



UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA  
NO 19 TAHUN 2002 TENTANG HAK CIPTA

Pasal 72

KETENTUAN PIDANA  
SANGSI PELANGGARAN

1. Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau Pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).



# PROSIDING

## SEMINAR NASIONAL MIPA 2014 FMIPA UNIVERSITAS PADJADJARAN

PERAN ILMU DASAR

DALAM PEMBANGUNAN BERWAWASAN LINGKUNGAN



DISUSUN OLEH:  
PANITIA SEMINAR NASIONAL BIDANG MIPA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS PADJADJARAN



*“PERAN ILMU DASAR DALAM PEMBANGUNAN BERWAWASAN LINGKUNGAN”*

1 (satu) jilid; A4

Diterbitkan oleh:

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS PADJADJARAN

Jl. Raya Bandung-Sumedang KM. 21

Jatinangor – Sumedang 45363

Telp./Fax.: 022-7797712/7794545

ISBN : 978-602-72216-0-4

ISSN : 9772442242DD3

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara apapun, termasuk dengan penggunaan mesin fotocopy, tanpa izin sah dan tertulis dari penerbit

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Isi diluar tanggung jawab penerbit dan percetakan

Prosiding ini dicetak pada bulan Januari 2015



## SUSUNAN DEWAN REDAKSI PROSIDING SEMINAR NASIONAL BIDANG MIPA FMIPA UNPAD 2014

Penanggung Jawab	: Dekan FMIPA Unpad
Ketua Dewan Redaksi	: Ketua Seminar MIPA Unpad 2014
Dewan Penelaah	: Prof. Dr. Budi Nurani Prof. Dr. Johan Iskandar Dr. Atje Setiawan A Septiadi Padmadisastra, Ph.D Dr. Setiawan Hadi, M.Sc.Cs Dr. Juli Rejito Dr. Ruhyat Partasasmita, .M.Si Dr. Euis Julaeha, M.Si Dr. Tati Herlina, M.Si Dr. Anni Anggraeni, M.Si Dr. Ayi Bahtiar, M.Si Dr. Iman Rahayu, M.Si Dr. Teguh Husodo, M.Si Dr. Lienda Noviyanti, M.Si Dr. Nurzaman Dr. Dikdik Kurnia, M.Sc Dr. Sahrul Hidayat Dr. Diah Chaerani, M.Si Dr. Lusi Safriani, M.Si Annisa, M.Si., Ph.D
Editor Pelaksana	: Dr. Dikdik Kurnia, M.Sc. Dr. Diah Chaerani, M.Si. Dr. Lusi Safriani, M.Si.
Desain Sampul	: Eko Nugroho
Layout	: Iman Nugraha



## Daftar Isi

Daftar Isi.....	v
Sambutan Rektor Unpad.....	xii
Sambutan Ketua Panitia Seminar Nasional MIPA 2014 .....	xiv
Air Pollution and Perception-Based Averting Behavior The Case of The Jinchuan Mining Area, China .....	1
<i>Henk Folmer</i>	
Pengembangan Model Prediksi SST Nino 3.4 Dan IOD Terkait Dengan Datangnya Kemarau Panjang.....	2
<i>Eddy Hermawan, Rizki Krisnanto dan Shailla Rustiana</i>	
Menjawab Tantangan: Peran Inovasi Sains Dalam Membangun Masa Depan Yang Berkelanjutan .....	3
<i>Abdul Haris</i>	
Recent Study on Biologically Active Natural Products From Some Indonesia Aglaia Plants .....	4
<i>Unang Supratman, Mariam Ulfah, Asep Supriadin, Tri Mayanti, Desi Harneti, Nurlelarsi, Khalijah Awang and Hideo Hayashi</i>	
Perbandingan Metode Beda Hingga Pada Perhitungan Harga Opsi Asia.....	14
<i>Abdul Aziz dan Wahyudi</i>	
Menentukan Waktu Penggantian Optimum Salah Satu Komponen Mesin Pada Bus Penumpang Damri Dengan Model Age Replacement .....	19
<i>Julita Nahar</i>	
Fungsi Mittag-Leffler Sebagai Alternatif Untuk Mencari Solusi Persamaan Diferensial Fraksional .....	24
<i>Endang Rusyaman, Kankan Parmikanti dan Ema Carnia</i>	
Pemecahan Persamaan Diferensial Non Homogen Tingkat Dua Dengan Koefisien Konstan Menggunakan Fungsi Green.....	30
<i>Eddy Djauhari</i>	
Model Optimisasi Perencanaan Produksi Rantai Pasok Loop Tertutup Dengan Tingkat Permintaan Dan Pengembalian Produk Yang Tidak Tentu Menggunakan Metode Wolfe .....	34
<i>Aris Prasetya, Diah Chaerani dan Eman Lesmana</i>	
Karakterisasi Fisiko Kimia Tepung Biji Nangka ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> ) Dengan Penggilingan Basah Dan Kering Dalam Upaya Diversifikasi Pangan Fungsional .....	42
<i>Ade Heri Mulyati dan Diana Widiastuti</i>	
Sifat Adsorpsi Daun Lidah Mertua ( <i>Sansevieria trifasciata</i> ) Terhadap Logam Kadmium Dan Kromium .....	47
<i>Uji Pratomo, Anni Anggraeni, Diana Hendrati dan Rubianto Abd Lubis</i>	
Aktivitas Senyawa Dari Buah Merah ( <i>Pandanus conoideus Lam.</i> ) Terhadap <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ...	51
<i>Harold Eka Atmaja, Dikdik Kurnia dan Dadan Sumiarsa</i>	
Pelarutan Monasit Dalam Sistem Tertutup Dengan Menggunakan Basa Serta Pemisahan Unsur Tanah Jarangnya ...	58
<i>Anni Anggraeni, Kokentyo Juniawan, Yuhelda Dahlan, Uji Pratomo, dan Husein H. Bahti</i>	
Terpenoid Dari Umbi Tumbuhan Sarang Semut ( <i>Myrmecodia pendans</i> ) Dan Uji Aktivitas Antibakteri <i>Enterococcus Faecalis</i> .....	63
<i>Boima Situmeang, Dadan Sumiarsa dan Dikdik Kurnia</i>	
Konstruksi Dan Optmasi Gen Pretrombin-2 Manusia Dalam <i>Escherichia coli</i> Untuk Produksi Trombin Sebagai Komponen Lem Fibrin .....	68
<i>Saronom Silaban, Iman Permana Maksum, Shabarni Gaffar, Sutarya Enus, Khomaini Hasan, Toto Subroto dan Soetijoso Soemitro</i>	
Sintesis Hidrotalsit Mg/Fe/Al/Ce Dengan Metode Kopersipitasi-Hidrotermal: Leachabilitas Kebasaan Dan Derajat Kristalisasi.....	73
<i>Mochamad Zen, Dadan Sumiarsa1, Roekmi-ati Tjokronegoro dan Rustam E. Siregar</i>	



