel maupun kontrol negatif. Oleh karena itu, pengukuran kadar protein hasil panen sel dilakukan dengan metode mikroprotein.

4.1.15 Uji Aktivitas Enzim L-asparaginase secara Kuantitatif

4.1.15.1 Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari pGEM *Asp* klon 2.2 dan pGEM *Asp* AQ1

Perbandingan aktivitas enzim L-asparaginase terdiri atas supernatan hasil panen sel dan hasil sonikasi. Hasil uji aktivitas enzim secara kuantitatif menunjukkan bahwa supernatan dari plasmid rekombinan pGEM *Asp* AQ1 memiliki aktivitas enzim spesifik yang lebih tinggi (47.978 U/mg), daripada kontrol pGEM *Asp* klon 2.2 (42.118 U/mg). Hasil sonikasi menunjukkan aktivitas enzim yang lebih rendah pada pGEM *Asp* AQ1 (0,153 U/mg) daripada kontrol pGEM *Asp* klon 2.2 (0,165 U/mg) (Gambar 4.1.15.1).

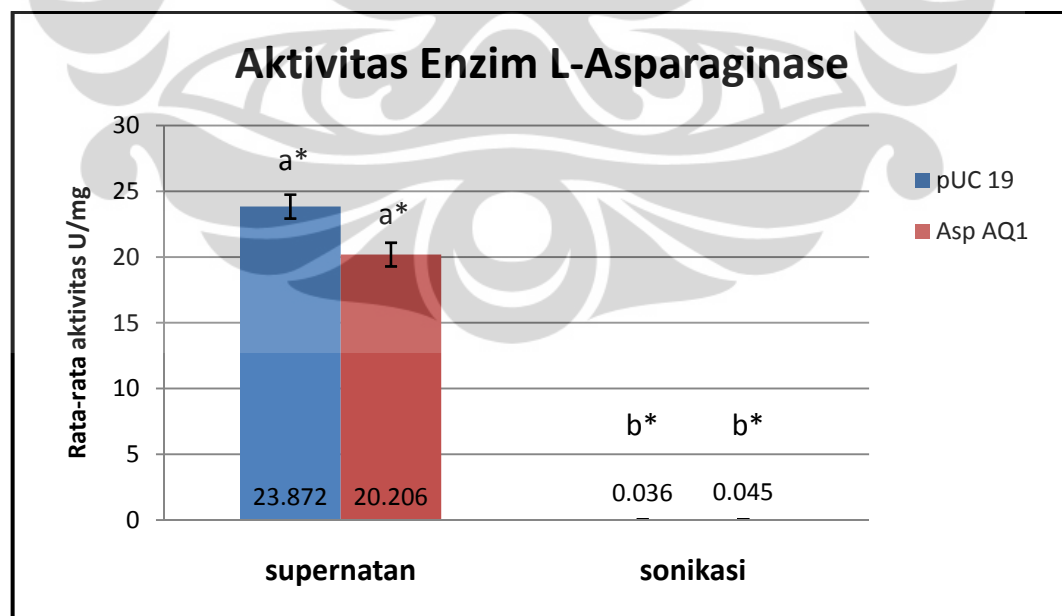


Gambar 4.1.15.1. Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari pGEM *Asp* klon 2.2 dan pGEM *Asp* AQ1

Universitas Indonesia

4.1.15.2 Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari pUC 19 dan pGEM *Asp* AQ1

Pengukuran aktivitas enzim L-asparaginase secara kuantitatif dilakukan berdasarkan modifikasi metode (Sheng *dkk.* 1993: 242--249). Enzim yang diukur aktivitasnya, yaitu dari supernatan hasil panen sel dan hasil sonikasi. Hasil uji aktivitas enzim L-asparaginase pada panjang gelombang 340 nm menunjukkan bahwa aktivitas enzim L-asparaginase rekombinan (pGEM *Asp* AQ1) hasil sonikasi lebih tinggi daripada aktivitas enzim pada kontrol negatif (pUC 19) (Gambar 4.1.15.2). Aktivitas spesifik (U/mg) dari enzim L-asparaginase rekombinan (pGEM *Asp* AQ1) hasil sonikasi, yaitu 0,045 U/mg, sedangkan aktivitas enzim (pUC19) yaitu 0,036 U/mg (Lampiran 23). Aktivitas enzim L-asparaginase rekombinan (pGEM *Asp* AQ1) dari supernatan hasil panen sel lebih rendah daripada aktivitas enzim pada kontrol (pUC19). Aktivitas spesifik (U/mg) enzim L-asparaginase hasil panen sel pada kontrol pUC19, yaitu 23.872 U/mg, sedangkan aktivitas spesifik (U/mg) dari pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 yaitu 20,206 U/mg (Lampiran 22).



Gambar 4.1.15.2. Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase dari pUC dan pGEM *Asp* AQ1

4.2 Pembahasan

4.2.1 Isolasi Plasmid pGEM[®]- T Easy *Asp* Klon 2.2

Isolasi plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* bertujuan untuk melakukan konfirmasi plasmid rekombinan yang sudah disisipkan gen L-asparaginase pada vektor pGEM[®]- T Easy. Isolasi plasmid pGEM[®]- T Easy *asp* dilakukan dengan metode *miniprep alkaline lysis*. Prinsip metode tersebut adalah melisiskan dinding sel bakteri dan memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom (Sambrook & Russell 2001a: 1.31). Metode tersebut terdiri atas tiga tahapan utama, yaitu persiapan sel, pelisisan sel, dan pemulihan DNA plasmid. Tahapan persiapan sel dilakukan dengan melakukan *pelleting* kultur bakteri yang mengandung plasmid rekombinan dengan cara sentrifugasi. Pelisisan sel dilakukan dengan menambahkan beberapa macam *solution*. *Solution I* mengandung EDTA yang berfungsi untuk menghilangkan ion magnesium yang esensial untuk menjaga struktur pembungkus sel dan mencegah enzim seluler yang dapat mendegradasi DNA (Brown 2006: 32).

Solution II mengandung *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) yang merupakan deterjen yang berfungsi untuk membantu proses lisis sel dengan menghilangkan molekul lipid, sehingga menyebabkan kerusakan membran sel bakteri. Kandungan NaOH pada *solution II* akan mendenaturasi DNA plasmid dan kromosom menjadi untai tunggal dan meningkatkan pH, serta memutuskan ikatan hidrogen (Ausubel *dkk.* 2003: 1.6.1). *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) akan mendenaturasi protein bakteri, sedangkan NaOH akan mendenaturasi DNA plasmid dan kromosom (Ausubel *dkk.* 2003: 1.6.1) menjadi untai tunggal dan meningkatkan pH, serta memutuskan ikatan hidrogen. Setelah lisis sel, tahap selanjutnya dalam ekstraksi plasmid adalah menghilangkan pengotor yang tidak larut (Brown 2006: 33). Penambahan *solution III* yang mengandung kalium asetat berfungsi untuk netralisasi presipitasi DNA (Alexander *dkk.* 2003: 230). Hal tersebut menyebabkan plasmid *covalently closed* pada DNA untuk menempel kembali dengan cepat.

Protein bakteri dan DNA dapat dipresipitasi dengan menambahkan SDS, dan akan membentuk kompleks dengan kalium kemudian akan dihilangkan

dengan sentrifugasi. Proses sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom dan protein. DNA plasmid dari supernatan yang telah menempel kembali, selanjutnya dikonsentrat dengan presipitasi isopropanol dan etanol. Etanol 70% berfungsi untuk menghilangkan sisa pengotor organik. Penambahan RNase bertujuan untuk menghilangkan kontaminasi RNA (Ausubel *dkk.* 2003: 1.6.1--1.6.2 & 1.7.1)

Hasil isolasi plasmid dianalisis dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%, 100 V, selama 25 menit. Agarosa yang digunakan memiliki konsentrasi 1% karena dapat menganalisis fragmen DNA dengan ukuran 500 bp--10.000 bp (Ausubel *dkk.* 2003: 2.5A.2). Hasil visualisasi elektroforesis gel agarosa 1% menunjukkan fragmen DNA berukuran sekitar 3000 bp (Gambar 4.1.1). Ukuran fragmen DNA tersebut tidak sesuai dengan ukuran plasmid rekombinan pGEM[®]-T Easy *Asp* klon 2.2 yang sebenarnya, yaitu sekitar 4004 bp. Hal tersebut disebabkan plasmid memiliki berbagai jenis topologi. Hasil visualisasi plasmid rekombinan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% menunjukkan tiga topologi DNA, yaitu *supercoiled*, *nicked circle*, dan linear (Gambar 4.1.1). Topologi *supercoiled* memiliki tingkat migrasi yang paling cepat, sehingga pada hasil elektroforesis berada pada posisi paling rendah, kemudian diikuti oleh topologi DNA linear dan *nicked circle*. Kecepatan migrasi DNA pada elektroforesis gel agarosa dipengaruhi oleh ukuran molekul DNA dan konsentrasi gel agarosa yang digunakan. Oleh karena itu, ukuran plasmid rekombinan pGEM[®]-T Easy *Asp* klon 2.2 lebih kecil dari ukuran sebenarnya karena memiliki bentuk *supercoiled*, sehingga migrasinya lebih cepat (Sambrook & Russell 2001a: 5.4--5.7)

Hasil pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan *nanodrop spectrophotometer* menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 3176,9 ng/μl dan kemurnian DNA (A_{260}/A_{280})= 1,92. Hasil isolasi menunjukkan bahwa tidak adanya kontaminasi zat pengotor. Hal tersebut disebabkan perbandingan rasio absorbansi antara panjang gelombang 260 nm dan 280 nm masih berkisar antara 1,8--2,0. Rasio di atas 2,0 menunjukkan terjadinya kontaminasi sampel dengan RNA, sedangkan rasio di bawah 1,8 menunjukkan kontaminasi sampel dengan protein (Sambrook & Russell 2001: A8.20).

4.2.2 Amplifikasi Promoter *xyn* AQ1

Amplifikasi promoter *xyn* AQ1 dilakukan dengan suhu *annealing* sebesar 63°C. Amplifikasi promoter *xyn* AQ1 tidak dilakukan dengan PCR *touchdown* karena suhu *annealing* antara primer *forward* (63,7°C) tidak jauh berbeda dengan primer *reverse* (61,8 °C). Amplifikasi promoter *xyn* AQ1 menggunakan *hot start* PCR. *Hot start* PCR merupakan salah satu metode PCR untuk optimasi hasil dari amplifikasi gen target yang diinginkan serta menekan amplifikasi yang tidak spesifik. Hal tersebut dilakukan dengan menunda penambahan komponen PCR yang penting, yaitu DNA polimerase sampai campuran reaksi dipanaskan pada suhu yang dapat mencegah primer nonspesifik dan primer oligomerisasi. Semua *reaction mixture* dicampurkan sebelum dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler*, kecuali enzim DNA polimerase dimasukkan terakhir setelah suhu mencapai 98°C (Sambrook & Russell 2001: 835--8.110). Visualisasi elektroforesis gel hasil amplifikasi promoter *xyn* AQ1 dilakukan dengan menggunakan gel agarosa 2% karena agarosa dengan konsentrasi 2% dapat memisahkan fragmen DNA berukuran 100 bp--2000 bp (Sambrook & Russell 2001: 5.12). Oleh karena itu, fragmen promoter *xyn* AQ1 yang berukuran 139 bp dapat divisualisasi dengan baik pada gel agarosa 2% (Gambar 4.1.3). Primer yang digunakan untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1 terdiri atas primer *forward* A yang sudah ditambahkan adaptor dan situs restriksi *KpnI* serta primer *reverse* B yang memiliki daerah yang *overlap* dengan fragmen DNA L-asparaginase (Tabel 4.2.2).

Tabel 4.2.2. Sekuen primer untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1

	Primer	Sekuen
A	Primer <i>forward</i> (<i>Xyn11proF1</i>)	5'GGGGTACCTAGCGTGGTATTATACTGAAG GGG3' (<i>KpnI</i>)
B	Primer <i>reverse</i> (<i>xynpromaqbcir</i> <i>rev</i>)	5'GTCAACATCAGTAATTTTTTCATATGTTA CCTCCTCCTATAC3'

4.2.3 Amplifikasi Gen L-asparaginase

Amplifikasi gen Lasparaginase dilakukan dengan menggunakan *template* hasil isolasi plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2. Ukuran keseluruhan DNA sisipan yang akan disubkloning adalah 1010 bp, terdiri atas gen L-asparaginase berukuran 987 pb, dengan penambahan primer untuk *overlap* PCR, adaptor enzim restriksi *NdeI* (5'CATATG3'), dan pada ujung 3' ditambahkan adaptor dan situs restriksi *EcoRI* (5'GAATTC3') (Tabel 4.2.3). Adaptor adalah molekul oligonukleotida sintetik yang memiliki ujung *sticky end*. Tujuan penambahan adaptor, yaitu untuk melakukan ligasi ujung rata dari adaptor ke fragmen DNA yang memiliki ujung rata, sehingga dihasilkan fragmen baru yang memiliki ujung kohesif (Brown 2006: 81).

Tabel 4.2.3. Sekuen primer untuk amplifikasi gen L-asparaginase

	Primer	Sekuen
C	Primer <i>forward</i> (<i>xynpromaqaspcirfor</i>)	5'GTATAGGAGGTAACATATGAAAAAA TTACTGATGTTGAC3'
D	Primer <i>reverse</i> (<i>Eco Bac Asp</i>)	5'GGAATTCTTACAGGATAACGTCAGC GATCG 3' (<i>EcoRI</i>)

Enzim DNA polimerase yang digunakan, yaitu HF (*high fidelity*) DNA polimerase. Hal tersebut disebabkan enzim tersebut bebas dari endonuklease maupun eksonuklease. Enzim HF (*high fidelity*) dapat meningkatkan akurasi dari amplifikasi gen sisipan. Selain itu, waktu yang untuk amplifikasi gen sisipan lebih cepat jika dibandingkan amplifikasi dengan *Taq* DNA polimerase. Denaturasi harus dilakukan pada suhu 98°C. Hal tersebut disebabkan kondisi PCR dengan menggunakan enzim HF DNA polimerase cenderung bekerja baik jika suhu denaturasi dan *annealing* tinggi karena konsentrasi garam tinggi [Finnzymes 2010: 1--2). Program PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen L-asparaginase adalah *touchdown* (dengan penurunan suhu *annealing* sebesar -0,3°C setiap siklusnya). Suhu *annealing* yang digunakan berkisar antara 68°C--62°C

(Lampiran 5). *Touchdown* PCR dilakukan untuk optimasi DNA yang diamplifikasi ketika T_m (*time melting*) antara primer *forward* dan primer *reverse* berbeda jauh (Sambrook & Russell 2001: 8.112). Optimasi Suhu *annealing* sangat penting karena dapat mempengaruhi spesifisitas reaksi PCR. Hibridisasi DNA sangat tergantung kepada pengaturan suhu. Jika suhu terlalu tinggi, maka tidak akan terjadi hibridisasi karena primer dan *template* mengalami disosiasi. Akan tetapi, suhu yang terlalu rendah akan menghasilkan *mismatched hybrid*, yaitu terbentuknya kesalahan pasangan basa (Brown 2006: 186).

