

Kloning dan Sekuensing Gen Xilanase dengan Produk Gen Berukuran 30 kDa dari *Bacillus halodurans* CM1 pada *Escherichia coli* DH5

Dearesty Safirah¹, Is Helianti², Hermin Pancasakti Kusumaningrum¹ dan Anto Budiharjo¹

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jalan Prof. H. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang 50275.

²Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Bioteknologi, Gedung 611, LAPTIAB-BPPT,
PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang Selatan.

*Penulis korespondensi; Email: is.helianti@bppt.go.id

Abstract

The paper industry contributed the environment pollution due to chlor substances. Utilization of alkalothermophilic xylanase enzyme as a biocatalyst in the production of paper may become an environmentally friendly biobleaching alternative. *Bacillus halodurans* CM1 produces xylanase enzyme that had optimal activity at pH 9 and temperature 70°C. Previous study showed that this CM1 strains has several xylanase genes. The cloning of one of these alkalothermophiic xylanase (*alkxyn*) gene has been already conducted. This study aimed to clone *alkxyn* gene that encode alkalothermophilic xylanase enzyme from *B. halodurans* CM1 into *Escherichia coli* DH5 . Amplification of *alkxyn* has been carried out using primers for amplification xylanase 30 kDa. The *alkxyn* gene fragment was inserted into pGEM-T *Easy* vector and then transformed into *E. coli* DH5 . The results showed that the recombinant of *E. coli* DH5 harboring *alkxyn* gene from *B. halodurans* CM1 has been obtained. The sequences analysis based on BLAST showed that *alkxyn* fragment has homology (99%) with the alkaliphilic xylanase gene from *Bacillus* sp. 31 which encodes alkaliphilic xylanase (Genebank accession number: JF912895.1).

Keywords: *cloning, Bacillus halodurans* CM1, *xylanase, alkalothermophilic.*

Abstrak

Industri kertas menyumbang tingkat pencemaran lingkungan yang tinggi karena menggunakan zat kimia berbahaya, khususnya klorin. Pemanfaatan enzim xilanase alkalotermofilik sebagai biokatalis dalam produksi kertas dapat menjadi alternatif yang ramah lingkungan dengan teknologi *biobleaching*. *Bacillus halodurans* CM1 menghasilkan enzim xilanase yang mempunyai aktivitas optimum pada pH 9 dan suhu 70°C. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa galur bakteri CM1 kemungkinan memiliki lebih dari satu gen xilanase alkalotermofilik (*alkxyn*). Salah satu gen xilanase telah dikloning dan diekspresikan pada penelitian sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengkloning gen *alkxyn* lainnya yang menyandi enzim xilanase alkalotermofilik dari *B. halodurans* CM1 ke *Escherichia coli* DH5 . Amplifikasi gen *alkxyn* dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer yang telah didesain untuk mengamplifikasi gen *alkxyn*. Produk amplifikasi berukuran 30 kDa yang selanjutnya disisipkan pada vektor pGEM-T *Easy* dan ditransformasikan ke dalam bakteri kompeten *E. coli* DH5 . Hasil penelitian menunjukkan bahwa rekombinan berupa fragmen gen *alkxyn* yang berukuran 960 bp dari *B. halodurans* CM1 yang disisipkan ke dalam plasmid pGEM-T *Easy* telah diperoleh. Hasil penyejajaran sekuens melalui BLAST menunjukkan bahwa fragmen *alkxyn* memiliki tingkat homologi (99%) dengan gen *alkaliphilic xylanase* pada spesies *Bacillus* sp. 31 yang menyandi enzim xilanase alkalofilik. (No akses GenBank: JF912895.1).