Aplikasi Koagulan Cair Al-Fe Berbasis Lempung Alam Pada Pengolahan Air Gambut: Efek Temperatur Kalsinasi Dan Pelindian .....	77
<i>Muhdarina, Amilia Linggawati, T.Ariful Amri, Reza Syahroni dan Hevi Sutrisno</i>	
Nisbah daya oksidasi elektrode Pt Vs Fe dalam proses MEO .....	82
<i>Rubianto Abd Lubis, Allyn Pramudya S., dan Uji Pratomo</i>	
Pengaruh Ekstrak Daun Medang Perawas ( <i>Litsea odorifera</i> Val.) Terhadap Tukak Lambung <i>Mus Musculus</i> Jantan.....	85
<i>Dewi Handayani, Agus Sundaryono dan Raidatul Fannyda</i>	
Analisis Kimia Tanah Dengan Perangkat Uji Tanah Kering (PUTK) Untuk Rekomendasi Pemupukan Tanaman Kedelai ( <i>Glycine max</i> , Linn) Untuk Kabupaten Bengkulu Selatan .....	91
<i>Nurmegawati, Yahumri dan Salastri Rohiat</i>	
Optimasi konsentrasi Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside pada ekspresi gen Pretrombin-2 manusia dalam <i>Escherichia coli</i> .....	95
<i>Rizky Rhimadania Dwi Wahyuni, Saronom Silaban, Khomaini Hasan, Dian Siti Kamara, Sutarya Enus, Iman Permana Maksum, Toto Subroto dan Soetijoso Soemitro</i>	
Sintesis Silikalit-1 Menggunakan Bahan Dasar Silika Sekam Padi Dan Karakterisasinya .....	101
<i>Solihudin</i>	
Penambahan Polianilin Untuk Meningkatkan Konduktivitas Baterai LiFePO <sub>4</sub> .....	107
<i>Iman Rahayu, Sahrul Hidayat dan Lutfi Aryadi</i>	
Pembuatan Resin Berbasis Epoksi Termodif Ikasi Poliuretan Dengan Dan Tanpa Penambahan Katalis Dibutiltin Dilaurat .....	111
<i>Herlan Herdiawan, Evi Triwulandari dan Muhammad Ghozali</i>	
Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Bawang Laut ( <i>Proiphys amboinensis</i> (L.) Herb.) .....	116
<i>Meiske S. Sangi, Harry S.J. Koleangan dan Chendy C. Dapas</i>	
Studi Produksi Virgin Coconut Oil (VCO) Dengan Cara Fermentasi Menggunakan Campuran <i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Dan <i>Neurospora sitophila</i> .....	122
<i>Sadiyah Djajasopeana, R. Ukun M S Soedjanaatmadja dan Yuni Lestari</i>	
Pengolahan Limbah Cantinamipa Dengan Proses Adsorpsi Menggunakan Batang Pisang Dan Ampas Teh .....	127
<i>Putri Prasetyaningtyas, Christi L. Natanael dan Yati B. Yuliyati</i>	
Isolasi Senyawa Antioksidan Pada Alga Laut <i>Eucheuma spinosum</i> .....	132
<i>Lena Damongilala, Eti Apriyanti dan Dikdik Kurnia</i>	
Isolasi Senyawa Antioksidan Pada Alga Laut ( <i>Laurencia trono</i> ) Dari Perairan Sulawesi Utara .....	135
<i>Verly Dotulong I, Eti Apriyanti dan Dikdik Kurnia</i>	
Penurunan Konsentrasi Tembaga dan Asam asetat dalam Limbah Laboratorium Kimia Universitas Padjadjaran dengan Penggunaan Ampas Teh .....	139
<i>Nina Andhini Pratiwi, Christi Liamita Natanael dan Yati B. Yuliyati</i>	
Sub-Kloning Gen $\alpha$ -amilase <i>Saccharomyces fibuligera</i> (Sfamy) Dalam Inang <i>Escherichia coli</i> .....	146
<i>Shabarni Gaffar, Siti Rohanah, Toto Subroto dan Soetijoso Soemitro</i>	
Potential Energy Surfaces of Reaction of F <sup>+</sup> with O <sub>3</sub> .....	153
<i>Juliandri</i>	
Ekstraksi Silika Dari Sekam Padi Dengan Metode Presipitasi Dan Aplikasinya Sebagai Pelapis Hidrofobik.....	158
<i>Atiek Rostika Noviyanti, Solihudin, Yati B. Yuliyati dan Vivian Nur Shabrina</i>	
Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Daun Tumbuhan Gambir ( <i>Uncaria gambir</i> Roxb.) .....	163
<i>Tiara Arindy Tikasari, Dikdik Kurnia dan Ika Wiani</i>	
Pengaruh Ph Dan Kecepatan Alir Pada Pemisahan Enansiomer Ofloksasin Melalui Pembentukan Diastereoisomer Dengan L-Isoleusin Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	167
<i>Diana Hendrati, Zenith Putri Dewianti dan Titin Sofyatin</i>	