Fragmen DNA sisipan hasil PCR kemudian dipurifikasi dengan menggunakan *Gel DNA Fragment Extraction Kit* [Geneaid]. Prinsip kerja *kit* tersebut adalah purifikasi DNA menggunakan kolom penukar ion yang dapat memurnikan fragmen DNA dengan ukuran 100 bp--10.000 bp (Geneaid 2003: 1). Purifikasi bertujuan untuk menghilangkan sisa reagen yang digunakan dalam PCR. Hasil purifikasi yang divisualisasikan pada gel agarosa 1 % menunjukkan adanya satu fragmen DNA dengan ukuran 1010 bp. Fragmen DNA tersebut merupakan fragmen yang akan digabungkan dengan promotor AQ1 pada proses *overlap* PCR. Hasil purifikasi terhadap produk PCR memperlihatkan pita DNA tunggal yang berukuran 1010 bp (Gambar 4.1.4(2)). Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses purifikasi yang dilakukan berhasil. Proses purifikasi bertujuan untuk membersihkan pita DNA produk PCR dari berbagai kontaminan seperti protein dan enzim. Adanya kontaminan tersebut dapat menurunkan efisiensi dari enzim restriksi pada saat dilakukan digesti. Hal tersebut dapat berakibat pula terhadap penurunan efisiensi ligasi dan transformasi (Ausubel *dkk.* 2003: 2.1.1)

4.2.4 *Overlap* PCR

Empat primer dibutuhkan untuk melakukan amplifikasi dengan menggunakan metode *overlap* PCR (A, B, C, dan D). Sepasang primer digunakan untuk mengamplifikasi promotor *xyn* AQ1 yang berada pada sekuens hulu (A dan B). Primer *forward* A (Tabel 4.2.3) akan mengamplifikasi promotor *xyn* AQ1 yang akan diintroduksi dengan *template* gen L-asparaginase. Primer *reverse* (B) memiliki sekuens yang *overlap* dengan sekuens dari gen L-asparaginase (Tabel

4.2.3). Primer pada bagian 5' telah ditambahkan dengan situs enzim restriksi *KpnI* yang bertujuan untuk memfasilitasi proses subkloning pada tahap selanjutnya.

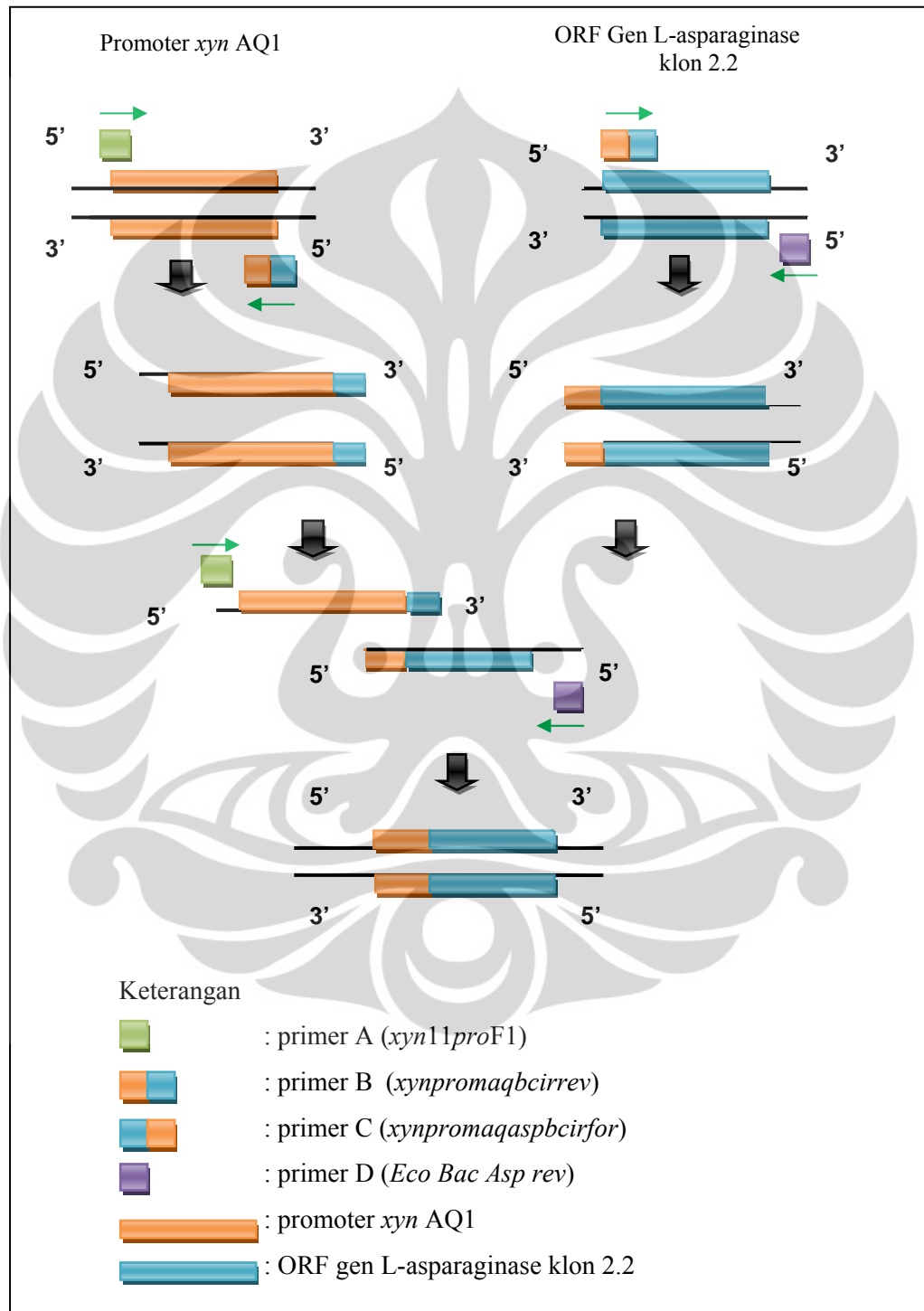
Pasangan primer yang kedua digunakan untuk mengamplifikasi DNA dengan sekuens pada bagian hilir (C dan D). Primer *forward* dari pasangan tersebut mengandung sekuens yang *overlap* dengan sekuens promotor *xyn* AQ1. Sekitar 15 basa dari primer *reverse* (B) merupakan komplemen primer *forward* (C). Dua pasang primer tersebut digunakan untuk mengamplifikasi dua reaksi yang berbeda untuk amplifikasi fragmen DNA yang bersifat *overlap*. Pasangan primer yang pertama digunakan untuk amplifikasi promotor *xyn* AQ1 dan amplifikasi gen L-asparaginase, sedangkan pasangan primer yang kedua digunakan untuk amplifikasi promotor *xyn* AQ1 yang diintroduksi ke gen L-asparaginase pada bagian *overlap* dari kedua sekuens fragmen DNA tersebut.

Tabel 4.2.4 Sekuen primer untuk *overlap* PCR

	Primer	Sekuen
A	Primer <i>forward</i> (<i>Xyn11proF1</i>)	5'GGGGTACCTAGCGTGGTATTATACTGAAG GGG 3' (<i>KpnI</i>)
D	Primer <i>reverse</i> (<i>Eco Bac Asp</i>)	5'GGAATTCTTACAGGATAACGTCAGCGATC G 3' (<i>EcoRI</i>)

Fragmen DNA yang bersifat *overlap* pada gen L-asparaginase dan promotor *xyn* AQ1 yang dihasilkan dari amplifikasi pertama dan amplifikasi kedua kemudian digabung. Fragmen yang sudah digabungkan tersebut kemudian diamplifikasi dengan menggunakan pasangan primer *forward* (A) dan *reverse* (D) dari amplifikasi pertama dan kedua (Tabel 4.2.4). Metode *overlap* PCR sangat efektif karena penggabungan fragmen gen L-asparaginase dan promotor *xyn* AQ1 dapat dilakukan secara independen tanpa membutuhkan situs restriksi. Akan tetapi, membutuhkan empat macam primer yang berbeda, daerah oligonukleotida yang *overlap*, dan tiga siklus PCR yang berbeda (Higuchi *dkk.*1988: 7366). Empat macam primer yang berbeda (A, B, C, D) digunakan untuk amplifikasi dua jenis fragmen DNA yang berbeda, yaitu promotor *xyn* AQ1, ORF L-asparaginase,

dan amplifikasi dengan *overlap* PCR untuk menggabungkan kedua jenis fragmen tersebut. Skema *overlap* PCR untuk menghasilkan rekombinan promoter *xyn* AQ1-asparaginase dapat dilihat pada gambar 4.2.4.



Gambar 4.2.4. Skema *overlap* PCR

4.2.5 Pengukuran Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA merupakan komponen penting dalam menentukan reaksi ligasi. Konsentrasi DNA hasil *overlap* PCR yang akan digunakan sebagai DNA sisipan, yaitu DNA 100,4 ng/μl dan kemurnian DNA (A_{260}/A_{280})=1,84. Hasil pengukuran konsentrasi DNA tersebut dapat digunakan sebagai pertimbangan untuk menentukan rasio vektor dan *insert* yang akan digunakan pada proses ligasi.

4.2.6 Ligasi Gen L-Asparaginase dan Vektor pGEM[®]- T Easy

Produk hasil *overlap* PCR kemudian dilakukan *A-tailing*. Sebelum melakukan *A-tailing*, produk PCR harus dipurifikasi terlebih dahulu untuk menghilangkan semua DNA polimerase. Hal tersebut dapat mendegradasi *A overhangs* dan menghasilkan kembali produk PCR *blunt end*. Penambahan dNTP *mix* pada reaksi *A-tailing* berfungsi untuk menambahkan dATP pada ujung 3' dari gen sisipan. Hal tersebut disebabkan vektor pGEM[®]- T Easy memiliki *T-overhangs* yang akan berikatan dengan *A-overhangs* dari gen sisipan (Frackman & Kephart 1999: 8--11). Produk hasil *A-tailing* dan vektor pGEM[®]- T Easy kemudian diligasi dengan menggunakan enzim T4 DNA ligase pada suhu 4°C selama 16 jam. Suhu dan waktu inkubasi tersebut akan meningkatkan jumlah maksimum dari rekombinan. Optimalisasi rasio molar antara vektor dan *insert* pada reaksi ligasi perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil kloning yang baik (Promega 2010: 10--15).

Jumlah DNA yang dibutuhkan dalam reaksi *A-tailing* dan volume ligasi harus diatur tergantung dari hasil molar dari produk PCR. Jika konsentrasi molar tinggi dengan ukuran fragmen kecil dan amplifikasi baik, maka hanya sedikit volume fragmen PCR yang dibutuhkan untuk reaksi *A-tailing* dan ligasi. Plasmid yang digunakan dalam subkloning merupakan vektor kloning TA, yaitu plasmid yang memiliki *T-overhang* (menggantung) di daerah dekat MCS (*multi cloning site*). Daerah tersebut merupakan daerah tempat memasukkan gen sisipan ke vektor pengklonaan. Hal tersebut akan meningkatkan efisiensi ligasi untuk produk

PCR dan mencegah terjadinya resirkulasi (melingkar kembali) vektor sebelum penempelan gen sisipan (Frackman & Kephart 1999: 8--11).

4.2.7 Transformasi ke dalam *E. coli* DH5 α

Vektor pGEM[®]- T Easy dan DNA sisipan gen L-asparaginase AQ1 yang sudah diligasi kemudian dilakukan transformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α . Sel tersebut sebelumnya sudah dibuat kompeten terlebih dahulu agar dapat menyerap DNA asing (Alexander *dkk.* 2003: 254--255). Kualitas sel kompeten yang akan digunakan dalam transformasi dapat diketahui dengan melakukan *heatshock* pada kontrol atau plasmid standar, misalnya plasmid pUC19. Hasil transformasi ditumbuhkan pada medium LB agar yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 μ g/ml, IPTG sebanyak 30 μ l, dan X-Gal sebanyak 30 μ l, yang berfungsi dalam proses *screening*. Hal tersebut disebabkan vektor pGEM[®]- T Easy memiliki gen resistensi ampisilindan gen *LacZ*, sehingga identifikasi plasmid rekombinan dapat dilakukan dengan teknik *blue white screening* (Promega 2010: 2).

Kontrol positif pada transformasi berfungsi untuk memastikan kualitas sel kompeten, sedangkan kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui kemungkinan terjadinya kontaminasi (Sambrook & Russell 2001: 1.111). Kontrol positif merupakan hasil transformasi vektor pUC 19 tanpa ditambahkan DNA sisipan. Kontrol negatif menunjukkan sel kompeten tidak tumbuh pada medium LB agar yang ditambahkan ampisilin. Hasil tersebut menunjukkan sel kompeten dalam kualitas baik. Efisiensi transformasi ke dalam *E. coli* DH5 α pada medium LB ampisilin adalah $1,02 \times 10^8$ cfu/ μ g (Lampiran 12). Efisiensi transformasi yang didapatkan tergolong baik, yaitu diantara 10^7 -- 10^9 cfu/ μ g. (Sambrook & Russell 2001: 1.25--1.26). Efisiensi transformasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain teknik yang digunakan untuk membuat sel kompeten, sel yang digunakan, konsentrasi DNA, suhu dan waktu selama penyimpanan sel kompeten sebelum digunakan, dan medium kultur (Tu *dkk.* 2005: 116--119).

Strain E. coli DH5 α digunakan sebagai sel inang karena memiliki gen *recA1* yang dapat meningkatkan stabilitas gen sisipan, sehingga dapat

meningkatkan efisiensi transformasi (Karcher 1995: 94). Koloni putih yang tumbuh pada medium seleksi kemungkinan mengandung plasmid rekombinan yang membawa gen sisipan. Bakteri *E. coli* DH5 α yang membawa vektor rekombinan dapat tumbuh pada medium seleksi karena vektor rekombinan tersebut memiliki gen *LacZ*, yaitu penanda resisten terhadap antibiotik ampisilin (*Amp^r*). Koloni menjadi berwarna putih karena adanya penyisipan gen L-asparaginase AQ1 pada vektor, sehingga gen *LacZ* tidak dapat mengekspresikan enzim β -galaktosidase. Hal tersebut mengakibatkan X-gal tidak dapat terhidrolisis, sehingga tidak menghasilkan warna biru. Koloni yang berwarna biru menunjukkan tidak adanya gen L-asparaginase yang menyisip pada vektor (Sambrook & Russell 2001: 1.148).