Kata kunci: *Kloning, Bacillus halodurans* CM1, *xilanase, alkalotermofilik*

PENDAHULUAN

Industri kertas merupakan salah satu industri yang memegang peranan penting bagi

perekonomian Indonesia, karena Indonesia termasuk produsen kertas terbesar di Asia. Industri kertas Indonesia yang begitu pesat di sisi lain

mengakibatkan terjadinya pencemaran lingkungan, hal ini dikarenakan kegiatan utama dalam industri kertas adalah proses pembuatan bubur kertas (*pulping*) yang menggunakan bahan-bahan kimia seperti klorin pada tahap *bleaching* (pemutihan) yang diketahui kurang ramah lingkungan karena menghasilkan limbah berbahaya yang bersifat karsinogenik (Fuadi dan Sulistya, 2008). Alternatif pengganti bahan kimia yang relatif lebih ramah lingkungan yaitu dengan penggunaan enzim untuk proses *bleaching*

Enzim yang paling umum digunakan dalam proses *biobleaching* adalah xilanase. Enzim xilanase diketahui mampu menjadi fasilitator dalam memurnikan komponen selulosa karena merupakan enzim yang dapat menghidrolisis hemiselulosa dan lignin. Ulfah *et al.*, (2011) telah berhasil mengisolasi mikroba penghasil enzim xilanase alkalotermofilik *Bacillus halodurans* CM1 dari Sumber Air Panas Cimanggu yang diketahui mampu memproduksi xilanase dengan aktivitas optimum pada pH 9 dan suhu 70°C. Industri kertas memerlukan xilanase yang mampu bekerja secara optimal dalam suhu tinggi dan kondisi pH alkali yang merupakan kondisi perlakuan yang diperlukan pada proses *pulping*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *B. halodurans* CM1 mempunyai beberapa gen xilanase (Helianti *et al.*, 2014).

Upaya perbanyak enzim xilanase dapat dilakukan dengan teknologi DNA rekombinan yang lebih efisien yaitu dengan mengkloning gen penyandi enzim xilanase alkalotermofilik pada *Escherichia coli* DH5 sehingga terdapat mikroorganisme rekombinan yang dapat mengekspresikan gen tersebut dan produktivitas enzim target akan meningkat. Noer (2011), telah berhasil mengisolasi gen xilanase alkalotermofilik yang produk gennya berukuran 45 kDa. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkloning gen *alkxyn* lainnya yang menyandi enzim xilanase alkalotermofilik dari *B. halodurans* CM1 ke *E. coli* DH5. Amplifikasi gen *alkxyn* dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer yang telah didesain untuk mengamplifikasi gen *alkxyn* yang produk gennya berukuran 30 kDa.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Sumber gen menggunakan *Bacillus halodurans* CM1 (Ulfah *et al.*, 2011) koleksi Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Bioteknologi (BPPT). Sel inang (*host*) dan vektor untuk kloning menggunakan *Escherichia coli* DH5 dan plasmid pGEM-T Easy.

Amplifikasi Fragmen Gen *alkxyn* Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

B. halodurans CM1 dikultur menggunakan medium horikoshi pada pH 9 dan suhu 55°C sesuai yang dilaporkan Ulfah *et al.*, (2011). Isolasi DNA genom *B. halodurans* CM1 menggunakan metode ekstraksi fenol-kloroform seperti yang telah dilakukan sebelumnya (Ulfah *et al.*, 2011; Noer, 2011). Karakterisasi DNA genom dilakukan dengan elektroforesis gel agarose 1%. Kemurnian DNA dihitung menggunakan nanodrop. Amplifikasi gen *alkxyn* dari *B. halodurans* CM1 menggunakan KAPA Taq Hot Start DNA Polymerase (KAPA biosystem) dengan pasangan primer F-*alkxyn*-det dan R-*alkxyn*30-stop. Susunan basa nukleotida untuk primer *forward* (F-*alkxyn*-det) adalah 5'-ATGGAGAGTCGGACAGAACTAATCGTGC-3', sedangkan susunan nukleotida primer *reverse* (R-*alkxyn*30-stop) adalah 5'-TTAATAGGTGCCGAAATGGATAGG-3'. Primer didesain berdasarkan studi bioinformatika gen xilanase yang terdapat di *GenBank* dan data penelitian sebelumnya (Helianti *et al.*, 2014). Program PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit dan 30 siklus reaksi yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 59°C selama 30 detik. Akhir pemanjangan dilakukan pada tahap akhir proses PCR dengan waktu 10 menit pada suhu 72°C. Karakterisasi DNA dilakukan menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi gel 1%. Molekul DNA dipurifikasi menggunakan *Gel/PCR DNA Extraction Kit* (Geneaid) untuk kloning.