Terpenoid Dari Umbi Tumbuhan Sarang Semut ( <i>Myrmecodia pendans</i> ) Yang Beraktivitas Antikanker.....	170
<i>Indah Permata Yuda, Dikdik Kurnia dan Dadan Sumiarsa</i>	
Isolasi Senyawa Steroid dari Umbi Sarang Semut ( <i>Myrmecodia pendans</i> Merr. & L.M. Perry).....	176
<i>Hilmana Radhia Putera, Dikdik Kurnia dan Dadan Sumiarsa</i>	
Studi Interaksi Antara Kation Klor Dengan Molekul Ozon Menggunakan Metode Kimia Komputasi DFT.....	182
<i>Rustaman, Juliandri dan Alfredo Zefanya Sinurat</i>	
Analisis Zat Gizi Biskuit Difortifikasi Ekstrak Kulit Buah Manggis ( <i>Garcinia Mangostana</i> .L).....	189
<i>Nenden Indrayati Anggraeni, M.Fahmi Fahrudin</i>	
Studi Penumbuhan Single Kristal Sistem Spin Ferromagnetik Satu Dimensi (1D) $RbFeCl_3$ .....	195
<i>R. Tasomara, T. Kawamata, Y. Matsuoka, Y. Koike dan Risdiana</i>	
Pengaruh Penambahan Bahan Manetik Fe Terhadap Nilai Reduksi Oksigen Dan Struktur Kristal Bahan Superkonduktor $Eu_{1.85+y}Ce_{0.15-y}Cu_{1-y}Fe_yO_{4+\alpha-\delta}$ .....	200
<i>S. Pratiwi, D. Suhendar, W. A. Somantri, N. Suhendi, T. Saragi dan Risdiana</i>	
Sintesis dan Karakterisasi Poli (3-Glisidiloksi propiltrimetoksisilan) untuk Bahan Proteksi Korosi Pipa Baja Karbon.....	204
<i>Tuti Susilawati, Fitrilawati dan Naely Zulfa</i>	
Rancang Bangun Solar Water Heater dan Pelat Absorber Untuk Pemanfaatan Panas Buangan Sel Surya .....	208
<i>Marrisa Alrinkha Ega Putri, Came lilia Panatarani dan I Made Joni</i>	
Desain dan Simulasi DC-DC Converter untuk Rumah DC Unpad .....	214
<i>Mohammad Taufik, Taufik dan Bernard Y Tumbelaka</i>	
Identifikasi Gugus Fungsi Silicone Oil 5500 Cst Sebagai Cairan Tamponade Pada Bedah Vitreoretina .....	217
<i>H. S. Nusa, W. Astuti, A. S. Kartasasmita, R. Virgana, N. Syakir, A. Bahtiar, L. Safriani dan Risdiana</i>	
Pengaruh Perlakuan Annealing Terhadap Kandungan Oksigen Dan Kualitas Bahan Superkonduktor Doping Elektron $Eu_{2-y}Ce_yCuO_{4+\alpha-\delta}$ .....	221
<i>Dadan Suhenda, Siska Pratiwi, Wahyu A. Somantri, Nendi Suhendi, Togar Saragi dan Risdiana</i>	
Pengaruh Capping Molekul Squaraine terhadap Sifat Optik Material Campuran Polimer Poli(3-Heksiltiofen):Zinc Oksida Nanopartikel (P3HT:ZnO-NP).....	225
<i>Siti Halimah Tusaddiah, Wendy Paramandhita S.M dan Ayi Bahtiar</i>	
Interpretasi Data Geolistrik Untuk Penentuan Pola Sedimentasi Daerah Aliran Sungai Luk Ulo, Karang Sambung..	229
<i>Marselina Sitingjak, Dini Fitriani dan Anggie Susilawati</i>	
Studi Keanekaan Jenis Dan Populasi Burung Di Kawasan Bandung Timur .....	233
<i>Johan Iskandar</i>	
Inokulan Cair Azotobacter Berbasis Molase Untuk Menekan Kerusakan Tanaman Sawi Akibat Infestasi <i>Rhizoctonia solani</i> .....	238
<i>Reginawanti Hindersah, A. Marthin Kalay, Wilhermina Rumahlewang, Abraham Talahaturuson dan Martha Maria Maskikit</i>	
Uji Fitokimia Pada Tumbuhan Obat Di Triangulasi-Sadengan Taman Nasional Alas Purwo .....	244
<i>Rahayu Apriyanti, Asep Zainal M dan M. Nurzaman</i>	
Studi Komparatif Kekerabatan dan Keanekaragaman Jenis Tumbuhan Paku (Pteridophyta) di Sekitar Kawah di Beberapa Gunung di Jawa Barat .....	249
<i>Suryana, Yayasan Ruchiyat dan Budi Irawan</i>	
Potensi Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Minyak Atsiri Buah Paprika ( <i>Capsicum annum</i> var. <i>grossum</i> ) Terhadap Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> dan <i>Klebsiella pneumonia</i> .....	255
<i>Ida Indrawati, Budi Irawan, Masagus dan Rizki Radiansyah</i>	
Optimisasi pH Medium Kultur Untuk Produksi Biosurfaktan Pada Bakteri Indigenous Oily Sludge .....	262
<i>Nia Rossiana, Asri Peni Wulandari dan Azka Manzilah</i>	
Struktur Komunitas Bivalvia Di Kawasan Mangrove Perairan Bontolebang Kabupaten Kepulauan Selayar Sulawesi Selatan.....	265
<i>Magdalena Litaay, Darusalam dan Dody Priosambodo</i>	



Mysida Mesopodopsis Sebagai Bahan Pembuat Terasi .....	272
<i>Rose O.S.E. Mantiri</i>	
Efektivitas Inokulan Mikroba Terpilih Berbasis Kompos Iradiasi Terhadap Degradasi TPH Di Dalam Tanah Tercemar Lumpur Minyak Bumi.....	275
<i>Nana Mulyana, Tri Retno Dyah Larasati dan Dadang Sudrajat</i>	
Kloning Gen Pab Mycobacterium Tuberculosis Ke Vektor Ekspresi Pqe30 Sebagai Antigen Untuk Kit Diagnostik Tuberculosis Laten.....	283
<i>Rosana Agus, Sjafaraenan, Helmy Widyastuti dan A. Arfan Sabran</i>	
Korelasi Kondisi Daun Terhadap Kadar Pb, dan Klorofil Daun <i>Hibiscus tiliaceus</i> dan <i>Swietenia macrophylla</i> King di Kampus Universitas Hasanuddin Makassar .....	287
<i>Sri Suhadiyah, Roland A Barkey dan Elis Tambaru</i>	
Pencegahan Kebotakan Akibat Pemberian Etoposid dengan Menggunakan Berbagai Produk Olahan Kedelai ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr.) .....	292
<i>Madiah, Cucu Hadiansyah dan Yetty Yusri Gani</i>	
Potensi Antigenotoksik Dari Beberapa Kultivar Daun Mangga Pada Mencit ( <i>Mus musculus</i> L.) Yang Diinduksi Kadmium Klorida.....	298
<i>Nining Ratningsih, Annisa, Dhita A Ruspendi, Rini Hafzari dan Supartini Syarif</i>	
Aktivitas Ekstrak Etanol Dan Senyawa Spinasterol Daun Senggugu ( <i>Clerodendron serratum</i> L.) Dalam Menurunkan Kadar Kolesterol Total Serum Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) Jantan .....	302
<i>Desak Made Malini</i>	
Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Tempe Bosok.....	306
<i>Muhammad Iqbal Perdana, Rifqi Nur H, Elisabeth Diani, Lia Pramusintia Daru M, Nur Fathurahman R dan Astuti</i>	
Jenis-Jenis Tumbuhan Pesisir Di Wilayah Oba Dan Oba Tengah Halmahera Maluku Utara .....	312
<i>Budi Irawan</i>	
Struktur Komunitas Lamun Di Pantai Pancur Taman Nasional Alas Purwo, Banyuwangi, Jawa Timur.....	315
<i>Alberta Widhi A. Putri dan Tri Dewi K. Pribadi</i>	
Peningkatan Populasi Bradyrhizobium Di Rizosfer Dan Pertumbuhan Vegetatif Kedelai Melalui Aplikasi Eksopolisakarida Azotobacter .....	319
<i>Dirga Sapta Sara, Reginawanti Hindersah dan Mieke R. Setiawati</i>	
Pengolahan Limbah Daun Kering Dan Kulit Ganyong Dengan Sedimen Selokan Sebagai Sumber Biogas .....	324
<i>Wanda Irawan, Imela Sukma Tifana, Vanessa Catarina dan Irawan Sugoro</i>	
Efektivitas Ragi Tempe Berbahan Tepung Ganyong Terhadap Produksi Tempe .....	328
<i>Nurwinda Ekawati, Melvin Anggriawan, Afra Nadya R. dan Irawan Sugoro</i>	
Analisis Vegetasi Indikator Kondisi Ekosistem Hutan Alam.....	332
<i>Wulandari Fitria Sartika, Teguh Husodo dan Prihadi Santoso</i>	
Pengaruh Faktor Lingkungan Terhadap Vegetasi Tumbuhan Bawah .....	337
<i>Fithriya Karimah, Teguh Husodo dan Prihadi Santoso</i>	
Pengaruh Konsentrasi Pakan Hijauan Sorghum ( <i>Sorghum bicolor</i> ) Terhadap Fermentasi Cairan Rumen Kerbau Secara <i>In Vitro</i> .....	345
<i>Hilyati Melida Putri, Jumron Waris dan Irawan Sugoro</i>	
Identifikasi Spora Endomikoriza Indogenous Lahan Tercemar Merkuri Di Pongkor Bogor .....	353
<i>Joko Kusmoro, Titin Supriatun, Nia Rossiana dan Bob Adyari</i>	
Pengembangan Perangkat Lunak Analisis Ketidakpastian Pada Perhitungan Struktur Material .....	356
<i>Entin Hartini, Roziq Himawan dan Nursinta Adiwahanani</i>	
Perbandingan Fungsi Respons Stokastik Hasil Kedelai Terhadap Pemupukan Kalium.....	361
<i>Mohammad Masjkur</i>	
A Comparison of Maximum Likelihood and Bayesian Estimator of Disease Risk by Means of Monte Carlo Simulation .....	366
<i>I Gede Nyoman Mindra Jaya, Henk Folmer, Budi Nurani Ruchjana, Sudartianto dan Soemartini</i>	