4.2.8 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Teknik PCR

Verifikasi DNA rekombinan dengan teknik PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer spesifik untuk amplifikasi gen L-asparaginase AQ1 dengan *overlap* PCR. Primer tersebut akan mengamplifikasi daerah promoter dan juga gen L-asparaginase. DNA *template* yang digunakan adalah hasil isolasi plasmid rekombinan. Verifikasi plasmid rekombinan dengan teknik PCR bertujuan untuk menguji keberhasilan insersi gen L-asparaginase AQ1 ke vektor pGEM[®]-T Easy. Hasil elektroforesis pada gel agarosa 1%, 100 V selama 25 menit menunjukkan keenam sampel memiliki ukuran fragmen DNA berukuran 1110 bp. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen L-asparaginase AQ1 telah berhasil diklona ke dalam vektor pGEM[®]-T Easy. Kontrol negatif PCR tidak menunjukkan adanya fragmen DNA. Hal tersebut disebabkan *template* yang digunakan dalam PCR adalah akubides yang tidak mengandung DNA *insert*, sehingga fragmen DNA tidak teramplifikasi. Tidak adanya pita DNA pada kontrol negatif PCR menunjukkan tidak adanya kontaminasi. Kontrol tersebut berfungsi untuk mengetahui bahwa proses PCR berjalan dengan baik (Yuwono 2006: 23).

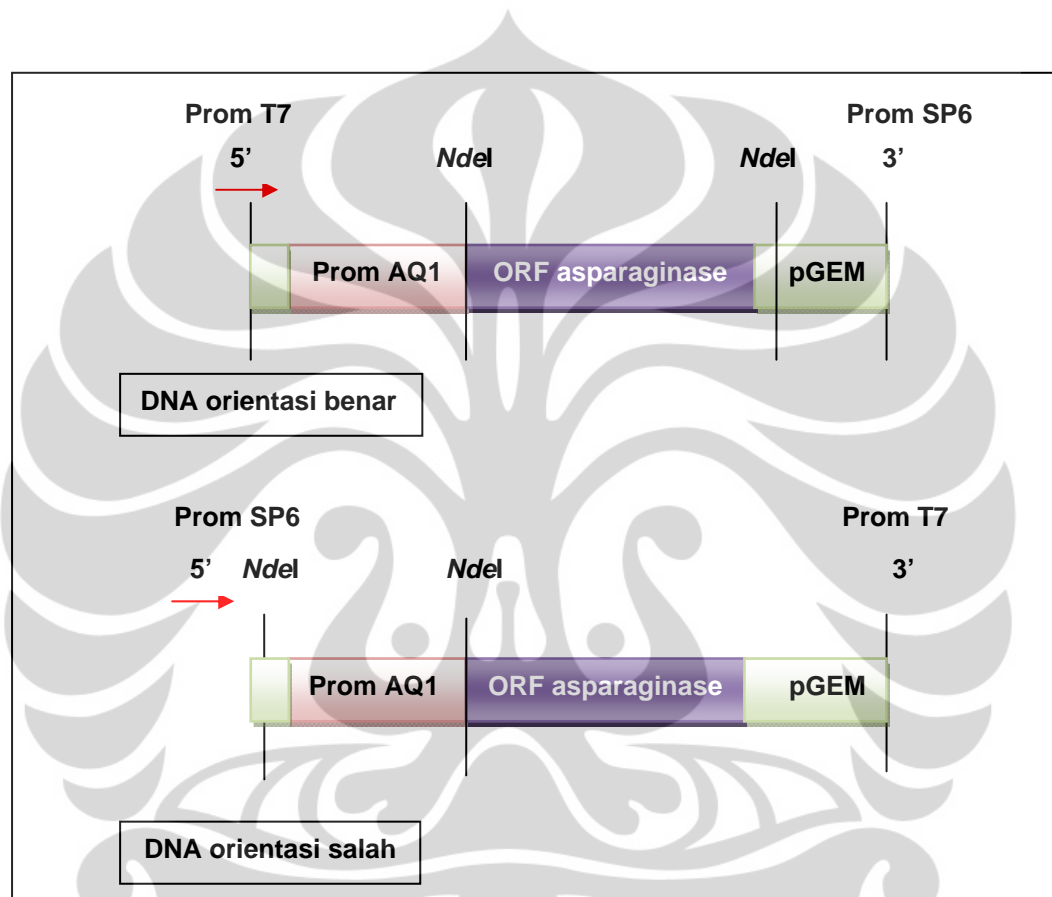
4.2.9 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Menggunakan Teknik Digesti

Verifikasi plasmid rekombinan yang mengandung gen L-asparaginase-AQ1 juga dilakukan dengan digesti menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Enzim *EcoRI* digunakan untuk verifikasi digesti karena enzim tersebut terdapat pada MCS plasmid pGEM[®]- T Easy, sehingga hasil digesti akan memisahkan secara jelas antara fragmen DNA *insert* dan vektor. *Template* yang digunakan untuk digesti merupakan hasil isolasi plasmid rekombinan. Hasil digesti menunjukkan terbentuknya dua fragmen DNA berukuran sekitar 1113 kb dan 2997 kb (Gambar 4.1.10(1)).

Kondisi digesti dilakukan pada suhu 37°C karena mayoritas enzim restriksi aktif pada suhu 37°C. Waktu inkubasi yang dibutuhkan untuk reaksi digesti pada verifikasi DNA rekombinan hanya 1,5 jam. Hal tersebut disebabkan enzim *EcoRI* memiliki *star activity*, sehingga akan mengakibatkan perubahan spesifisitas saat pemotongan jika waktu digesti berlebihan atau kondisi *buffer* yang tidak optimal (Karcher 1995: 73).

Verifikasi hasil isolasi DNA rekombinan yang diduga mengandung sisipan gen L-asparaginase-AQ1 dilakukan dengan teknik digesti menggunakan enzim *NdeI*. Hal tersebut disebabkan enzim *NdeI* terdapat pada MCS vektor pGEM[®]- T Easy dan gen sisipan L-asparaginase-AQ1. Enzim tersebut memotong di dua situs pada plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1. Enzim restriksi *NdeI* dari arah promotor T7 terletak setelah promotor *xyn* AQ1 dan setelah ORF L-asparaginase (Gambar 4.2.9). Oleh karena itu, jika orientasi penyisipan gen L-asparaginase-AQ1 benar, maka digesti dengan enzim *NdeI* akan menghasilkan dua pita, yaitu berukuran 3094 bp dan 1033 bp. Hasil orientasi penyisipan gen L-asparaginase-AQ1 yang tidak benar menunjukkan hal yang sebaliknya, yaitu gen sisipan L-asparaginase-AQ1 terletak setelah promotor SP6, sehingga akan menghasilkan dua pita yang berukuran 3947 bp dan 180 bp. Oleh karena itu, digesti dengan menggunakan enzim restriksi *NdeI* dapat memastikan bahwa orientasi gen L-asparaginase AQ1 yang masuk ke dalam vektor pGEM[®]- T Easy adalah benar. Hasil elektroforesis pada gel agarosa 1 %, 100 V selama 25 menit menunjukkan bahwa keenam sampel telah berhasil terdigesti dengan enzim

restriksi *NdeI* dan memiliki orientasi yang benar (Gambar 4.1.10(2)). Orientasi yang benar akan menghasilkan protein rekombinan yang diinginkan saat proses ekspresi, sedangkan orientasi penyisipan DNA *insert* yang salah dapat mengakibatkan tidak dihasilkannya protein rekombinan yang diinginkan. Hal tersebut terjadi karena sekuen nukleotida yang terbaca saat translasi tidak sesuai dengan yang seharusnya karena orientasinya terbalik (Ausubel *dkk.* 2002: 3.17.6).



Gambar 4.2.9. Orientasi *insert* terhadap vektor

4.2.10 Sekuensing dan Analisis Hasil Sekuen dengan Bioinformatika

Verifikasi plasmid rekombinan hasil subkloning ke vektor pGEM[®] - T Easy kemudian di sequensing. Proses tersebut dilakukan pada salah satu klon positif yang menunjukkan adanya DNA sisipan promoter AQ1-*asp* serta memiliki orientasi yang tepat setelah verifikasi dengan digesti dan PCR. Primer yang digunakan untuk sequensing plasmid pGEM[®] - T Easy *asp* AQ1 adalah primer

universal M13. Hal tersebut disebabkan vektor pGEM[®]- T Easy memiliki situs pengikatan primer M13 *forward* dan *reverse* yang dapat digunakan untuk sekuensing (Primrose 2001: 84).

Hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan program BLASTN pada situs *online* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Analisis BLASTN menunjukkan bahwa sekuen promotor AQ1-*asp* memiliki persentase kemiripan (*maximum identity*) sekitar 100 % dengan sekuen *B. subtilis strain* AQ1 endoxylanase glycosyl hydrolase family 11 yang merupakan daerah promotor (GenBank: FJ644630.1), 99% kemiripan dengan L-asparaginase dari *B. subtilis* BSn5, dan 98 % kemiripan dengan gen *B. subtilis* L-asparaginase (*ansA*), *complete* CDS; gen L-aspartase (*ansB*), *complete* CDS. Hasil tersebut menunjukkan bahwa promotor *xyn* AQ1 yang sudah digabungkan dengan gen sisipan L-asparaginase saat *overlap* PCR sudah berhasil disubkloning ke vektor pGEM[®]- T Easy. Persentase kemiripan sebesar 100% menunjukkan bahwa promotor *xyn* AQ1 yang hasil subkloning tidak mengalami mutasi atau perbedaan urutan nukleotida dengan sekuen awal. Persentase *identity* yang besar menunjukkan bahwa gen *asp* AQ1 memiliki sifat *conserved*, sehingga hanya terjadi mutasi pada beberapa sekuen *asp* AQ1. Hasil sekuensing klon positif juga menunjukkan adanya situs S-D (Shine Dalgarno) 5'AGGAGGT3' yang terletak antara posisi -6 dan -12 dari daerah hulu dari kodon inisiasi ATG. Hasil tersebut sama dengan sekuen dari situs S-D yang ada pada *B. subtilis*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa daerah tersebut bersifat *conserved* (Ruller *dkk.* 2006: 9). Sekuen L-asparaginase hasil subkloning ke vektor pGEM[®]- T Easy memiliki ORF yang lengkap tanpa adanya *frame shift* dan memiliki kodon inisiasi ATG dan kodon *stop* TAA. Oleh karena itu, sekuen DNA tersebut diprediksi sebagai gen yang fungsional yang dapat diekspresikan (Helianti 2007: 58).

4.2.11 Produksi Enzim L-Asparaginase Rekombinan

Produksi enzim L-asparaginase dilakukan dengan melakukan inokulasi 1 koloni tunggal hasil *streak* plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 ke dalam 10 ml medium LB cair yang sudah ditambahkan ampisilin dengan

konsentrasi akhir 100 µg/ml. Kandungan tripton dalam medium LB berperan untuk memberikan suplay asam amino, sedangkan *yeast extract* menyediakan suplay nitrogen (Brown 2006: 30).

Produksi enzim L-asparaginase juga menggunakan plasmid pUC 19 sebagai kontrol negatif yang tidak mengandung enzim L-asparaginase dan promoter *xyn* AQ1. Sebanyak masing-masing 10% inokulum dipindahkan ke medium M9 yang sudah ditambahkan ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml. Medium M9 tersebut sudah ditambah dengan konsentrasi L-asparagine (0,5 % w/v). Medium M9 merupakan medium yang seluruh komponennya sudah diketahui dengan pasti. Medium M9 digunakan pada proses produksi enzim L-asparaginase karena mengandung campuran nutrien anorganik yang menyediakan unsur esensial seperti nitrogen, magnesium, dan kalsium, seperti glukosa dan karbon sebagai sumber energi, sehingga diharapkan enzim L-asparaginase rekombinan pada sel inang *E. coli* DH5α dapat diproduksi dengan optimal (Brown 2006: 29).

Kultur sel *E. coli* DH5α diinkubasi pada suhu 37°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimal bagi pertumbuhan dan metabolisme *E. coli* (Holt *dkk.* 1994: 179). Kultur tersebut juga diinkubasi dalam *shaker incubator* yang bertujuan untuk memperbesar kontak yang terjadi antara *E. coli* dan medium, sehingga nutrisi yang didapatkan *E. coli* merata, sehingga dapat tumbuh optimal (Cappucino & Sherman 2002: 6). *Starter* yang digunakan saat produksi enzim L-asparaginase, yaitu kultur *E. coli* yang masing-masing mengandung pUC19 dengan OD₆₀₀=0,805 dan pGEM[®]-T Easy *asp* AQ1 dengan OD₆₀₀=0,826. *Starter* yang digunakan untuk produksi enzim sebaiknya berkisar antara OD₆₀₀=0,6--0,8. Pertumbuhan kultur bakteri dapat dilihat melalui pengukuran *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm, di mana panjang gelombang 1 OD unit akan merespons sekitar $0,8 \times 10^9$ sel/ml (Brown 2006: 30). Konsentrasi sel pada kultur dapat ditentukan dengan spektrofotometer dengan mengukur jumlah cahaya yang diserap oleh kultur pada panjang gelombang 600 nm (Ausubel *dkk.* 2003: 1.2.2). Hal tersebut disebabkan dengan kisaran OD tersebut, sel bakteri sedang berada dalam fase *log*. Panen sel bakteri juga harus dilakukan dengan kisaran OD yang sama untuk kedua sampel. Sampel *E. coli*

(pUC 19) dipanen saat $OD_{600}=0.753$ sedangkan *E. coli* (pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1) dipanen saat kondisi $OD_{600}=0,784$.

Pelet hasil sentrifugasi saat panen sel kemudian diresuspensi dengan 5 ml *buffer* Na fosfat pH 7 yang sudah ditambahkan mercaptoetanol 1 mM. *Buffer* Na fosfat pH 7 berfungsi sebagai larutan penyangga (*buffer*). Mercaptoetanol 1 mM merupakan larutan lisis *buffer* yang digunakan untuk meresuspensi pelet sebelum dilakukan proses sonikasi (Kneusel *dkk.* 2000: 931; Seidman & Moore 2000: 492 & 496). Pelet yang sudah diresuspensi kemudian dilakukan sonikasi selama 5 menit, dengan 20 detik *on* dan 20 detik *off* (skala 8 Hz dari 10 Hz) pada suhu 4°C. Sonikasi bertujuan untuk melisis dinding sel bakteri dan mengeluarkan enzim yang berada pada ruang periplasmik. Hal tersebut disebabkan karena enzim yang dihasilkan oleh *E. coli* disekresikan secara intraseluler, sehingga tidak dapat disekresikan secara langsung ke medium. Sonikasi harus dilakukan dalam keadaan dingin, yaitu sampel disimpan di atas es supaya tidak terjadi kenaikan suhu selama sonikasi. Hal tersebut dapat menyebabkan kerusakan protein rekombinan. Pengotor sel dihilangkan dengan sentrifugasi 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C (Jain *dkk.* 2012: 30). Supernatan hasil sonikasi digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim L-asparaginase.