Kloning Gen *alkxyn*

Prosedur kloning dan verifikasi hasil kloning berdasarkan protokol Sambrook (2001). Kloning

gen *alkxyn* diawali dengan proses ligasi pada plasmid vektor, transformasi pada *E. coli* DH5 dan seleksi rekombinan pembawa plasmid dengan DNA sisipan. Ligasi fragmen gen *alkxyn* ke dalam vektor pGEM-T *Easy* dilakukan menggunakan enzim T4 DNA ligase dengan rasio molar 3:1. Inkubasi dilakukan pada suhu 4°C dalam waktu semalam. Hasil ligasi ditransformasi pada bakteri kompeten *E. coli* DH5. Transformasi menggunakan teknik kejutan panas (*Heat shock*) yang dimodifikasi yaitu dengan perubahan suhu secara mendadak dari inkubasi es ke termomixer (42°C) selama 1 menit dan diinkubasi kembali dalam es selama 2 menit. Bakteri kompeten *E. coli* DH5 yang telah di transformasi dikultur dalam medium SOC (Trypton 20g, *Yeast* Ekstrak 5g, NaCl 0,585g, KCl 0,186g, glukosa 2M) dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Seleksi koloni dilakukan dengan menumbuhkan bakteri transforman pada media yang mengandung antibiotik ampisilin dan IPTG X-gal. Koloni berwarna putih yang tumbuh merupakan koloni yang diduga mengandung plasmid rekombinan.

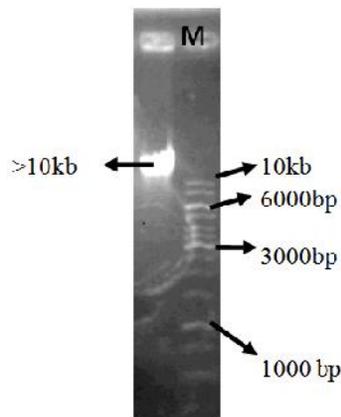
Verifikasi Hasil Kloning

Verifikasi digesti menggunakan dua enzim restriksi yaitu *EcoRI* dilakukan pada transforman kandidat plasmid rekombinan hasil kloning yang telah diisolasi dengan metode alkali. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 2 jam. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen *alkxyn*

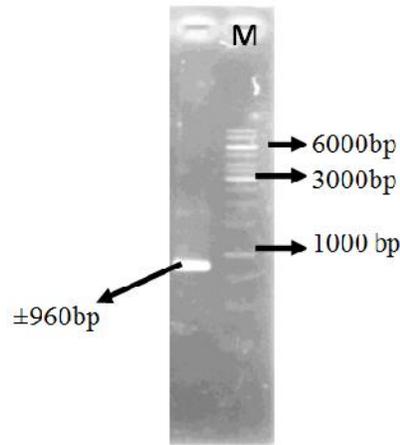
Gen *alkxyn* yang menyandi xilanase alkalotermofilik diprediksi berukuran 960 bp berdasarkan data yang berada pada *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hasil ekstraksi genom menunjukkan pita DNA yang tebal dan spesifik pada ukuran diatas 10.000 bp (Gambar 1), yang menunjukkan bahwa genom DNA telah terisolasi. Menurut Takami (2000) bahwa ukuran keseluruhan genom *B. halodurans* C-125 adalah 4.202.353 bp. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi sebesar 0,31 µg/µL



Gambar 1. Hasil ekstraksi DNA genom *B. halodurans* CM1. Lajur 1=hasil ekstraksi DNA genom ukuran >10kb. M=1kb DNA Ladder.