Perhitungan Fungsi Dosis Radial Dan Fungsi Anisotropi Sumber Brakiterapi I-125 Tipe S01 Menggunakan Simulasi MCNPX.....	375
<i>Anik Purwaningsih dan Moch Subechi</i>	
Optimasi Query Cbir Database Citra Berukuran Besar Menggunakan Klaster Indeks <i>K-Means</i> .....	380
<i>Juli Rejito dan Deni Setiana</i>	
Aplikasi Gelombang Otak Pada Lampu Led Menggunakan Mindflex.....	386
<i>Asep Sholahuddin, Setiawan Hadi dan M. Fayyadh</i>	
Pemanfaatan DeWa Framework untuk Deteksi Dini Kanker Kulit Pada Citra Biomedis .....	389
<i>Setiawan Hadi, Bernard Y Tumbelaka, Budi Irawan dan Rudi Rosadi</i>	
Index Penulis .....	394
Index Kata Kunci.....	397

# SAMBUTAN

---



## Sambutan Rektor Unpad

### Seminar Nasional MIPA 2014

### “Peran Ilmu Dasar dalam Menunjang Pembangunan Berwawasan Lingkungan”

Bale Sawala, 18 Oktober 2014

*Assalamu’alaikum wr. wb.*

Puji dan syukur senantiasa kita panjatkan kehadiran Illahi Rabbi yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-nya, ilmu, kesehatan, keselamatan, umur dan rezeki kepada kita semua.

Alhamdulillah pada hari yang berbahagia ini, kita dapat berkumpul bersama dalam acara Seminar Nasional MIPA 2014 dengan tema **“Peran Ilmu Dasar dalam Menunjang Pembangunan Berwawasan Lingkungan”**

Universitas Padjadjaran sebagai salah satu perguruan tinggi besar yang ada di Indonesia, senantiasa berusaha meningkatkan kualitas pendidikan dan penelitian diberbagai bidang. Peningkatan kualitas tersebut merupakan bagian dari proses kemajuan seiring dengan dinamika masyarakat yang bergerak sangat cepat.

Oleh karena itu, saya melihat bahwa Seminar Nasional ini merupakan langkah nyata dalam upaya meningkatkan kualitas para dosen dan peneliti kita untuk memberikan kontribusi kepada bangsa dan masyarakat. Bertemunya para ilmuwan yang berkecimpung dalam bidanga MIPA dari berbagai perguruan tinggi dan institusi ilmiah di tanah air merupakan jembatan terjalannya interaksi komunikasi dan diseminasi ilmiah yg lebih baik.

Saya berharap, Seminar Nasional ini dapat menghasilkan pemikiran dan pemahaman rumusan nyata dalam pembangunan ilmu pengetahuan khususnya yang berkenaan dengan ilmu dasar MIPA. Disamping itu, dengan semangat kebersamaan antar para ilmuwan, kegiatan ini dapat menjadi sarana untuk menjalin kerjasama dalam upaya memberdayakan dan melestarikan potensi sumber daya alam Indonesia untuk pembangunan nasional berkelanjutan yang berwawsan lingkungan.

Saya ucapkan selamat melaksanakan Seminar Nasional ini kepada para peserta dari seluruh Indonesia.

Saya mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung suksesnya acara ini,

Terima Kasih,

*Billahitaufik Walhidayyah*  
*Wassalamu’alaikum wr. wr.*

Rektor,  
Prof. Ganjar Kurnia



**Seminar Nasional MIPA 2014**  
**“Peran Ilmu Dasar dalam Menunjang Pembangunan Berwawasan Lingkungan”**  
Bale Sawala, 18 Oktober 2014

*Bismillahirrahmaniirahiim*

*Assalamu'alaikum wr. wb.*

Salam sejahtera dan selamat pagi untuk kita semua

Pertama-tama marilah kita sampaikan puji dan syukur ke Hadlirat Illahi Robbi yag telah memberikan rahmat dan karunia-Nya kepada kita, sehingga kita diberi sehat dan dapat hadir mengikuti kegiatan Seminar Nasional MIPA 2014 di Kampus Unpad-Jatinangor.

Kami ucapkan selamat datang di Kampus Jatinangor bagi para Undangan, Pembicara Utama serta Pemakalah baik oral maupun poster dan juga para Peserta Seminar Nasional MIPA 2014. *Special thank to Prof. dr. Henk Folmer from Faculty of Spatial Sciences, University of Groningen-who always give support to our faculty.* Terima kasih kepada Prof. Dr. Eddy Hermawan-LAPAN Bandung, Dr. rer. nat. Abdul Haris –Dekan FMIPA UI dan Sekjen MIPAnet serta Prof. Dr. Unang Supratman-Guru Besar Kima FMIPA Unpad. Kami sampaikan terima kasih pula kepada Himpunan Matematika Indonesia (IndoMS), Himpunan Kimia Indonesia (HKI), Himpunan Fisika Indonesia (HFI), Konsorsium Biologi Indonesia (KOB), Forum Statistika (FORSTAT) dan Pusat Studi Pengembangan MIPA (PURISKA) yang telah memberikan dukungan bagi terlaksananya kegiatan ini.

Seminar Nasional MIPA 2014 ini diselenggarakan sebagai bagian dari rangkaian kegiatan dalam rangka Dies ke-56 Fakultas MIPA Unpad. Tema yang dipilih adalah “*Peran Ilmu Dasar dalam Menunjang Pembangunan Berwawasan Lingkungan*”. Tema ini mengacu pada Pola Ilmiah Pokok Unpad “Bina Mulia Hukum dan Lingkungan Hidup untuk Pembangunan Nasional”. PIP ini tentunya sarat dengan makna dalam aplikasinya pada kehidupan. Secara kongkrit, sivitas akademika FMIPA dan Unpad umumnya hendaknya senantiasa dapat menerapkan pola pikir taat hukum dalam berbagai aspek kehidupan untuk mendukung lingkungan baik fisik, ekonomi, sosial serta budaya.

Besar harapan kami kegiatan Seminar Nasional MIPA 2014 dapat merealisasikan kerjasama sivitas akademika FMIPA Unpad untuk melaksanakan Tri Dharma Perguruan Tinggi yang melibatkan berbagai bidang keilmuan: matematika, kimia, fisika, biologi, statsitika, geofisika serta teknik informatika baik dari sisi kajian teoretis maupun aplikasinya dalam fenomena kehidupan yang berwawasan lingkungan.