4.2.12 Pengukuran Kadar Protein

Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode Bradford. Hal tersebut disebabkan metode Bradford lebih sensitif daripada metode Lowry. Selain itu, metode Lowry juga sulit untuk menentukan nilai kuantitatif protein pada larutan standar (Bradford 1976: 250). Reagen Bradford *ready-to-use* digunakan untuk estimasi konsentrasi total dari protein dalam suatu larutan secara cepat dan akurat. Pengukuran kadar protein menggunakan reagen Bradford tergantung pada pembentukan kompleks antara pewarna *Coomassie Brilliant Blue* G-250 dan protein dalam larutan. Pengikatan tersebut menyebabkan pengalihan absorpsi maksimum dari pewarna dari 465 nm to 595 nm. Kompleks pengikatan antara protein dan pewarna memiliki koefisien perbedaan yang tinggi, sehingga meningkatkan sensitivitas pengukuran kadar protein. Proses pengikatan zat warna

dengan protein berlangsung sangat cepat (sekitar 2 menit), dan ikatan antara protein dan zat warna pada larutan relatif stabil dalam jangka waktu yang lama (sekitar 1 jam). Oleh karena itu, metode Bradford merupakan salah satu metode yang efektif untuk pengukuran konsentrasi protein karena prosedur yang cepat, sehingga tidak memerlukan waktu yang lama untuk pengujian protein (Thermo Scientific 2011: 1--3).

Kisaran reagen Bradford bekerja untuk sampel protein yang memiliki konsentrasi antara 1-2000 $\mu\text{g/ml}$. Pengukuran protein standar dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi protein yang berkisar antara 100--2000 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan untuk pengujian konsentrasi protein yang berkisar antara 1--25 $\mu\text{g/ml}$ perlu dilakukan *micro assay*. Blanko terdiri atas reagen Bradford yang ditambahkan dengan *buffer* tanpa mengandung protein. Konsentrasi protein dari sampel dapat diketahui dengan membandingkan nilai absorbansi sampel dengan kurva standar BSA. Akurasi kuantifikasi dengan reagen Bradford tergantung dari protein yang diukur. Kuantifikasi secara pasti konsentrasi protein dapat ditentukan dengan menggunakan protein standar untuk menghasilkan kurva kalibrasi. Protein yang sudah diketahui konsentrasinya, yaitu BSA dan BGG pada umumnya digunakan sebagai standar untuk menentukan kurva standar protein (Thermo Scientific 2011: 1--3).

4.2.13 Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase secara Kuantitatif

4.2.13.1 Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase pGEM *Asp* klon 2.2 dan pGEM *Asp* AQ1

Uji aktivitas enzim L-asparaginase dengan menggunakan kontrol pGEM *Asp* klon 2.2 bertujuan untuk mengetahui apakah promoter *xyn* AQ1 fungsional untuk mengekspresikan gen L-asparaginase. Hasil uji aktivitas enzim L-asparaginase pada supernatan hasil panen sel menunjukkan aktivitas enzim pada plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 lebih tinggi daripada kontrol negatif promoter *xyn* AQ1, yaitu pGEM *Asp* klon 2.2 (Lampiran 20). Hasil tersebut menunjukkan bahwa promoter *xyn* AQ1 kemungkinan fungsional untuk

menghasilkan enzim ekstraselular pada *E. coli*. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Helianti *dkk.* (2010: 9) yang menguji promotor *xyn* AQ1 pada gen xylanase di sel inang *E. coli* DH5 α . Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa aktivitas enzim endoxylanase dari supernatan *E. coli* rekombinan mengalami peningkatan setelah penambahan promotor *xyn* AQ1.

Uji aktivitas enzim L-asparaginase hasil dari sonikasi menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi pada kontrol pGEM *Asp* klon 2.2 daripada plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1. Hal tersebut dapat terjadi karena plasmid pGEM[®]- T Easy sendiri sudah memiliki promotor T7 dan SP6, sehingga kontrol pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 juga memiliki aktivitas enzim L-asparaginase. Beberapa jenis hidrolitik enzim seperti enzim mannanase, chitinase, dan α amilase yang berasal dari *Bacillus* sp. dapat mensekresikan enzim ke dalam medium kultur dengan menggunakan signal peptida dari *Bacillus* sp. Akan tetapi, ekspresi enzim tersebut juga dapat dipengaruhi oleh penggunaan promotor T7 dari sel inang *E. coli* (Yamabhai *dkk.* 2008). Selain itu, secara alami, *E. coli* juga dapat menghasilkan L-asparaginase (Youssef & Al-Omair 2008: 337). Oleh karena itu, pada kontrol pGEM[®]- T Easy *asp* klon 2.2 juga memiliki aktivitas enzim L-asparaginase.

Pengukuran aktivitas enzim L-asparaginase dari supernatan harus dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan pengenceran baik pada kontrol pGEM *Asp* klon 2.2 maupun plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1. Pengenceran dilakukan dengan mencampurkan supernatan sampel dengan miliQ. Pengenceran sampel dilakukan karena Δ Asparagin pada panjang gelombang 340 nm lebih tinggi daripada kurva standar asparagin (Lampiran 19).

4.2.13.2 Perbandingan Uji Aktivitas Enzim L-Asparaginase pUC 19 dan pGEM *Asp* AQ1

Uji aktivitas enzim L-asparaginase dengan menggunakan kontrol negatif pUC 19 bertujuan untuk mengetahui apakah ORF dari L-asparaginase dapat berfungsi dan dapat diekspresikan pada sel inang *E. coli* DH5 α . Hasil uji aktivitas enzim L-asparaginase pada supernatan hasil panen sel menunjukkan aktivitas

enzim pada kontrol negatif pUC19 yang lebih tinggi daripada plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 (Lampiran 22). Akan tetapi, perbedaan aktivitas enzim L-asparaginase menunjukkan nilai yang tidak signifikan antara sampel dan kontrol negatif pUC19. Aktivitas enzim L-asparaginase hasil sonikasi menunjukkan bahwa plasmid rekombinan pGEM[®]- T Easy *asp* AQ1 menghasilkan aktivitas enzim L-asparaginase lebih tinggi daripada kontrol negatif (pUC19). Akan tetapi, enzim L-asparaginase hasil sonikasi memiliki kisaran yang lebih rendah jika dibandingkan dengan supernatan (Lampiran 22 & 23). Hal tersebut disebabkan enzim L-asparaginase dari sonikasi bersifat intraseluler, sehingga sulit untuk disekresikan ke medium produksi (Glick & Pasternak 2003: 142--143).

Beberapa faktor yang mempengaruhi reaksi ninhidrin dan asparagin, antara lain suhu dan waktu inkubasi. Oleh karena itu, sampel diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Campuran ninhidrin dan asparagin pada suhu 37°C akan menghasilkan perubahan warna yang tergantung kepada konsentrasi ninhidrin. Suhu dapat mempengaruhi absorpsi spektrum sinar UV dan absorpsi dari campuran asparagin dan ninhidrin. Optimasi yang sudah dilakukan pada penelitian Sheng *dkk.* (1993: 245) menunjukkan bahwa kondisi optimal untuk inkubasi reaksi ninhidrin dan asparagin adalah 37°C.

Uji aktivitas enzim L-asparaginase yang digunakan menggunakan metode kolorimetrik. Hal tersebut disebabkan metode tersebut sudah digunakan untuk menentukan aktivitas enzim dari asparagin sintetase pada manusia, asparagin sintetase A dan B pada *E. coli*, dan L-asparaginase komersial. Produksi L-asparagin oleh asparagin sintetase dan penggunaan asparagin oleh L-asparaginase dihitung berdasarkan perbedaan absorbansi pada panjang gelombang 340 nm antara reaksi enzim dan blanko. Jika dibandingkan dengan analisis HPLC, uji aktivitas dengan ninhidrin kolorimetrik lebih murah dan tidak membutuhkan waktu yang lama terutama untuk uji aktivitas dalam jumlah yang besar. Keuntungan lain dalam uji aktivitas enzim dengan metode ini, yaitu tidak menggunakan label radioaktif, sehingga aman dan tidak menyebabkan pencemaran lingkungan. Keterbatasan dari penggunaan metode ninhidrin kolorimetrik, yaitu sensitivitas. Deteksi metode ini hanya untuk kisaran 0,05

sampai dengan 0,1 mM. Hal tersebut menunjukkan bahwa sensitivitas metode ini 10 kali lebih rendah dari HPLC (Sheng *dkk.* 1993: 248).

Ketika konsentrasi ninhidrin dan pH dijaga untuk tetap konstan, maka absorbansi campuran asparagin dan ninhidrin pada panjang gelombang 340 nm bergantung pada konsentrasi asparagin, waktu inkubasi, dan suhu. Uji aktivitas enzim yang dilakukan pada penelitian menggunakan waktu inkubasi dan suhu yang sama, yaitu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Oleh karena itu, parameter untuk membandingkan perbedaan aktivitas pada kontrol dan sampel ditentukan oleh perbedaan konsentrasi asparagin. Pengukuran aktivitas spesifik (U/mg) enzim L-asparaginase rekombinan dilakukan dengan terlebih dahulu mengukur kadar protein pada kontrol enzim maupun sampel enzim L-asparaginase rekombinan setelah penambahan promotor *xyn* AQ1. Aktivitas spesifik enzim didapat dengan cara membagi hasil aktivitas enzim (U/ml) dengan kadar protein enzim.

Aktivitas enzim L-asparaginase hasil sonikasi yang lebih tinggi pada *E. coli* DH5 α setelah penambahan promotor *xyn* AQ1 daripada kontrol negatif pUC19 (Lampiran 23) menunjukkan bahwa ORF gen L-asparaginase fungsional untuk diekspresikan di *E. coli* dan terjadi peningkatan aktivitas enzim setelah penambahan promotor *xyn* AQ1. Walaupun, gen L-asparaginase hasil sonikasi tidak terlalu tinggi dan peningkatan aktivitas enzim L-asparaginase setelah penambahan promotor *xyn* AQ1 tidak signifikan. Hal tersebut disebabkan level ekspresi pada sel inang *E.coli* lebih rendah dari organisme asalnya dan enzim yang diekspresikan diakumulasi sebagai *inclusion bodies* di dalam sel. Hal tersebut menjadi faktor pembatas untuk fermentasi kultur selanjutnya (Wang *dkk.* 2006: 1060).

Inclusion bodies merupakan struktur berbentuk granular yang ditemukan di dalam sitoplasma bakteri tertentu. Struktur tersebut berfungsi sebagai sumber makanan dan mengandung senyawa organik seperti pati, glikogen atau lipid (Hogg 2005: 57). Terbentuknya *inclusion bodies* dapat disebabkan oleh beberapa hal meliputi ekspresi protein rekombinan yang berlebihan, tidak terjadi pelipatan protein (*misfolding protein*) yang sesuai menjadi protein aktif dan matang dalam lingkungan sel *E. coli* serta ada kemungkinan terjadinya pengurangan ikatan

disulfida dalam lingkungan intraseluler sel *E. coli*. Protein rekombinan aktif sebenarnya dapat dihasilkan dari *inclusion bodies* secara *in vitro*. Akan tetapi, membutuhkan waktu untuk dapat melarutkan protein dan melakukan pelipatan kembali (*refolding protein*), sehingga akan dihasilkan protein rekombinan aktif yang dapat larut (Glick & Pasternak 2003: 142--143).

Hasil uji aktivitas enzim L-asparaginase menunjukkan bahwa ORF gen L-asparaginase yang berasal dari *B. circulans* merupakan enzim L-asparaginase tipe I (Lampiran 15). Enzim L-asparaginase tipe I bersifat sitoplasmik, sehingga memiliki afinitas yang rendah (Yano *dkk.* 2008: 711). Oleh karena itu, ORF gen L-asparaginase diekspresikan secara intraseluler di *E. coli* dengan aktivitas spesifik (U/mg) yang tidak terlalu tinggi. Penggunaan promoter *xyn* AQ1 tidak terlalu berpengaruh untuk meningkatkan ekspresi enzim L-asparaginase dalam jumlah yang tinggi. Oleh karena itu, diperlukan promoter lain yang fungsional untuk diekspresikan di *E. coli*, sehingga dapat dihasilkan produksi enzim L-asparaginase rekombinan dalam jumlah yang lebih banyak. Peningkatan produksi dan aktivitas enzim L-asparaginase dapat juga dilakukan dengan melakukan subkloning ke *shuttle vector E. coli-Bacillus subtilis*, sehingga dapat dihasilkan enzim secara ekstraselular dalam jumlah yang lebih banyak (Ebrahimezhad *dkk.* 2011: 311). Optimasi produksi enzim L-asparaginase dan karakterisasi enzim L-asparaginase pada berbagai kondisi pH dan suhu yang berbeda perlu dilakukan untuk menghasilkan produksi enzim L-asparaginase dalam jumlah yang tinggi, baik saat diekspresikan di sel inang *E. coli*, maupun di *B. subtilis* (Youssef & Al-Omair 2010: 347).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Gen L-asparaginase dari *B. circulans* telah berhasil disubkloning dan diekspresikan di dalam sel inang *E. coli* DH5 α dengan menggunakan vektor pGEM[®]-T Easy di bawah kontrol promoter *xyn* AQ1.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan subkloning gen L-asparaginase ke *shuttle vector E. coli-Bacillus subtilis* untuk menghasilkan enzim secara ekstraselular.
2. Perlu dilakukan optimasi produksi enzim L-asparaginase yang dilanjutkan dengan karakterisasi aktivitas enzim L-asparaginase pada pH dan suhu tertentu.