Produk PCR (Gambar 2) menunjukkan fragmen gen *alkxyn* dari *B. halodurans* CM1 berukuran ±960 bp yang berhasil di amplifikasi secara spesifik, tampak hanya satu pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi. Keberhasilan proses amplifikasi ditentukan oleh beberapa faktor seperti konsentrasi dan desain primer yang

digunakan, deoksiribonukleotida triposfat (dNTPs), komposisi *buffer*, jumlah siklus reaksi, enzim *taq polymerase* dan kontaminasi yang terjadi saat peracikan komponen PCR (Yuwono, 2006).

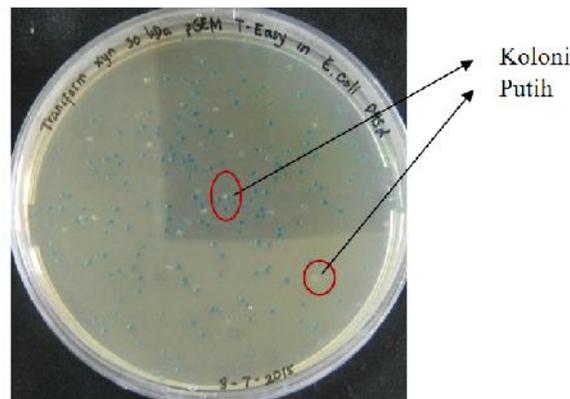


Gambar 2. Amplifikasi gen *alkxyn*. M= 1kb DNA Ladder.

Transformasi

Keberhasilan transformasi ditandai dengan adanya ekspresi gen resistensi antibiotik yang dibawa plasmid pGEM-T Easy sehingga transforman dapat hidup pada medium yang mengandung antibiotik (medium seleksi) berupa ampisilin, selain itu juga terdapatnya koloni putih hasil *screening white-blue colony*. Gambar 3 memperlihatkan adanya koloni tumbuh berwarna putih dan biru. Menurut Quail (2005) Koloni putih

yang diduga merupakan koloni rekombinan dimana terjadi supresi gen *lacZ*, sedangkan koloni biru diduga proses insersi gen pada plasmid tidak berhasil dikarenakan terjadi gen *lacZ* terekspresi. Masuk dan stabilnya plasmid dalam sel inang mengubah sifat dasar *E. coli* DH5 yang semula sensitif terhadap antibiotik ampisilin (Amp-s) menjadi resisten terhadap ampisilin (Amp-r)

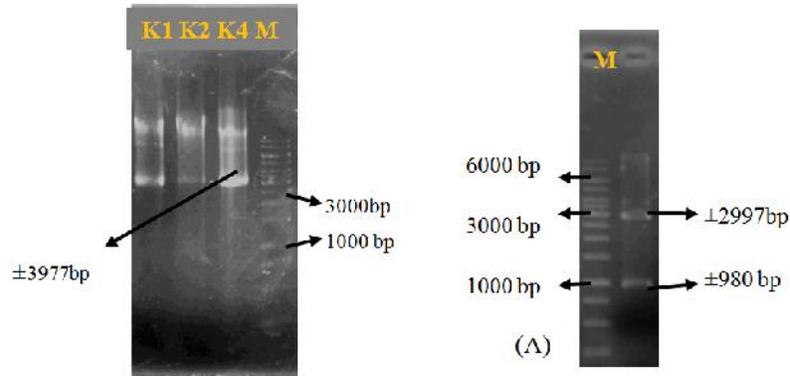


Gambar 3. Hasil Transformasi plasmid rekombinan ke dalam *E. coli* DH5

Verifikasi Hasil Kloning

Hasil digesti plasmid rekombinan oleh enzim *EcoRI* menunjukkan posisi dua pita yang berbeda karena terjadi religasi pada plasmid dan insert DNA pada pemotongan *EcoRI* yaitu pada ukuran ± 980 bp dan ± 2997 bp, adapun saat karakterisasi plasmid rekombinan yang belum di digesti dengan elektroforesis gel agarose 1% hanya