Kepada jajaran panitia, kami mengucapkan terima kasih atas persiapan dan koordinasi yang baik dalam kegiatan seminar ini. Kami mohon maaf kepada para Undangan, Pemateri dan Peserta apabila dalam pelaksanaan seminar masih terdapat berbagai kekurangan.

Kepada seluruh peserta dan pemateri, kami mengucapkan selamat melaksanakan Seminar Nasional MIPA Unpad tahun 2014, semoga pelaksanaan seminar berjalan lancar dan kita semua diberi sehat untuk mengikuti seminar ini sampai selesai.

Demikian sambutan dari kami. Akhirul kata kami ucapkan *Billahitaufik Walhidayyah Wassalamu'alaikum wr. wb.*

Dekan,

Prof. Dr. Budi Nurani R.



## Sambutan Ketua Panitia Seminar Nasional MIPA 2014

Selamat Datang di SEMNAS MIPA 2014

Pada pagi yang cerah ini, izinkanlah saya mengucapkan selamat datang kepada semua peserta Seminar Nasional MIPA 2014 di Gedung Rektorat Kampus Unpad Jatinangor. Dalam satu hari ini kita akan bersama-sama berbagi hasil-hasil penelitian di bidang MIPA yang terdiri atas Matematika, Kimia, Fisika, Biologi, Statistika, Geofisika dan Teknik informatika serta bidang ilmu terkait lainnya, dengan harapan adanya komunikasi ilmiah antar peneliti dari berbagai universitas dan instansi ilmiah dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas pendidikan dan dalam rangka pemanfaatan sumber daya alam untuk pembangunan berkelanjutan yang berwawasan lingkungan. Disamping itu, Seminar Nasional ini diharapkan juga dapat menjalin kerjasama antar peneliti bidang MIPA di seluruh Indonesia.

Seminar Nasional MIPA 2014 yang diselenggarakan oleh Fakultas MIPA Unpad sebagai rangkaian acara Dies MIPA Unpad ke 56 di kampus Unpad Jatinangor.

Kegiatan seminar ini diikuti oleh 154 pemakalah yang terdiri atas 4 pembicara tamu, 95 presentasi oral dan 55 presentasi poster yang berasal dari perguruan tinggi dan institusi penelitian di Indonesia. Selain itu, hari ini juga dilaksanakan hasil penelitian dan produk kreatifitas mahasiswa MIPA Unpad yang lolos pada kegiatan PIMNAS tahun 2014. Dalam kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih kepada seluruh peserta dari seluruh Indonesia atas partisipasinya pada Seminar ini.

Ucapan terima kasih juga kami ucapkan kepada MIPAnet, Himpunan Matematika Indonesia, Himpunan Kimia Indonesia, Konsorsium Biologi Indonesia, Himpunan Fisika Indonesia, Forum Pendidikan Tinggi Statistik Indonesia, dan juga kami sampaikan terima kasih kepada PURISKA yang telah membantu kegiatan kami. Tentu saja kami sampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada seluruh rekan panitia Seminar Nasional MIPA 2014 atas usaha kerja kerasnya dalam menyukseskan Seminar ini.

Terakhir, kami mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Padjadjaran atas fasilitas yang diberikan serta berkenan untuk mendukung penuh Seminar Nasional ini.

Wassalamu'alaikum wr wb  
Ketua Panitia Seminar Nasional MIPA 2014

Dr. Dikdik Kurnia, M.Sc



# Konstruksi Dan Optmasi Gen Pretrombin-2 Manusia Dalam *Escherichia coli* Untuk Produksi Trombin Sebagai Komponen Lem Fibrin

Saronom Silaban<sup>1,2\*</sup>, Iman Permana Maksu<sup>1</sup>, Shabarni Gaffar<sup>1</sup>, Sutarya Enus<sup>3</sup>,  
Khomaini Hasan<sup>4</sup>, Toto Subroto<sup>1</sup> dan Soetijoso Soemitro<sup>1</sup>

Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Universitas Padjadjaran, Bandung<sup>1</sup>

Jurusan Kimia, Universitas Negeri Medan, Medan<sup>2</sup>

Pusat Mata Nasional, Rumah Sakit Mata Cicendo, Bandung<sup>3</sup>

Pusat Penelitian Pangan, Kesehatan dan Obat, Institut Teknologi Bandung, Bandung<sup>4</sup>

\*silabans@gmail.com

## Abstrak

Lem fibrin merupakan biomaterial perekat yang menggunakan trombin, fibrinogen dan faktor XIII sebagai bahan utama. Bahan ini dapat diterapkan untuk mengganti teknik jahitan pasca operasi. Dalam studi ini, kami mendesain dan mengkonstruksi gen *prethrombin-2* (*pt2*) manusia, yang merupakan prekursor trombin. Gen *pt2* difusikan dengan suatu tag pada posisi N terminalnya, yang mengandung urutan pengode intein diikuti oleh domain pengikat kitin, yang bermanfaat untuk proses pemurnian. Proses pemotongan *pt2* dari tag diinduksi melalui perubahan pH/ suhu. Kodon *pt2* dirancang sesuai dengan kodon preferensi *Escherichia coli*. Gen *pt2* dirancang menggunakan software OPTIMIZER dengan penambahan dua sisi restriksi pada ujung 5' dan 3' nya, yaitu berturut-turut *Bam*HI dan *Xho*I, selanjutnya dikloning menggunakan vektor pMAT dalam *E. coli*. Selanjutnya fragmen *pt2* diligasi ke vektor ekspresi pTWIN1 untuk *E. coli*. Hasil karakterisasi gen *pt2* dalam pTWIN1 menggunakan metoda sequencing DNA memperlihatkan bahwa gen *pt2* hasil rancangan sudah berhasil dikloning. Dengan demikian, gen *pt2* hasil kloning ini dapat digunakan sebagai bahan awal untuk ekspresi PT2 dalam inang *E. coli*.

**Kata Kunci:** pretrombin-2, trombin, lem fibrin, kodon preferensi, *Escherichia coli*

## 1. Pendahuluan

Metode untuk menutup luka pasca operasi menggunakan teknik jahitan, merupakan standar emas yang umum digunakan. Walaupun merupakan standar emas, teknik ini menimbulkan beberapa permasalahan, seperti waktu penyembuhan luka berlangsung lama, proses pembedahan yang lebih panjang, trauma tambahan (pemasangan dan pencabutan benang), meningkatnya inflamasi, serta kemungkinan timbulnya komplikasi yang berhubungan dengan jahitan berupa infeksi (Enus *et al.*, 2011).

Lem Fibrin (LF) pengganti teknik jahitan memiliki kemampuan untuk merekatkan dan menutup luka. LF sebagai bahan bioadesif, tersusun atas trombin, fibrinogen, kalsium dan faktor XIII. Bahan ini dirancang untuk menyerupai tahap akhir koagulasi dengan membentuk bekuan fibrin. LF digunakan sebagai bahan hemostatis yang menghentikan pendarahan dari celah insisi, matriks untuk penyembuhan luka dan perekat jaringan. (Spotnitz & Prabhu, 2005).