DAFTAR REFERENSI

- Alexander, S.K., D. Strete & M.J. Niles. 2003. *Labolatory exercises in organismal & molecular microbiology*. Mc.Graw Hill, San Fransisco: xiii+347 hlm.
- Aprigiyonies, F.E. 2011. Kloning dan sekuensing gen L-asparaginase yang berasal dari bakteri *Erwinia raphontici* dan *Bacillus circulans* di *E. coli*. Skripsi S1-Farmasi FMIPA UI, Depok: xiv + 99 hlm.
- Atlas, R.M. 2010. *Handbook of microbiological media*. 4th ed. CRC Press, Boca Raton: vi + 2037 hlm.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 2002. *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xiii + xxxviii + 12.10 + A1-29 + 17 hlm.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 2003. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xiii + 4410 hlm.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brock, T.D. 1994. *Biology of microorganisms*. 7th ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko & J. Parker. 2001. *Biology of microorganisms*. 7 th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Brooker, R.J., M.T. Madigan, J.M. Martiko & J. Parker. 1994. *Biology of microorganisms*. 7th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Brown, T.A. 1987. *Gene cloning an introduction*. Van Nostrand Reinhold Co.Ltd., Wokingham: vi + 233 hlm.
- Brown, T.A. 1991. *Pengantar kloning gen*. Terj. dari *Gene cloning an introduction*, oleh Muhammad, J. A. & Praseno. Yayasan Essentia Medika, Yogyakarta: 274 hlm.
- Brown, T.A. 2006. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. 5th ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford: xx + 386 hlm.

- Campbell, N.A., J.B. Reece & L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. 5th ed. Terj.dari *Biology*, oleh Lestari, R., E.I.M. Adil, N. Anita, Andri, W.F. Wibowo & W. Manalu. Penerbit Erlangga, Jakarta: xxi + 443 hlm.
- Cappucino, J.G. & N. Sherman. 2002. *Microbiology: A laboratory manual*. 6th ed. Benjamin Cummings, San Fransisco: xvi + 491 hlm.
- Cheng, L & D.Y. Zhang. 2008. *Molecular genetic pathology*. Humana Press, New Jersey: xii + 786 hlm.
- Cho, C.W., H.J. Lee, E. Chung, K.M. Kim, J.E. Heo, J.I. Kim, J. Chung, Y. Ma, K. Fukui, D.W. Lee, D.H. Kim, Y.S. Chung & J.H. Lee. 2007. Molecular characterization of the soybean L-asparaginase gene induced by low temperature stress. *Molecules and Cells* **23**(3): 280--286.
- Dale, J.W. & S.F. Park. 2004. *Molecular genetics of bacteria*. 4th ed. John Wiley & Son: 346 hlm.
- Ebrahiminezhad, A., S.R. Amini & Y. Ghasemi. 2011. L-asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from maharloo salt lake. *Indian Journal of Microbiology* **51**(3):307--311.
- El-Bessoumy, A.A., M. Sarhan & J. Mansour. 2004. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas Aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **37**(4): 387--393.
- Fairbanks, D.J. & W.R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, London : xix + 820 hlm.
- Finnzymes. 2010. *Phusion™ high-fidelity DNA polymerase*. New England Biolabs, United Kingdom: 4 hlm.
- Frackman, S. & D. Kephart. 1999. Rapid ligation for the pGEM®-T and pGEM®-T Easy vector systems. *Promega Notes* **71**: 8--11.
- Geneaid. 2003. *Gel/PCR DNA fragment extraction kit*. Sci, USA: 3 hlm.
- Ghatak, K.L. 2011. *Techniques and methods in biology*. PHI Learning Private Limited, New Delhi: xx + 684 hlm.
- Glick, B.R. & J.J. Pasternak. 2003. *Molecular biotechnology principles and application of recombinant DNA*. ASM Press, Washington DC: xxiii + 760 hlm.

- Griffin, A.M. & H.G. Griffin. 1993. *DNA sequencing protocols*. Humana Press, Inc., New Jersey: xii + 392 hlm.
- Hartl, D.L. & E.W. Jones. 2005. *Genetics: analysis of genes & genomes* 6th ed. Jones & Bartlett Publishers, Inc., New York: xxv + 854 hlm.
- Helianti, I. 2007. Direct Cloning of a Xylanase Gene from Pawan-Riau Hot Spring. *HAYATI Journal of Biosciences* **1**(2): 54--58.
- Helianti, I., N. Nurhayati, M. Ulfah, B. Wahyuntari & S. Setyahadi. 2010. Constitutive high level expression of an endoxylanase gene from the newly isolated *Bacillus subtilis* AQ1 in *Escherichia coli*. *Journal Biomedical and Biotechnology* **2010**: 1--12.
- Higuchi, R., B. Krummell & R.K.Saiki. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* **16**(15): 7351--7367.
- Hogg, S. 2005. *Essensial microbiology*. John Wiley & Sons, Chichester: x+454 hlm.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley & S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 th ed. Williams & Wilkins, Baltimore: xviii + 787 hlm.
- Horner, M.J.D & L.A.G. Ries. 2008. Leukemia. *National Cancer Institute*: 243--250.
- Inoue, H., H. Nojima, & H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23--28.
- Jain, R., K.U. Zaidi, Y. Verma & P. Saxena. 2012. L-asparaginase: A promising enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukemia. *People's Journal of Scientific Research* **5**(1): 29--35.
- Karcher, S.J. 1995. *Molecular biology: a conceptual approach*. Academic Press, California: xiii + 250 hlm.
- Kneusel, R.E., J. Crone, M. Wulbeck & J. Ribbie. 2000. Procedures for analysis and purification of His-tagged proteins. *Dalam*: Rapley, R. 2000. *The nucleid acid protocols handbook*. Humana Press Inc., Totowa: 921--934.

- Kobs, G. 1997. Cloning blunt-end DNA fragments into the pGEM[®]-T vector systems. *Promega Notes Magazine* **62**: 15--20.
- Kotzia, G.A. & N.E. Labrou. 2005. Cloning, expression, and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Journal of Biotechnology* **119**: 309--323.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap & D.P. Clark. 2009. *Brock: Biology of microorganism*. Pearson Benjamin Cummings Publishing Inc., San Francisco: xxviii + 1061 + A-12 + G-17 + I-36 hlm.
- Manikandan, R., C.N. Pratheeba, P. Sah & S. Sah. 2010. Optimization of asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* using experimental methods. *Nature and Science* **8(2)**: 1--6.
- Moorthy, V., A. Ramalingam, A. Sumantha & R.T. Shankaranaya. 2010. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. *African Journal of Microbiology Research* **4(18)**: 1862--1867.
- Mostert, S., M.N. Sitaresmi, C.M. Gundy, Sutaryo & A.J.P. Veerman. 2006. Influence of socioeconomic status on childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in Indonesia. *Pediatrics* **118(6)**: e1600--e1606.
- Narta, U.K., S.S. Kanwar & W. Azmi. 2007. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Hematology* **61**: 208--221.
- Nicholl, D.S.T. 2008. *An introduction to genetic engineering*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. xi + 336 hlm.
- Passarge, E. 2007. *Color atlas of genetics*. 3rd ed. Thieme, Stuttgart: x + 486 hlm.
- Pieters, R., I. Appel, H.J. Kuehnel, I.T. Fohr, U. Pichlmeier, I.V.D.Vaart, E. Visser & R. Stigter. 2008. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. *Blood* **112(13)**: 4832--4838.
- Prakasham, R.S., M. Hymavathi, C.S. Rao, S. K. Arepalli, J.V. Rao, P.K. Kennady, K. Nasaruddin, J. B. Vijayakumar & P.N. Sarma. 2010.

- Evaluation of antineoplastic activity of extracellular asparaginase produced by isolated *Bacillus circulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **60**: 72--80.
- Primrose, S.B., R.M. Twyman & R.W. Old. 2001. *Principles of gene and manipulation*. 6th ed. Blackwell Science, Oxford: viii + 319 hlm.
- Promega. 2010. *Technical manual pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy vector systems*. Promega Corporation, Madison: 27 hlm.
- Ruller, R., J.C. Rosa, V.M. Faca, L.J. Greene & R.J. Ward. 2006. Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5 α under the control of the *Bacillus* BsXA promoter. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **43**: 9--15.
- Russell, P.J. 1994. *Fundamental of genetics*. MacMillan Publishing, New York: xvi + 528 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual, vol 1*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 1.1--7.94 hlm.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, New York: xxxviii + 1.1--7.87 hlm.
- Sarquis, M.I.M., E.M.M. Oliveira, A.S. Santos & G.L. Costa. 2004. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro **99**(5): 489--492.
- Savitri, N. Ashtana & W. Azmi. 2003. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. *Indian Journal of Biotechnology* **2**: 184--194.
- Seidman, L.A. & C.J. Moore. 2000. *Basic laboratory methods for biotechnology: Textbook & laboratory reference*. Prentice Hall, Inc., London: vi + 751 hlm.
- Sheng, S., J.J. Kraft & S.M. Schuster. 1993. A specific quantitative colorimetric assay for L-asparagine. *Analytical biochemistry* **211**: 242--249.
- Sieciechowicz, K., R.J. Ireland & K.W. Joy. 1985. Diurnal variation of asparaginase in developing pea leaves. *Plant Physiology* **77**: 506--508.

- Simmons, K. 2004. *Biotechnology*. (?): 1 hlm.
<http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/1115/cm1503/biotechnology.htm>, 12
 September 2011, pk. 19.20.
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. 2003. *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: xix + 840 hlm.
- Starr, C. & R. Taggart. 1992. *Biology : the unity and diversity of life*. Wardsworth Publishing Company, Belmont: xvii + 921 hlm.
- Sunitha, M., P. Ellaiah & R.B. Devi. 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*. 4(4): 297--303.
- Thermo Scientific. 2011. Bradford reagent ready to use. 7 hlm.
- Tu, Z., G. He, K. X. Li, M. J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao, D.P. Liu, H. Ye, J. Shi & X. Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(1): 113--120.
- Twyman, R.M. 1998. *Advanced molecular biology*. BIOS Scientific Publishers, New York: xi + 449 hlm.
- Vallejo, A.N., R.J. Pogulis & L.R. Pease. 1994. In vitro synthesis of novel genes: mutagenesis and recombination by PCR. *Genome Research* 4: S123--S130.
- Verma, N., K. Kumar, G. Kaur & S. Anand. 2007. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Critical review in biotechnology* 27: 45--62.
- Vodopich, D.S. & R. Moore. 2005. *Biology: Laboratory manual*. 7th ed. McGraw-Hill Companies, Boston: ix + 555 hlm.
- Walker, J.M. & R. Raply. 2009. *Molecular biology and biotechnology*. 5th ed. Cambridge, RSC Publishing: xix + 604 hlm.
- Wang, Y., L. Ruan, H. Chua & P.H.F. Yu. 2006. Cloning and expression of the PHA synthase genes *phaC1* and *phaC1AB* into *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 559--563.

- Warrens, A.N., M. D. Jones & R.I. Lechler. 1997. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* **186**: 29--35.
- Weaver, R.F. 2005. *Molecular biology*. 3rd ed. McGraw Hill Higer Education, New York: xvii + 894 hlm.
- WHO (=World Health Organization). 2010. Cancer incident and mortality in Indonesia 2008. 2010: 1 hlm.
http://globocan.iarc.fr/bar_pop.asp?selection=92360&title=Indonesia&sex=0&statistic.html, 11 November 2011, pk.10.00.
- Wolfe, S.L. 1993. *An introduction to cellular and molecular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xvii + 820 hlm.
- Wolfe, S.L. 1995. *Introduction to cell and molecular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xvii + 820 hlm.
- Wong, D.W.S. 1997. *The ABSs of gene cloning*. Chapman & Hall, New York: xiii + 213 hlm.
- Wong, D.W.S. 2006. *The ABSs of gene cloning*. 2nd ed. Springer Science + Business Media, Inc., New York: 227 hlm.
- Yamabhai, M., S. Emrat, S. Sukasem, P. Pesatcha, N. Jaruseranee & B. Buranabanyat. 2008. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *Journal of Biotechnology* 133: 50--57.
- Yano, S., R. Minato, J. Thongsanit, T. Tachiki & M. Wakayama. 2008. Overexpression of type I L-asparaginase of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*, rapid purification and characterisation of recombinant type I L-asparaginase. *Annals of Microbiology* **58**(4): 711--716.
- Youssef, M.M & M.A. Al-Omaid. 2008. Cloning, purification, characterization and immobilization of L-asparaginase II from *E.coli* W3110. *Asian Journal of Biochemistry* **3**(6): 337--35.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi molekular*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.

Lampiran 1

Komposisi dan cara pembuatan medium dan *buffer*

Nama medium dan <i>buffer</i>	Komposisi dan cara pembuatan
Medium <i>Luria Bertani</i> (LB) cair dan agar	Sebanyak 2,5 g <i>yeast extract</i> dicampurkan dengan 5 g tripton dan 5 g NaCl. Campuran semua bahan dilarutkan dengan akuabides steril sampai dengan volume 500 ml dan dihomogenkan dengan menggunakan <i>magnetic stirrer</i> . Medium kemudian diatur pH-nya dengan menggunakan pH meter hingga pH $7 \pm 0,2$ dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Perbandingan LB agar, yaitu dengan menambahkan agar 1,5%.
Medium SOB cair (50 ml)	Sebanyak 1 g <i>bactotryptone</i> ditambahkan dengan 0,25 g <i>yeast extract</i> , 0,0293 g NaCl, dan 0,0093 g KCl. Campuran bahan tersebut dilarutkan di dalam akuabides 50 ml dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Medium yang sudah disterilisasi kemudian ditambahkan larutan Mg steril sebanyak 0,5 ml.
Medium SOC cair	Sebanyak 1 L SOB ditambahkan dengan 10 ml glukosa 2 M.
Medium M9	Sebanyak 3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan dengan 1,5 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 0,25 g NaCl, 0,007 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g L-asparagin, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 1 g glukosa kemudian dilarutkan dalam akuabides steril hingga 500 ml. Medium tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

(Lanjutan)

<i>Buffer</i> 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 akuabides steril hingga 100 ml. Larutan kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
Stok Ampisilin 100 µg/ml	Sebanyak 100 mg ampisilin dilarutkan dalam 1 ml akuabides steril, kemudian disimpan di dalam tabung <i>ependorf</i> yang dilapisi alumunium <i>foil</i> pada suhu -20°C.
Tris HCl pH 8 1 M	Sebanyak 12,1 g tris- <i>base</i> ditambahkan HCl hingga volume 100 ml, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
<i>Solution I</i>	Sebanyak 2,5 ml glukosa 2M ditambahkan dengan 2 ml EDTA 0,5 M dan 2,5 ml Tris HCl 1 M kemudian dilarutkan dengan 100 ml akuabides. Campuran disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. <i>Solution I</i> disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.
<i>Solution II</i>	Sebanyak 150 µl NaOH 2 N dan 150 µl SDS 10 % ditambahkan dengan akuabides steril hingga volume 1,5 ml. <i>Solution II</i> dibuat sebelum melakukan reaksi.
<i>Solution III</i>	Sebanyak 60 ml kalium asetat dan 11,5 ml asam asetat glasial ditambahkan dengan 28,5 ml akuabides. Campuran bahan tersebut kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. <i>Solution III</i> disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.
Etidium Bromida	Sebanyak 50 µl stok EtBr ditambahkan dengan

(EtBr)	akuabides sebanyak 500 ml.
<i>Loading dye</i>	Sebanyak 0,6 ml gliserol 30 % ditambahkan dengan bromofenol biru sebanyak 0,005 g, <i>xylene cyanol</i> sebanyak 0,005 g dan dilarutkan dengan akuabides steril hingga volume 2 ml. Campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vorteks.
Marka DNA 1 kb <i>Ladder</i>	Sebanyak 10 µl <i>loading dye</i> 6x dicampurkan dengan stok <i>marker</i> DNA sebanyak 12 µl dan dilarutkan dengan 60 µl akuabides.
Marka DNA 50 bp <i>Ladder</i>	Sebanyak 1 µl <i>loading dye</i> 6x dicampurkan dengan stok <i>marker</i> DNA sebanyak 1 µl dan dilarutkan dengan 4 µl akuabides.
Gel agarosa 1%	Sebanyak 0,25 g bubuk agarosa dilarutkan dengan 25 ml TAE 1x, kemudian dipanaskan dalam <i>microwave</i> hingga mendidih.
IPTG	Sebanyak 23,8 mg IPTG dilarutkan dengan 1 ml akuabides steril kemudian <i>tube</i> dilapisi dengan <i>aluminium foil</i> .
X-Gal	Sebanyak 40 mg X-gal dilarutkan dengan 1 ml DMSO kemudian <i>tube</i> dilapisi dengan <i>aluminium foil</i> .
Gel agarosa 2%	Sebanyak 0,25 g bubuk agarosa dilarutkan dengan 14 ml TAE 1x, kemudian dipanaskan dalam <i>microwave</i> hingga mendidih.
TAE 50x	Sebanyak 121 g Tris-Base, 28,55 g asam asetat glasial, dan 18,6 g EDTA dilarutkan dengan akuades steril hingga volume mencapai 500 ml. Larutan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
TAE 1x	Sebanyak 20 ml TAE 50x ditambahkan dengan 980 ml akuabides steril.