terdapat satu pita yaitu pada ukuran ± 3975 bp. Perbedaan yang terlihat cukup signifikan mengindikasikan gen *alkxyn* telah tersisipkan pada plasmid pGEM-T *Easy*. Plasmid hasil ekstraksi tidak dapat ditentukan ukuran fragmennya secara tepat sebelum didigesti menjadi bentuk linier (Carson and Robertson, 2004



Gambar 4. (A) Hasil ekstraksi plasmid rekombinan dari *E.coli* DH5 . Lajur 1-3=hasil ekstraksi plasmid dari 3 klon berbeda (klon1, klon2, dan klon 4). M=1 kb DNA *Ladder*.
(B) Hasil digesti restriksi plasmid rekombinan dari *E.coli* DH5 dengan enzim *EcoRI*.

KESIMPULAN

Fragmen gen *alkxyn* yang berasal dari genom isolat *B. halodurans* CM1 telah berhasil diinsersikan ke dalam vektor plasmid pGEM-T *Easy* yang kemudian dikloning ke *E. coli* DH5 . Keberhasilan kloning telah dibuktikan dengan analisa restriksi menggunakan *EcoRI* yang menunjukkan pita berukuran ± 980 bp dan ± 2997 bp.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh dana penelitian DIPA-BPPT tahun 2015. Penulis berterimakasih pada Sri Aprianti, S.Pd dan Dr. Is Helianti, M.Sc atas arahan dan bantuan teknis yang telah diberikan selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Carson, S. and D. Robertson. 2006. Manipulation and Expression of Recombinant DNA: A Laboratory Manual Second Edition. Elsevier Academic Press. London.
- Fuadi, A. M. dan H. Sulistya. 2008. Pemutihan Pulp dengan Hidrogen Peroksida. *Jurnal Reaktor*. 2(12): 123-128.
- Is Helianti*, Maria Ulfah, Budiasih Wahyuntari, Niknik Nurhayati, Edi Wahjono, and Dian Fajar. Vitia Ningrum. 2014. Properties of Native and Recombinant Thermoalkalophilic Xylanases from *Bacillus halodurans* CM1, and Application of the Enzymes in Industrial Deinking Process. *The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference 2014 (AMBC2014)*. 19-21 Feb 2014. Bangkok, Thailand.
- Noer, S. 2011. Kloning Gen Xilanase Alkalotermofilik pada *Escherichia coli* DH5 dan Karakterisasi Produk Gennya. *Tesis*. Universitas Indonesia. Depok.
- Quail, M. A. 2005. DNA Cloning. *Encyclopedia Of Life Sciences*. New York: John Willey and Sons Ltd. doi: 10.1038/npg.els.0005344.
- Sambrook, J., dan D.W. Russel. 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Takami, H., K. Nakasone, Y. Takaki, G. Maeno, R. Sasaki, N. Masui, F. Fuji, C. Hirama, Y. Nakamura, N. Ogasawara, S. Kuhara,

and K. Horikoshi. 2000. Complete Genome Sequence of The Alkaliphilic Bacterium *Bacillus halodurans* and Genomic Sequence Comparison With *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acid Research*. 28(21):4317-4331. (Yuwono, 2006).

Ulfah, M., I. Helianti, B. Wahyuntari, and N. Hurhayati. 2011. Characterization of a New Thermoalkalophilic Xylanase – Producing Bacterial Strain Isolated from Cimanggu Hot Spring, West Java, Indonesia. *Microbiology Indonesia*. 3(5): 139-143.

Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Erlangga. Jogjakarta.