Meskipun luas penggunaannya, LF yang di dapat secara komersial relatif mahal, sehingga tidak ekonomis. LF komersial ini mengandung protein plasma yang dimurnikan dari sumber darah lain, yang beresiko terjadinya kontaminasi patogen secara bersamaan dengan perawatan. Untuk membuat LF diperlukan sumber bahan yang lebih berlimpah dan lebih aman. Saat ini, trombin pada LF komersial biasanya terbuat dari plasma beku segar sapi (Kaufman *et al.*, 2003). LF komersial sebagai pengganti jahitan memberikan banyak keuntungan, yaitu operasi lebih nyaman, lebih cepat dan dapat terhindar kerugian akibat jahitan (Koranyi *et al.*, 2004). Sampai saat ini LF komersial untuk operasi mata belum tersedia di Indonesia, sehingga harus diimpor dengan harga yang sangat mahal dan perlu penyimpanan secara khusus. Permasalahan lain yang muncul adalah belum adanya izin khusus dari *Food and Drug Administration* untuk pemakaian LF komersial pada operasi mata, terkait transmisi penyakit karena terbuat dari plasma donor (Enus *et al.*, 2009).



Penggunaan yang luas dari *E. coli* sebagai inang dalam produksi protein rekombinan disebabkan oleh karena sifatnya yang dapat tumbuh cepat dengan siklus hidup pendek, informasi dan karakter genom yang sudah lengkap sehingga mudah dimanipulasi, biaya produksi relatif murah, tingkat ekspresi protein target tinggi, cepat, dan teknologinya sudah mapan (Cabrita *et al.*, 2006). Namun, dibalik keuntungan yang disebutkan di atas, inang ini juga memiliki kelemahan, seperti fenomena bias kodon (Sorensen & Mortensen, 2005), dan potensi menghasilkan protein agregat kompleks tidak aktif yang lazim dikenal sebagai badan inklusi (Freydell *et al.*, 2007).

Strategi pertama yang perlu dilakukan untuk mengatasi kelemahan yang disebutkan di atas adalah dengan melakukan optimasi kodon gen target terhadap preferensi kodon inang (Gustafsson *et al.*, 2004). Strategi ini bertujuan untuk mengatasi rendahnya ekspresi protein dari gen target. Proses optimasi ini dilakukan dengan cara merubah kodon pengkode asam amino tertentu yang berasal dari sumber lain menjadi kodon dengan frekuensi tinggi di inang ekspresi. Tingkat ekspresi gen yang mengandung kodon hasil optimasi lebih tinggi daripada gen yang mengandung kodon tidak teroptimasi (Wang *et al.*, 2010). Hasil ekspresi gen meningkat setidaknya tiga kali lipat dengan optimasi kodon (Zhou *et al.*, 2004). Strategi kedua adalah memanfaatkan teknologi gen sintetik berdasarkan kemampuan mengubah bias kodon dari gen target menjadi cocok dengan kodon preferensi inang rekombinan (Graslund *et al.*, 2008). Keuntungan lain dari teknologi ini adalah efektifitas dan efisiensi yang tinggi dibandingkan dengan proses isolasi sendiri, serta terhindar dari transmisi penyakit dan reaksi alergi (Hughes *et al.*, 2011).

## 2. Metode

Penelitian ini menggunakan metode kualitatif, bersifat eksperimen laboratorium.

### 2.1 Galur, vektor, bahan kimia, media

*E. coli* TOP10F' adalah galur inang untuk kloning dan peremajaan plasmid. pMAT merupakan vektor kloning komersial. Galur ditumbuhkan dalam media Luria Bertani (LB) dengan komposisi (tripton 1%, yeast extract 0,5%, dan natrium klorida 1%) yang disuplemen dengan antibiotik tetrasiklin (100 µg/mL), dan ampisilin (100 µg/mL). Untuk media padat, komponen media LB ditambahkan dengan 2% agar. Semua enzim restriksi dan T4-DNA ligase diperoleh secara komersial dari Fermentas (Canada). Vektor ekspresi pTWIN1 diperoleh secara komersial dari

New England Biolabs, NEB. Gen *pt2* sintetik (CBD-*intein Ssp DnaB-pt2*) disintesis oleh GeneArt AG (Jerman).

### 2.2 Desain dan optimasi kodon gen *pt2*

Gen *pt2* sintetik dirancang berdasarkan urutan asam amino yang termuat dalam *GenBank* (Accession number: NM\_000506.3). Kodon preferensi *E. coli* yang digunakan termuat dalam *Codon Usage Database* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Optimasi kodon dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Optimizer* (<http://gnomes.urv.es/OPTIMIZER>) dan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA) (<http://gcu.schoedl.de/>).

### 2.3 Konstruksi fusi *pt2* dan vektor pTWIN1

Ekspresi PT2 dalam *E. coli* dan pemurniannya menggunakan sistem IMPACT-TWIN. Perancangan gen *pt2* sintetik ini dilengkapi dengan sisi restriksi *Bam*HI dan *Xho*I pada intein dengan perubahan pH/suhu. Untuk menggabungkan *pt2* sintetik dengan vektor ekspresi pTWIN1, maka pMAT-*pt2* terlebih dahulu dipotong menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Xho*I. Secara paralel, dilakukan juga pemotongan pTWIN1 dengan enzim restriksi yang sama. Selanjutnya fragmen *pt2* disambungkan ke pTWIN1 menggunakan T4 DNA ligase hingga menghasilkan plasmid pTWIN1-*pt2*.

### 2.4 Transformasi pTWIN1-*pt2* ke dalam sel kompeten *E. coli* TOP10F'

Transformasi pTWIN1-*pt2* ke sel kompeten *E. coli* TOP10F' dengan menggunakan metode kejutan panas (*heat shock*) (Sambrook *et al.*, 1989). Koloni transforman *E. coli* diseleksi melalui media agar yang mengandung antibiotik tetrasiklin dan ampisilin untuk transforman yang mengandung pTWIN1-*pt2*. Plasmid rekombinan, pTWIN1-*pt2* diisolasi dari koloni transforman *E. coli* TOP10F' menggunakan *QIAgen Spin Plasmid Miniprep Test Kit* sesuai dengan protokol dari Qiagen. Plasmid rekombinan hasil pemurnian, dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Selanjutnya plasmid tersebut digunakan untuk analisis restriksi dan ditentukan urutan nukleotidanya menggunakan metode sekuensing DNA. Hasil sekuensing disejajarkan menggunakan *Seqman* pada program *Bioedit*.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Optimasi Kodon Gen *pretrombin-2*

Perancangan gen *pt2* manusia sintetik telah dilakukan melalui perangkat lunak. *pt2* sintetik dirancang berdasarkan urutan asam amino yang termuat dalam *GenBank* (Accession number: NM\_000506.3) dan penggunaan kodon preferensi



*E. coli* yang termuat dalam *Codon Usage Database*. Berdasarkan data *GenBank*, bahwa gen *pt2* manusia terdiri dari 307 asam amino.