[Sumber: Sambrook & Russel 2001: A1.1--A2.12; Atlas 2010: 918.]

Lampiran 2

Komposisi reaksi PCR untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	16,1
5 x HF <i>buffer</i>	5,0
10 mM dNTP <i>mix</i>	0,5
DMSO	0,75
Primer <i>forward</i>	1,0
Primer <i>reverse</i>	1,0
DNA <i>template</i>	0,5
Enzim HF Phusion	0,15
Total reaksi	25

[Sumber: Finnzymes 2010: 1.]

Lampiran 3

Program PCR untuk amplifikasi promoter *xyn* AQ1

Tahapan	Suhu	Waktu
Pra-denaturasi	98°C	30 detik
Denaturasi	98°C	10 detik
<i>Annealing</i>	63°C	15 detik
Elongasi	72°C	30 detik
GO TO REP 2, 29x		
Elongasi akhir	72°C	5 menit
Preservasi	4°C	∞

[Sumber: Finnzymes 2010: 2.]

Lampiran 4

Komposisi reaksi PCR untuk amplifikasi gen L-asparaginase

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	30,5
5 x HF <i>buffer</i>	10
10 mM dNTP <i>mix</i>	1,5
DMSO	1,5
Primer <i>forward</i>	2,5
Primer <i>reverse</i>	2,5
DNA <i>template</i>	1,0
Enzim HF Phusion	0,5
Total reaksi	50

[Sumber: Finnzymes 2010: 1.]

Lampiran 5

Program PCR untuk amplifikasi gen L-asparaginase

Tahapan	Suhu	Waktu
Pra-denaturasi	98°C	30 detik
Denaturasi	98°C	10 detik
<i>Annealing</i>	68°C	15 detik TD(-0,3)
Elongasi	72°C	30 detik
GO TO REP 2, 19X		
Denaturasi	98°C	10 detik
<i>Annealing</i>	62°C	15 detik
Elongasi	72°C	30 detik
GO TO REP 10X		
Elongasi akhir	72°C	5 menit
Preservasi	4°C	∞

[Sumber: Finnzymes 2010: 2.]

Lampiran 6
Komposisi reaksi *overlap* PCR

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	14,6
5 x HF <i>buffer</i>	5,0
10 mM dNTP <i>mix</i>	0,5
DMSO	0,75
Primer <i>forward</i>	1,0
Primer <i>reverse</i>	1,0
DNA <i>template</i> (promoter AQ1)	1,0
DNA <i>template</i> (gen L-asparaginase)	1,0
Enzim HF Phusion	0,15
Total reaksi	25

[Sumber: Finnzymes 2010: 1.]

Lampiran 7
Program *overlap* PCR

Tahapan	Suhu	Waktu
Pra-denaturasi	98°C	30 detik
Denaturasi	98°C	10 detik
<i>Annealing</i>	67°C	15 detik TD(-0,2)
Elongasi	72°C	30 detik
GO TO REP 2, 19X		
Denaturasi	98°C	10 detik
<i>Annealing</i>	63°C	15 detik
Elongasi	72°C	30 detik
GO TO REP 6, 10X		
Elongasi akhir	72°C	5 menit
Preservasi	4°C	∞

[Sumber: Finnzymes 2010: 2.]

Lampiran 8
Komposisi reaksi *A-tailing*

Bahan	Volume (μL)
Gen sisipan L-asparaginase-promoter <i>xyn</i> AQ1	10
<i>Buffer</i> KAPA <i>Taq</i> with Mg^{2+}	1,0
10 mM dNTP <i>mix</i>	0,1
Enzim KAPA <i>Taq</i> A	0,1
Total	11,2

[Sumber: Promega 2010: 15.]

Lampiran 9

Komposisi reaksi ligasi vektor pGEM[®]-T Easy dan gen L-asparaginase AQ1

Bahan	Volume (μL)
Produk PCR (hasil <i>A-tailing</i>)	3,0
2 x <i>buffer</i> T4	5,0
Vektor pGEM [®] -T Easy	1,0
T4 DNA ligase	1,0
Total	10

[Sumber: Promega 2010: 5.]

Lampiran 10

Komposisi reaksi konfirmasi digesti menggunakan enzim *EcoRI*

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	2,3
10 x <i>buffer EcoRI</i>	0,5
BSA	0,1
Sampel	2,0
Enzim <i>EcoRI</i>	0,1
Total	5,0

[Sumber: Alexander *dkk.* 2003: 227.]

Lampiran 11

Komposisi reaksi konfirmasi digesti menggunakan enzim *NdeI*

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	2,3
Buffer 4	0,5
BSA	0,1
Sampel	2,0
Enzim <i>NdeI</i>	0,1
Total	5,0

[Sumber: Alexander *dkk.* 2003: 227.]

Lampiran 12

Perhitungan efisiensi transformasi ke dalam *E. coli* DH5 α **Tujuan :**

Mengetahui efisiensi transformasi pada *E. coli* DH5 α

Rumus :

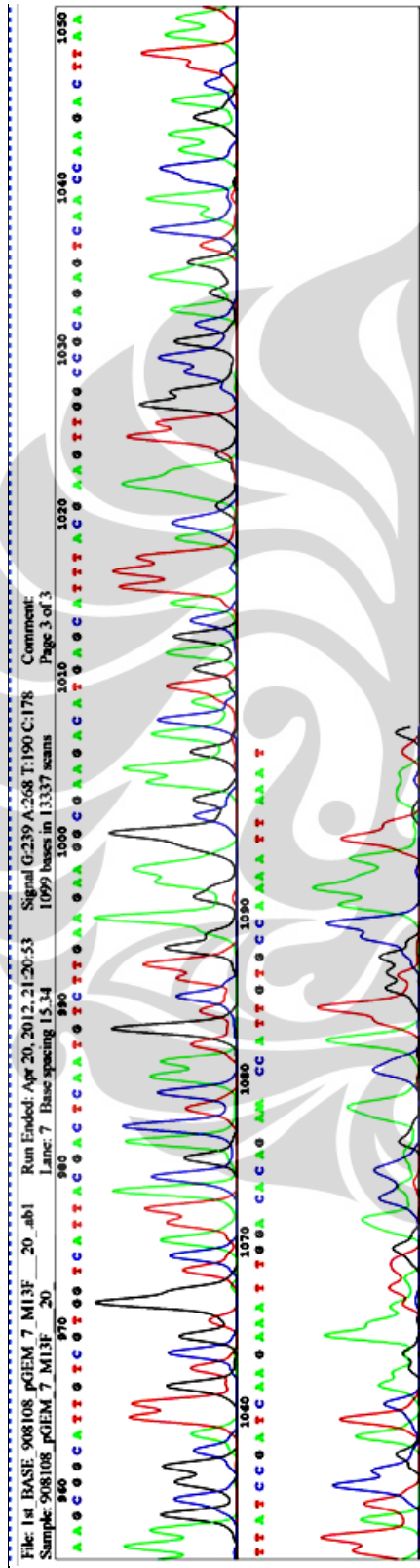
Efisiensi transformasi = $\frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{pengenceran} \times \text{volume total kultur}}{\text{volume yang di } spread \times \text{konsentrasi DNA}}$

Perhitungan :

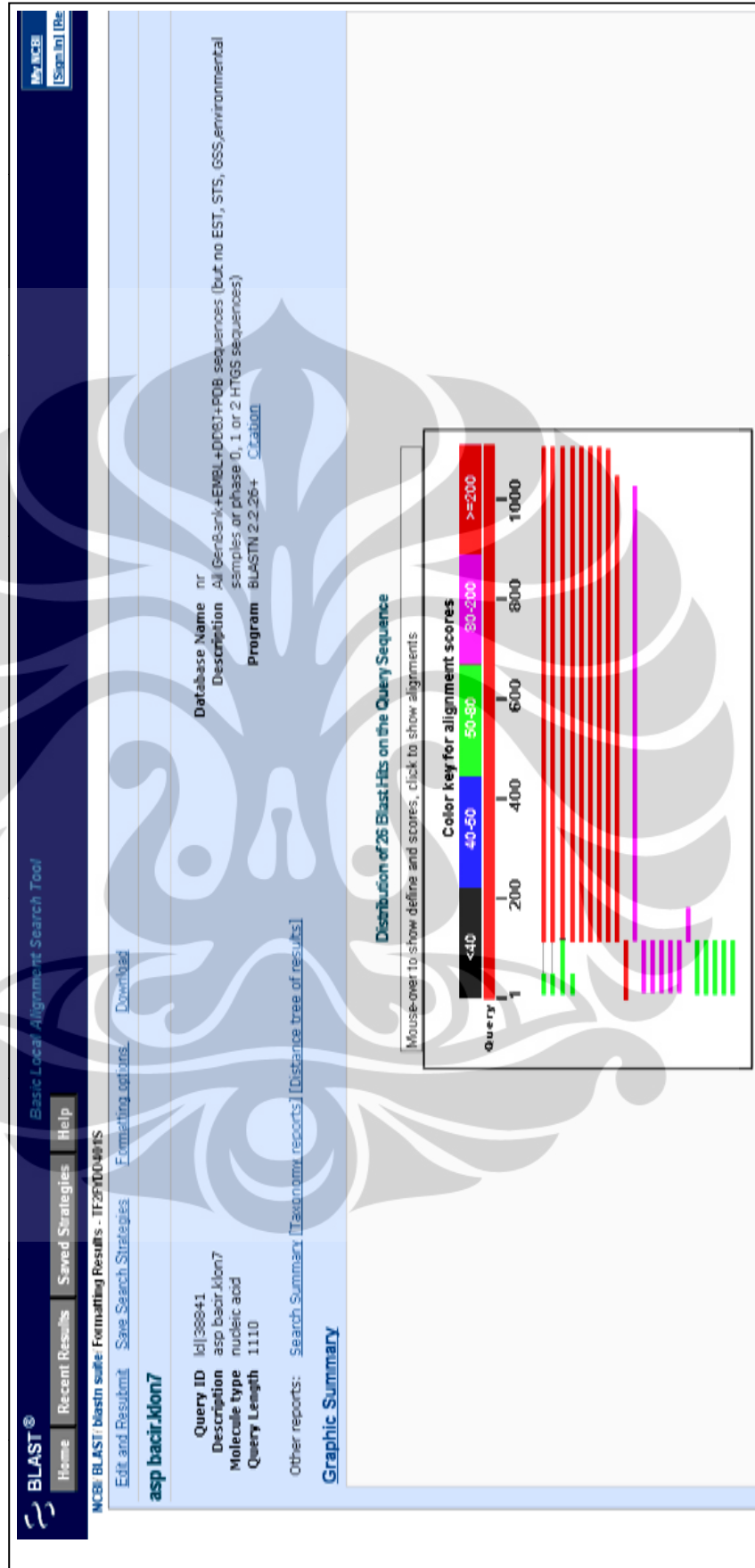
Jumlah koloni = 513
 Konsentrasi plasmid = 10 pg = 10^{-5} μ g
 Volume yang di-*spread* = 100 μ l
 volume total = 200 μ l

Maka efisiensi transformasi = $\frac{513 \times 1 \times 200}{100 \times 10^{-5}}$
 $1,02 \times 10^8$ cfu/ μ g

[Sumber: Tu *dkk.* 2005: 117.]



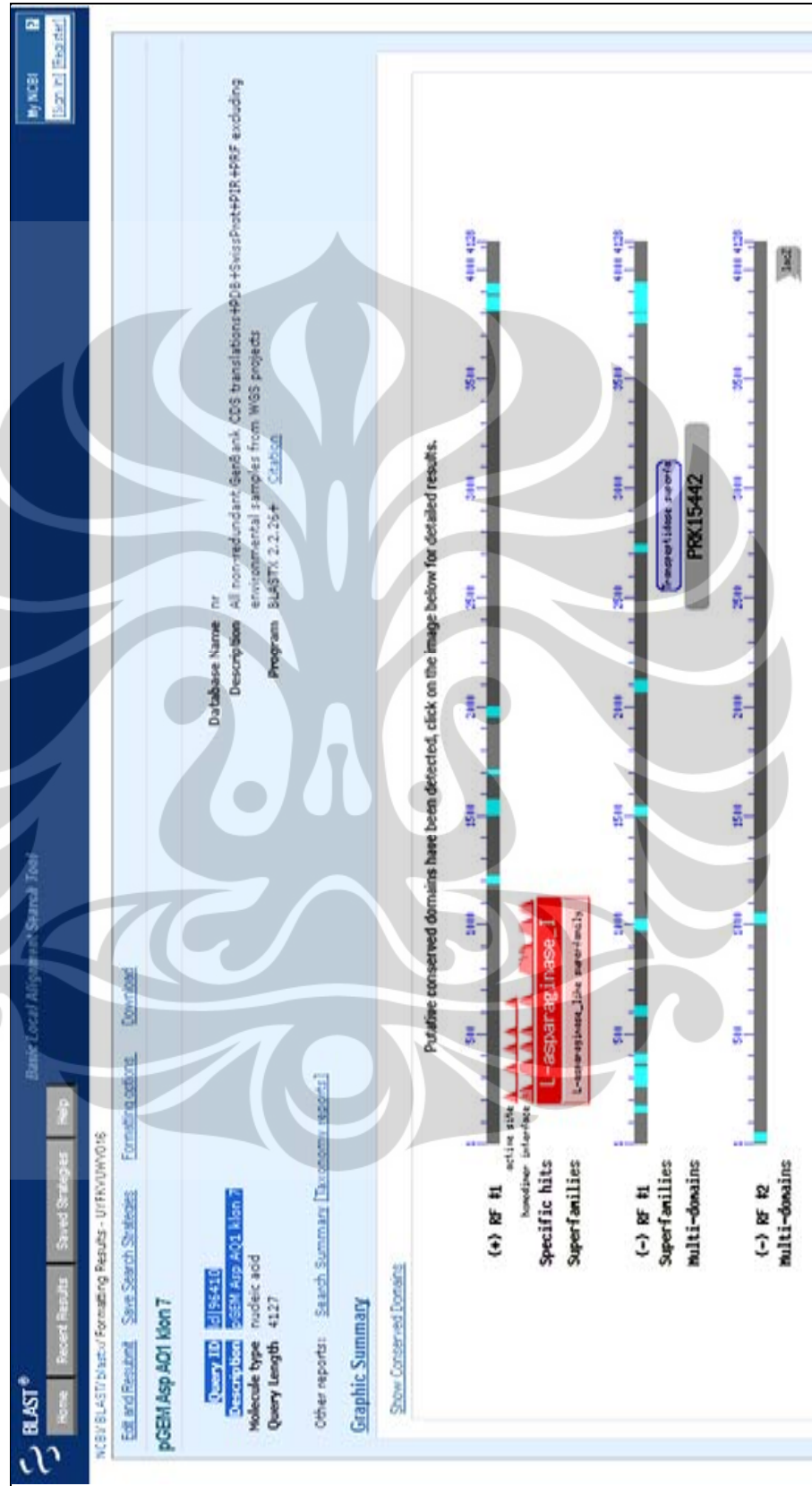
Lampiran 14
 Hasil *blastn* gen L-asparaginase AQ1 dari *B. circulans*



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002468.1	<i>Bacillus subtilis</i> 56Ss, complete genome	1722	1863	93%	0.0	99%	
CP002305.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> RO-MN-1, complete genome	1725	1819	93%	0.0	98%	
AL009126.3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168 complete genome	1725	1821	98%	0.0	98%	
D84432.1	<i>Bacillus subtilis</i> DNA, 263 kb region containing skin element	1725	1746	89%	0.0	98%	
M63264.1	<i>Bacillus subtilis</i> L-asparaginase (ansa) gene, complete CDS; L-asparinase (ans)	1725	1746	89%	0.0	98%	
CP003492.1	<i>Bacillus</i> sp. JS, complete genome	1618	1618	89%	0.0	96%	
CP002305.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10, complete genome	1580	1580	89%	0.0	95%	
CP002183.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> str. W23, complete genome	1567	1567	89%	0.0	95%	
CP002202.1	<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942, complete genome	817	817	84%	0.0	83%	
FJ544630.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain A-Q1 endoxylanase glycosyl hydrolase family 11 protein g	220	220	10%	1e-53	100%	
CP001983.1	<i>Bacillus megaterium</i> QM B155.1, complete genome	191	191	82%	1e-44	72%	
HE724679.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2 complete genome	174	174	9%	1e-39	97%	
HE617159.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU B945 complete genome	174	174	9%	1e-39	97%	
CP000569.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42, complete genome	174	174	9%	1e-39	97%	
HM660310.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain CH51 xylanase (xynA) gene, complete cds	159	169	9%	5e-38	96%	
U51675.1	<i>Bacillus</i> sp. endo-1,4-beta-xylanhydrolase (xynA) gene, complete cds	156	156	9%	4e-34	94%	
L08205.1	<i>Bacillus subtilis</i> ansR gene, complete cds	117	117	6%	2e-22	97%	
G0845010.2	<i>Bacillus subtilis</i> strain 85-91 hypothetical protein (yoxV), endo-1,4-beta-xylan	75.0	75.0	9%	1e-09	80%	
D0217402.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain AK1 xylanase gene, complete cds	75.0	75.0	9%	1e-09	80%	
AF027868.1	<i>Bacillus subtilis</i> chromosome region between terC and ocbA8	75.0	75.0	9%	1e-09	80%	
M36648.1	<i>B. subtilis</i> xylanase gene, complete cds	75.0	75.0	9%	1e-09	80%	
X07723.1	<i>Bacillus circulans</i> xlnA gene for xylanase (EC 3.2.1.8)	75.0	75.0	9%	1e-09	80%	
Z34519.1	<i>Bacillus subtilis</i> 168 trpC2 xynA gene encoding xylanase	73.1	73.1	8%	4e-09	98%	

Lampiran 15
Hasil blastx gen L-asparaginase AQ1 dari *B. circulans*



Descriptions

Legend for links to other resources: **U** UniGene **CEG** Gene **S** Structure **M** Map Viewer **P** PubOpen BioAssay

Sequences producing significant alignments

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident.	Links
YP_004204122.1	unnamed protein product [Bacillus subtilis 85n5] >gb A01930395.1 L-asparagin	646	646	23%	0.0	99%	G
NP_390239.1	aspartic L-asparaginase [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 1681] >ref ZP_0351	644	644	23%	0.0	99%	G
EHA31451.1	L-asparaginase [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8]	644	644	23%	0.0	98%	
ZP_06874755.1	L-asparaginase [Bacillus subtilis subsp. spizizeni ATCC 6633] >ref YP_0038564	643	643	23%	0.0	98%	
YP_004877639.1	L-asparaginase [Bacillus subtilis subsp. spizizeni TU-B-10] >gb A0987207.1 L	642	642	23%	0.0	98%	G
YP_005222163.1	unnamed protein product [Bacillus sp. JS] >gb AF28907.1 hypothetical protein	632	632	23%	0.0	97%	G
YP_003920851.1	L-asparaginase [Bacillus amyloliquefaciens DSM 7] >ref YP_005542073.1 ansA	600	600	23%	0.0	91%	G
YP_001421763.1	AnxA [Bacillus amyloliquefaciens F2942] >ref YP_005130710.1 ansA gene prot	600	600	23%	0.0	91%	G
ZP_10049419.1	AnxA [Bacillus sp. 586] >gb EF22765.1 AnxA [Bacillus sp. 586] >gb AF565655	600	600	23%	0.0	91%	G

Lampiran 16

Hasil alignment pGEM asp AQ1

[gb|863264.1|BACAM5](#) Bacillus subtilis L-asparaginase (ansA) gene, complete CDS; L-asparase (ansB) gene, complete CDS
 Length=2935

Score - 1718 bits (1904), Expect - 0.0
 Identities - 976/991 (98%), Gaps - 3/991 (0%)
 Strand-Plus/Plus

Query	116	TATGAAAAAATTACTGATGTTGACAAACCGGGGAAACGATTTCCTTCAGTTGAAGGGGAAAA	175
Shjet	344	TATGAAAAAATTATTTGATGTTGACAACTGGGGAAACGATTTCCTTCAGTTGAAGGGGAAAA	403
Query	176	TGGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTTCATGAAATATTAAGTTACGTAICAAACACTTCGATAA	235
Shjet	404	TGGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTTCATGAAATATTAAGTTACGTAICAAAACACTTCGATAA	463
Query	236	CGATTACACAATGGAACTCAGTCCCTTATGAATATAGACAGCACCAATATGCAAGCTTGA	295
Shjet	464	CGATTACACAATGGAACTCAGTCCCTTATGAATATAGACAGCACCAATATGCAAGCTTGA	523
Query	296	ATACGGGTGGAAATAGCGGAAGCCGTTAAGGAAAAATATGATGCTTATGACGGGTTTGT	355
Shjet	524	ATACGGGTGGAAATAGCGGAAGCCGTTAAGGAAAAATATGATGCTTATGACGGGTTTGT	583
Query	356	TATTACTCACCGTACAGATACAAATGGCCATATACATCTGCGCGACATATCGTATATGCTGCA	415
Shjet	584	TATTACTCACCGTACAGATACAAATGGCCATATACATCTGCGCGACATATCGTATATGCTGCA	643
Query	416	CGATGCCAAAAAGCCGATTTGTCATCACCCGCTTCGACGATTCGGATCAGGTTCCAAAAAAC	475
Shjet	644	CGATGCCAAAAAGCCGATTTGTCATCACCCGCTTCGACGATTCGGATCAGGTTCCAAAAAAC	703
Query	476	CGATGCCAAAAAGCCGATTTGTCATCACCCGCTTCGACGATTCGGATCAGGTTCCAAAAAAC	535
Shjet	704	CGATGCCAAAAAGCCGATTTGTCATCACCCGCTTCGACGATTCGGATCAGGTTCCAAAAAAC	763
Query	536	TTATGTTGTTGTTTGGCGGAGAGTCAITCGGGAAACCGTGGATCATAATTAAGAACGAA	595
Shjet	764	TTATGTTGTTGTTTGGCGGAGAGTCAITCGGGAAACCGTGGATCATAATTAAGAACGAA	823
Query	596	AAGCTACGACCCATTTGAAAGCATCAATTACCCATATATGCTTTTATCAATGAAGACCG	655
Shjet	824	AAGCTACGACCCATTTGAAAGCATCAATTACCCATATATGCTTTTATCAATGAAGACCG	883
Query	656	GATCGAATACAAACAAAGTAAACGGAAACCGGAAACGACACCCITCACAGTTGACACTTC	715
Shjet	824	GATCGAATACAAACAAAGTAAACGGAAACCGGAAACGACACCCITCACAGTTGACACTTC	843
Query	716	ACTATGATACAGTCTATGCTGCGTGGAGCTGCAATCCAGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGA	775
Shjet	944	ACTATGATACAGTCTATGCTGCGTGGAGCTGCAATCCAGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGA	1003
Query	776	TGCCCAGAAAGCATGTACAAAGAAATTCATATGACAGTTATGGAGCGGAGGCTTGGC	835
Shjet	1004	TGCCCAGAAAGCATGTACAAAGAAATTCATATGACAGTTATGGAGCGGAGGCTTGGC	1063
Query	836	GTTTGAAGGACAGAGACATTTTGTCAAAGTGAATGAGCTGATCGAAAGCGGCTATTGTGGT	895
Shjet	1064	GTTTGAAGGACAGAGACATTTTGTCAAAGTGAATGAGCTGATCGAAAGCGGCTATTGTGGT	1123
Query	896	GGTCATTAACGACTCAATGCTTTCAGAAAGGCGAAGACATGAGCATTTACGAGTTCGGCCG	955
Shjet	1124	GGTCATTAACGACTCAATGCTTTCAGAAAGGCGAAGACATGAGCATTTACGAGTTCGGCCG	1183
Query	956	CAGAGTCAACCAAGACTTAAATATCCGATCAAGAAATATGAAACACAGAACTAATTCGTCC	1015
Shjet	1184	CAGAGTCAACCAAGACTTAAATATCCGATCAAGAAATATGAAACACAGAACTAATTCGTCC	1243
Query	1016	AAAAATGATGTGGGCTACTAGGTCAGTCTTCGGATCTTCCGTGCTGCAAGAGAAATATGGA	1075
Shjet	1244	AAAAATGATGTGGGCTACTAGGTCAGTCTTCGGATCTTCCGTGCTGCAAGAGAAATATGGA	1303
Query	1076	AACGCCGATCCG---TGAAGTTATCCGTGAA 1103	
Shjet	1304	AACGCCGATAGCTGATGACGTTGCTCCGTGAA 1334	