Hasil analisis urutan kodon *pt2* manusia pada *E. coli* menunjukkan, adanya kodon yang tidak sesuai kodon preferensi *E. coli*. Beberapa kodon *pt2* manusia pengkode asam amino yang memiliki kesesuaian kurang dari 50% dengan preferensi kodon *E. coli* antara lain: (1) S: agt, tgc, tcc, tca, (2) E: gag, (3) T: act, aca, (4) G: gga, ggg, (5) R: agg, aga, cga, cgg, (6) P: cct, ccc, (7) K: aag, (8) L: ctc, ctt, ttg, (9) V: gtc, (10) Q: caa. Sedangkan kodon *pt2* manusia yang memiliki kesesuaian relatif lebih dari 50% hingga mendekati 100% terdiri dari: (1) A: gcc, gca, gct, (2) Y: tac, (3) F: ttc, (4) N: aat, (5) D: gac, (6) C: tgt, (7) I: atc, ata, (8) H: cac, (9) V: gtt, (10) T: acg, dan (11) G: ggt. Kodon-kodon *pt2* manusia yang belum mencapai kesesuaian relatif 100% dengan preferensi kodon *E. coli* dioptimasi hingga mencapai 100%.

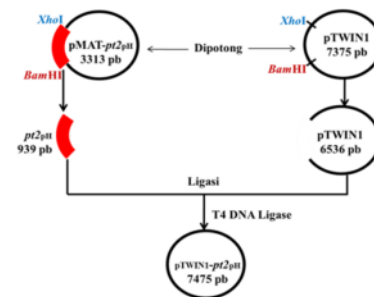
Penggunaan gen sintetis dapat mem-permudah dan mempercepat perolehan gen yang diinginkan karena tidak terbatas pada sumber biologis alami (Gustafsson *et al.*, 2004). Selain itu, data dari *GenBank* juga dapat diakses dengan mudah sebagai dasar penentuan urutan gen yang akan disintesis. Optimasi kodon dilakukan karena banyak gen target memiliki potensi kodon preferensi yang berbeda dengan genom inang. Walaupun, beberapa gen target memiliki kesesuaian yang cukup dengan genom inang, sehingga tidak perlu dilakukan optimasi kodon. Dalam penelitian ini, gen *pt2* manusia yang akan diekspresikan dalam inang *E. coli*, pilihan kodon *pt2* manusia memiliki kodon preferensi yang rendah dengan *E. coli* (Welch *et al.*, 2009). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa gen *pt2* manusia yang diekspresikan dalam *E. coli* akan menghasilkan badan inklusi (Soejima *et al.*, 2001). Oleh sebab itu, optimasi kodon organisme asal terhadap preferensi kodon inang diperlukan.

### 3.2 Konstruksi Plasmid Rekombinan

Struktur pTWIN1-*pt2* terdapat pada Gambar 1. pTWIN1 memiliki gen pengkode domain pengikat kitin yang dapat berikatan dengan kitin pada matriks pemurnian (Chong *et al.*, 1998). Dalam penelitian ini *pt2* manusia dikonstruksi dalam bentuk fusi pada bagian N-terminal (CBD-intein *Ssp DnaB-pt2*). Pada ujung keduanya disisipkan sisi pemotongan *Bam*HI (GGATCC) pada ujung 5' dan *Xho*I (CTCGAG) pada ujung 3' agar gen *pt2* dapat digabung dengan pTWIN1. Rancangan keseluruhan gen *pt2* sintetis untuk CBD-intein-*pt2*<sub>pH</sub> sebagai berikut.

```
ctcagaccgcaccgcaatcacagacttttaaccgcacctttggcagcggcgaaggattgcggctgcgccctgttt
gaaaaaaaagcctggaagataaaaccgaacgcgaactgtctggaagctatattgatggcgcattgtggaaggcagcgcgga
aattggcatgagcccgtggcaggtgatctgtttcgcaaaagcccgaggaactgtgtgcggcgcgacctgattgcatgctggg
tgcctgaccgcggcattgcctgtctgtatcccgctgggataaaaactttaccgaaacgatctgtgtgctgcaaacatagcc
gccccgtatgaacgcaacattgaaaaattagcagctgtggaaaaaattatattccgcgctataactggcgcgaaaaacctggat
cgcgatattgcctgatgaaactgaaaaaacgggtggcttttagcagctattatccggctgcctcggatcgcaaacccggcg
agcctgtcagcggcgtataaaggccgctgaccgctggggcaacctgaaagaacctgaccgcaacgtgggcaaaaggcca
ggcagcgtgtcaggtggtaacctgcgattgtggaacccgggtgtgcaaaagatgacccgcttgcattaccgatacatgtt
ttgcggggctataaacggatgaaaggcaaacgcggcagctgtgcgaaggcagatagcggcggccctgttgatgaaaaagccgtt
aaacaccgtgtgatcagatggcattgtgagctggggcgaaggctgcgatcgcgatggcaaatatggctttatacccatgtttcgc
ctgaaaaatggattcagaagtgattgatctgttggcgaataaggatc
```

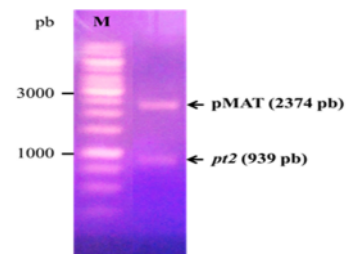
Penyisipan gen *pt2* manusia sintetis pada pTWIN1 dilakukan pada bagian *intein Ssp DnaB*. Untuk memungkinkan proses ekspresi protein, pada ujung 3' *pt2* ditambahkan *stop codon* (TAA) sebelum sisi restriksi *Bam*HI agar intein Mxe GyrA tidak ikut terekspresi karena akan menambah ukuran protein yang dihasilkan. *Start codon* tidak ditambahkan sebab sudah tercakup dalam *CBD-intein SspDnaB* dalam pTWIN1.



Gambar 1. Konstruksi pTWIN1-*pt2* dengan sisi pemotongannya

### 3.3 Kloning Gen *Pretrombin-2* Manusia

Untuk mendapatkan fragmen *pt2*, plasmid pMAT-*pt2* dipotong menggunakan dan *Bam*HI *Xho*I sesuai rancangan gen sintetis sebelumnya. Hasil pemotongan pMAT-*pt2* dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Hasil analisis menunjukkan bahwa fragmen *pt2* berhasil dilepaskan dari vektor pMAT. Pita pertama menunjukkan fragmen *pt2* dengan bobot molekul 939 pb, dan pita vektor pMAT dengan bobot molekul 2374 pb (Gambar 2).



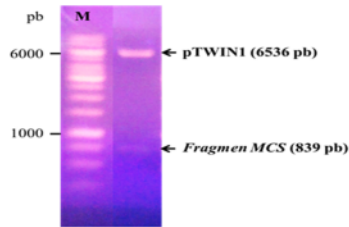
Gambar 2. Elektroforesis hasil restriksi plasmid pMAT-*pt2* (3313 pb) dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I. M: Marker 1 kb DNA, pMAT dengan berat molekul 2374 pb, *pt2* dengan berat molekul 939 pb.

Dengan menggunakan enzim restriksi yang sama, pTWIN1 dipotong dan kemudian diisolasi untuk proses ligasi *pt2*. Gambar 3 menunjukkan





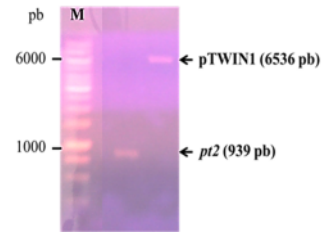
bahwa vektor ekspresi pTWIN1 berhasil dipotong. Terdapat dua pita dengan bobot molekul 6536 pb sebagai vektor pTWIN1, dan pita dengan bobot molekul 839 pb sebagai fragmen *Multi Cloning Site* (MCS) yang terlepas dari vektor pTWIN1 (Gambar 3).