(Lanjutan)

```

>gb|863264.1|EACAM5 Bacillus subtilis L-asparaginase (ansA) gene, complete CDS; L-aspartase
(ansE) gene, complete CDS
Length=2935

Score = 1718 bits (1904), Expect = 0.0
Identities = 976/991 (98%), Gaps = 3/991 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 116  TATGAAAAAATTAACATGATGTTGACAAACCGGGGAAACGATTCCTTCAGTTGAAAGGGGAAAA 175
      |||
Sbjct 344  TATGAAAAAATTAATGATGTTGACAAACCGGGGAAACGATTCCTTCAGTTGAAAGGGGAAAA 403

Query 176  TGGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTGATGAAATTAATAAGTTACGTTATCAACACTTGATAA 235
      |||
Sbjct 404  TGGGCTGGCTCCCGGAGTCAAGGCTGATGAAATTAATAAGTTACGTTATCAAAACACTTGATAA 463

Query 236  CGATTACACAATGCGAACTCAGTCGCTTATGAAATATAGACAGCACCAATATGCAAGCCTGA 295
      |||
Sbjct 464  CGATTACACAATGCGAACTCAGTCGCTTATGAAATATAGACAGCACCAATATGCAAGCCTGA 523

Query 296  ATACTGGGTGAAATAGCGAAAGCCGTTAAGGAAAAATTAAGATGCCATGACGGGTTTGT 355
      |||
Sbjct 524  ATACTGGGTGAAATAGCGAAAGCCGTTAAGGAAAAATTAAGATGCCATGACGGGTTTGT 583

Query 356  TATTACTACGGTACAGATACAAATGGCCATATACATCTGCCCGACATATCGTATATGCTGCA 415
      |||
Sbjct 584  TATTACTACGGTACAGATACAAATGGCCATATACATCTGCCCGACATATCGTATATGCTGCA 643

Query 416  GATGCCAAAAAGCCGATTTGTCATCACCGGCTGGCAGATTCGGATCACGTTCCAAAAAAC 475
      |||
Sbjct 644  GATGCCAAAAAGCCGATTTGTCATCACCGGCTGGCAGATTCGGATCACGTTCCAAAAAAC 703

Query 476  CGATGCCAAAAAAAAIATTAACAGATGCCATTCGATTTGCCCTGTCAGGCGCTGGGCGGGG 535
      |||
Sbjct 704  CGATGCCAAAAAATTAATTAACAGATGCCATTCGATTTGCCCTGTCAGGCGCTGGGCGGGG 763

Query 536  TTAATGTTGTTTTCAGCGGAGAGTCATTCAGGAAACCGGTCGATCAAAATTAAGAACGAA 595
      |||
Sbjct 764  TTAATGTTGTTTTCAGCGGAGAGTCATTCAGGAAACCGGTCGATCAAAATTAAGAACGAA 823

Query 596  AAGCTACGACGCAATTCGAAAGCATCAATTAACCCATATATCGCTTTTATCAATGAAAGCGG 655
      |||
Sbjct 824  AAGCTACGACGCAATTCGAAAGCATCAATTAACCCATATATCGCTTTTATCAATGAAAGCGG 883

Query 656  GATCGATACAAACAAACAGTAAACGAAACC TGAGAACGACACCTTCACAGTTGACACTTC 715
      |||
Sbjct 884  GATCGAATACAAACAAACAGTAAACGAAACC TGAGAACGACACCTTCACAGTTGACACTTC 943

Query 716  ACATAGTACAGATGTTAGTCTGCTGAACTTCATCCAGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGA 775
      |||
Sbjct 944  ACATAGTACAGATGTTAGTCTGCTGAACTTCATCCAGGCTTAAAGCCCGAAATGTTTGA 1003

Query 776  TGGCCTCGAAAGCATGTACAAAGAAATTTGTCATTTGAGAGTTATGCGAGCGGAAAGGCTGCC 835
      |||
Sbjct 1004  TGGCCTCGAAAGCATGTACAAAGAAATTTGTCATTTGAGAGTTATGCGAGCGGAAAGGCTGCC 1063

Query 836  GTTTCGAAAGCAGACACATTTTGTCAAAAGTGAATGACTTCATCGAAAGCGGCAATTTGTCT 895
      |||
Sbjct 1064  GTTTCGAAAGCAGACACATTTTGTCAAAAGTGAATGACTTCATCGAAAGCGGCAATTTGTCT 1123

Query 896  GGTTCATACGACTCAATGTCITGAAAGAGGCGAAGACATGAGCATTTACGAACTTGGCCG 955
      |||
Sbjct 1124  GGTTCATACGACTCAATGTCITGAAAGAGGCGAAGACATGAGCATTTACGAACTTGGCCG 1183

Query 956  CAGAGTCAACCAGACTTAAATATCCGATCAAGAAATATGAACACAGAAAGCAATTTGTGCC 1015
      |||
Sbjct 1184  CAGAGTCAACCAGACTTAAATATCCGATCAAGAAATATGAACACAGAAAGCAATTTGTGCC 1243

Query 1016  AAAATTCATGTTGGGCTACAGTTCAGTCTTCGATCTTCCCTGCTGTCAGAGAAATTAATGA 1075
      |||
Sbjct 1244  AAAATTCATGTTGGGCTACAGTTCAGTCTTCGATCTTCCCTGCTGTCAGAGAAATTAATGA 1303

Query 1076  AACGCCGATCGC---TGACGTTATCCCTGTA 1103
      |||
Sbjct 1304  AACGCCGATAGCTGATGACGTTGTCCTGTA 1334

```

(Lanjutan)

```

>|gb|FJ644630.1| Bacillus subtilis strain AQ1 endoxylanase glycosyl hydrolase
family 11 protein gene, complete cds
Length=766

Score = 210 bits (232), Expect = 1e-51
Identities = 116/116 (100%), Gaps = 0/116 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GGGGTACCTAGCGTGGTATTATACTGAAGGGGACGATCAAAAACGTTGGCGTTCGTTAAA 60
            |||
Sbjct 1      GGGGTACCTAGCGTGGTATTATACTGAAGGGGACGATCAAAAACGTTGGCGTTCGTTAAA 60

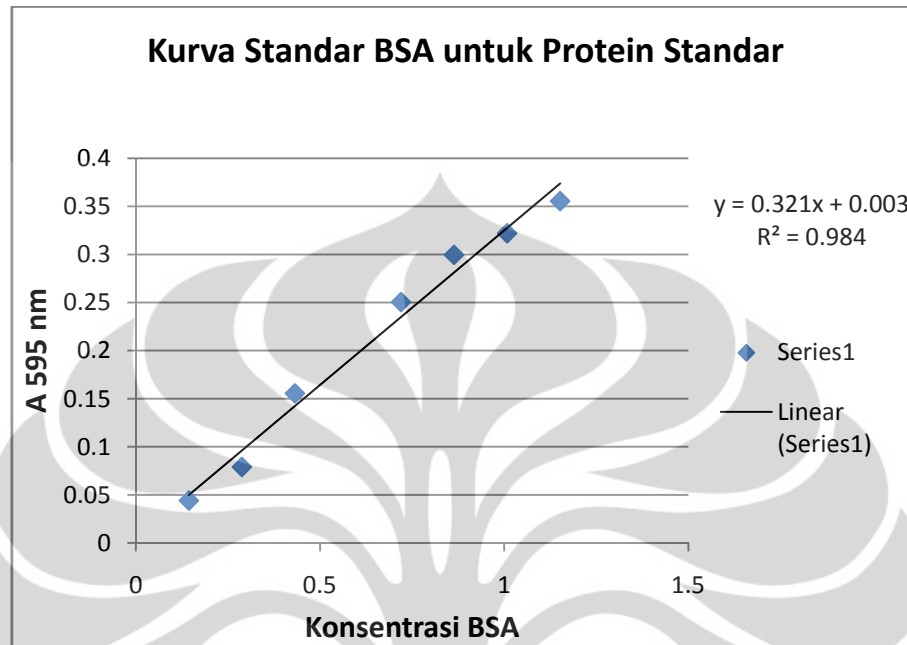
Query 61     TATTACGAGTGCTGCCTCATGTCAAAGTCAGAAAAAATAGTATAGGAGGTAACAT 116
            |||
Sbjct 61     TATTACGAGTGCTGCCTCATGTCAAAGTCAGAAAAAATAGTATAGGAGGTAACAT 116

```



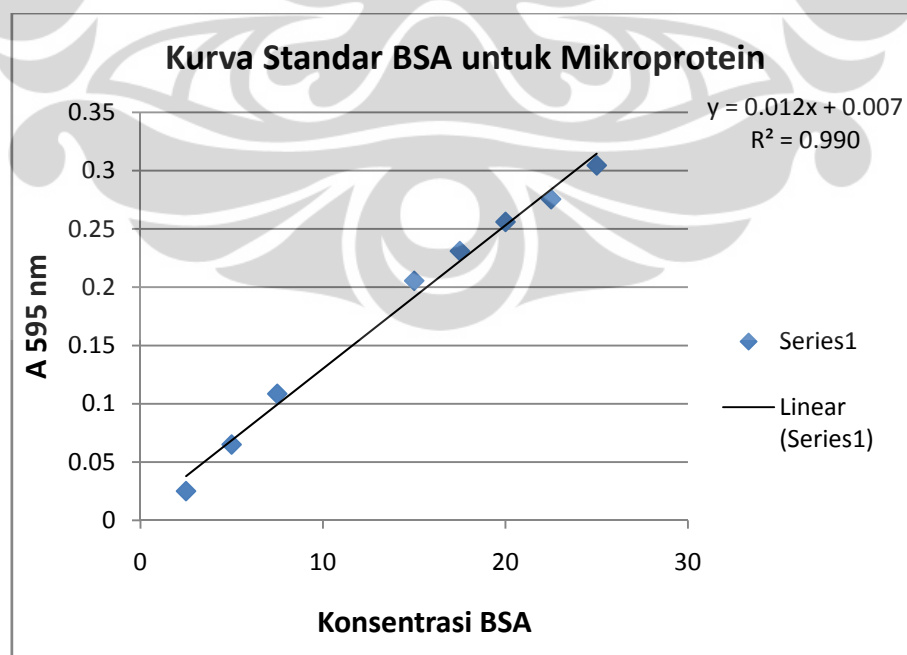
Lampiran 17

Kurva standar BSA untuk protein standar

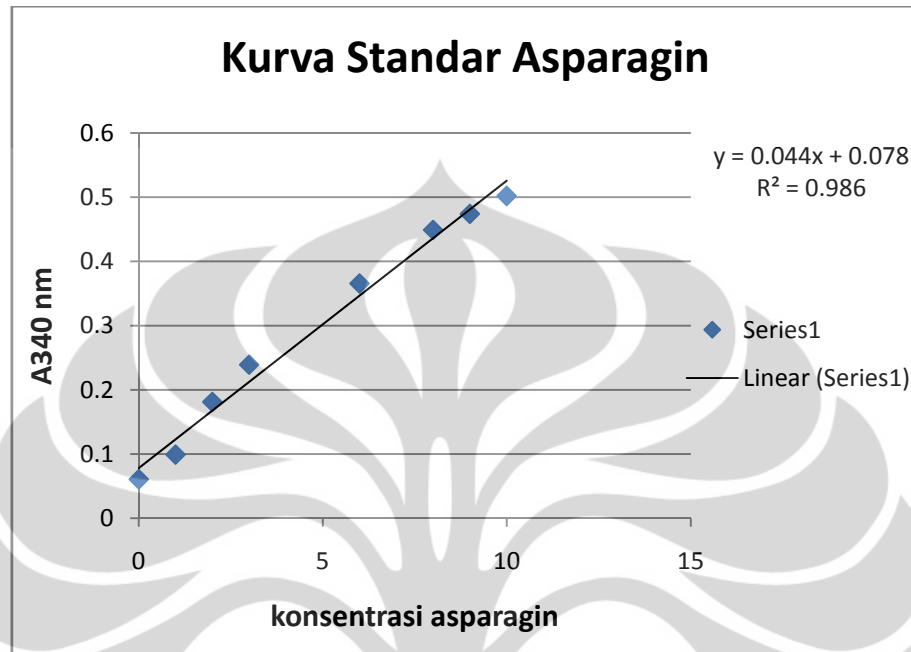


Lampiran 18

Kurva standar BSA untuk mikroprotein



Lampiran 19
Kurva standar asparaginase



Lampiran 20

Perbandingan uji aktivitas enzim L-asparaginase dari supernatan pGEM Asp klon 2.2 dan pGEM Asp AQ1

	Blanko Air (BA)	Kontrol Enzim (KE)	Sampel (S)	Δ Asp (BA+KE)-S
pGEM Asp klon 2.2	0.214	0.232	0.161	
	0.213	0.262	0.148	
	0.203	0.234	0.158	
	0.202	0.263	0.183	
Rata-rata	0.208	0.248	0.163	0.293
pGEM Asp AQ1	0.203	0.274	0.154	
	0.226	0.261	0.177	
	0.225	0.286	0.169	
Rata-rata	0.213	0.261	0.173	
	0.217	0.271	0.168	0.319

	Rata-rata Abs BA	Rata-rata Abs KE	Rata-rata Abs S	Δ Asp	Nilai x	Aktivitas U/mL	x faktor pengenceran	Protein	Aktivitas spesifik (U/mg)
pGEM Asp klon 2.2	0.208	0.248	0.163	0.293	0.479673889	0.212989605	0.851958419	0.020227642	42.11852312
pGEM Asp AQ1	0.217	0.264	0.168	0.313	0.523788251	0.232577706	0.930310823	0.019390244	47.97829401

Universitas Indonesia

Lampiran 21

Perbandingan uji aktivitas enzim L-asparaginase dari sonikasi pGEM Asp klon 2.2 dan pGEM Asp AQ1

	Blanko Air (BA)	Kontrol Enzim (KE)	Sampel (S)	Δ Asp (BA+KE)-S
pGEM Asp klon 2.2	0.504	0.089	0.363	
	0.501	0.098	0.343	
	0.503	0.091	0.343	
	0.502	0.094	0.38	
	0.503	0.093	0.357	0.238
pGEM Asp AQ1	0.562	0.11	0.458	
	0.552	0.129	0.435	
	0.55	0.121	0.424	
Rata-rata	0.535	0.1	0.412	
	0.550	0.115	0.432	0.233

	Rata-rata Abs BA	Rata-rata Abs KE	Rata-rata Abs S	Δ Asp	Nilai x	Aktivitas U/mL	Protein	Aktivitas spesifik (U/mg)
pGEM Asp klon 2.2	0.503	0.093	0.35725	0.238	0.357940585	0.158936364	0.96233078	0.165157726
pGEM Asp AQ1	0.550	0.115	0.432	0.233	0.345097163	0.153233499	1.00058858	0.153143362

Universitas Indonesia

Lampiran 22

Perbandingan uji aktivitas enzim L-asparaginase dari supernatan pUC 19 dan pGEM Asp AQ1

	Blanko Air (BA)	Kontrol Enzim (KE)	Sampel (S)	Δ Asp (BA+KE)-S
pUC 19 panen sel	0.156	0.465	0.208	
	0.164	0.467	0.195	
	0.169	0.474	0.198	
	0.163	0.464	0.195	
Rata-rata	0.163	0.468	0.199	0.432
pGEM Asp AQ1 panen sel	0.156	0.448	0.215	
	0.164	0.45	0.199	
	0.149	0.433	0.196	
	0.155	0.451	0.197	
Rata-rata	0.156	0.446	0.202	0.400

	Rata-rata Abs BA	Rata-rata Abs KE	Rata-rata Abs S	Δ Asp	Nilai X	Aktivitas U/mL	Kali faktor pengenceran	Protein	Aktivitas spesifik (U/mg)
pUC 19 panen sel	0.163	0.468	0.199	0.432	0.791	0.175549057	0.702196229	0.0294146	23.87234277
pGEM Asp AQ1 panen sel	0.156	0.446	0.202	0.400	0.719	0.159680216	0.638720863	0.0316098	20.20644707

Lampiran 23

Perbandingan uji aktivitas enzim L-asparaginase dari sonikasi pUC 19 dan pGEM *Asp* AQ1

	Blanko Air (BA)	Kontrol Enzim (KE)	Sampel	Δ Asp (BA+KE)-S
pUC 19	0.256	0.135	0.239	
	0.248	0.145	0.24	
	0.269	0.146	0.247	
	0.252	0.145	0.25	
Rata-rata	0.256	0.143	0.244	0.155
pGEM <i>Asp</i> AQ1	0.241	0.135	0.193	
	0.25	0.135	0.192	
	0.247	0.134	0.193	
	0.25	0.135	0.191	
Rata-rata	0.247	0.135	0.192	0.190

	Rata-rata Abs BA	Rata-rata Abs KE	Rata-rata Abs S	Δ Asp	Nilai X	Aktivitas (U/ml)	Protein	Aktivitas spesifik (U/mg)
pUC 19	0.256	0.143	0.244	0.155	0.171990172	0.038184399	1.052089464	0.036293871
pGEM <i>Asp</i> AQ1	0.247	0.135	0.192	0.190	0.250167523	0.055540945	1.233078281	0.045042513

Universitas Indonesia