**Gambar 3.** Elektroforesis hasil restriksi vektor pTWIN1 (7375 pb) dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I. M: Marker 1 kb DNA, pTWIN1 setelah dipotong dengan berat molekul 6536 pb, Fragmen MCS dengan berat molekul 839 pb.

Fragmen *pt2* diligasikan terhadap vektor ekspresi pTWIN1 menggunakan T4 DNA ligase (*Fermentas*), selanjutnya, hasil ligasi diisolasi dan dimurnikan dengan kit isolasi DNA (*Roche*). Hasil pemurnian dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Seperti yang terlihat pada Gambar 4, Hasil elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa fragmen *pt2* (939 pb) dan vektor pTWIN1

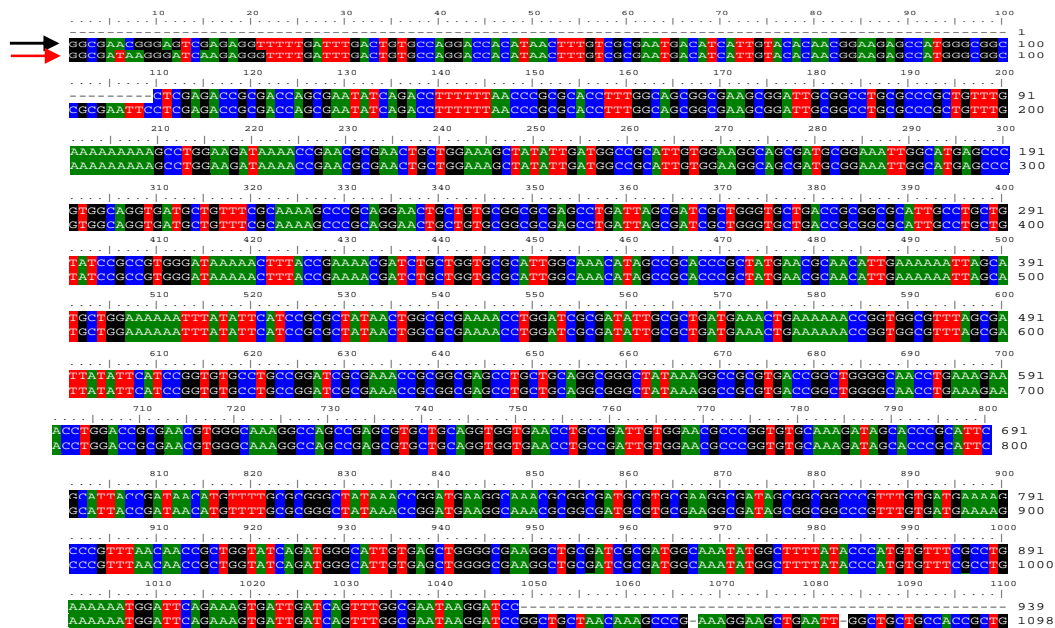
(6536 pb) berhasil diisolasi dan dimurnikan dari gel.



**Gambar 4.** Elektroforesis hasil pemurnian pTWIN1-*pt2* (7475 pb) dari gel yang direstriksi dengan dua enzim *Bam*HI dan *Xho*I. M: Marker 1 kb DNA, pTWIN1 dengan berat molekul 6536 pb, *pt2* dengan berat molekul 939 pb.

### 3.4 Karakterisasi hasil kloning dengan DNA sequencing

Untuk mengkonfirmasi keberhasilan hasil ligasi, dan memastikan kesesuaian urutan nukleotida gen *pt2* hasil ligasi dengan hasil rancangan optimasi, sebanyak 10  $\mu$ L plasmid pTWIN1-*pt2* dengan konsentrasi 100 ng/ $\mu$ L ditentukan urutan nukleotidanya dengan DNA sequencer oleh *MacroGene* (Korea). Perbandingan urutan nukleotida *pt2* hasil optimasi dengan *pt2* hasil kloning disajikan dalam Gambar 5.



**Gambar 5.** Hasil sekuensing. Perbandingan urutan DNA gen *pt2* hasil rancangan (→) dengan hasil kloning (→).

## 4. Kesimpulan

Optimasi kodon gen *pt2* sesuai kodon preferensi *E. coli* dapat meminimalkan efek bias kodon, yang selanjutnya berpengaruh pada ekspresi protein. Penggunaan gen sintetik lebih efisien dan efektif dibanding proses isolasi dari sumber alami.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DP2M dikti (atas nama: Iman Permama Maksum) atas bantuan dana penelitian melalui program Penelitian Unggulan Strategis Nasional (PUSNAS). Ucapan yang sama juga disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,



Kementerian Pendidikan Nasional, Republik Indonesia atas BPPS Program Doktorat.

### Daftar Pustaka

- Cabrita, L.D., Weiwen, D., and Stephen, P.B., (2006). A family of *Escherichia coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnol* 6:12.
- Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, E.J., Liao, W., Xu, M.Q., and Benner, J., (1998). Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Research* 26:5109-5115.
- Enus, S., Dalimoenthe, N.Z., dan Kartiwa, A., (2009). Teknik lem fibrin otologus pada cangkok konjungtiva bulbi mata kelinci. *MKB* 41:169-173.
- Enus, S., Natadisastra, G., Shahib, M.N., dan Sulaeman, R., (2011). Peran lem fibrin otologus pada penempelan tandur konjungtiva bulbi mata kelinci terhadap ekspresi gen fibronektin dan integrin. *MKB* 43:183-188.
- Freydell, E.J., Ottens, M., Eppink, M., van Dedam, G., and van der Wielen, L., (2007). Efficient solubilization of inclusion bodies. *J Biotechnol* 2:678-684.
- Gustafsson, C., Govindrajan, S., and Minshull, J., (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnol* 22:346-353.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., et al. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods* 5:135-146.
- Hughes, R.A., Miklos, A.E., and Ellington, A.D., (2011). Gene synthesis: methods and applications. *Methods in Enzimology* 498: 277-309.
- Kaufman, H.E., Insler, M.S., Ibrahim-Elzembly, H.A., and Kaufman, S.C., (2003). Human fibrin tissue adhesives for suturless lamellar keratoplasty and scleral patch adhesion. *Ophthalmology* 110:2168-2172.
- Koranji, G., Seregard, S., and Kopp, E.D., (2004). Cut and paste: a no suture, small incision approach to pterygium surgery. *Br J Ophthalmol* 88:911-914.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor *Laboratory Press*, New York.
- Soejima, K., Mimura, N., Yonemura, H., Nakatake, H., Imamura, T., and Nozaki, C., (2001). An efficient refolding method for the preparation of recombinant human prethrombin-2 and characterization of the recombinant-derived  $\alpha$ -thrombin. *J Biochem* 130:269-277.
- Sorensen, S.P., and Mortensen, K.K., (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115:113-128.
- Spotnitz, W.D., and Prabhu, R., (2005). Fibrin sealant tissue adhesive--review and update. *J Long Term Eff Med* 15: 245.
- Uy, H.S., Reyes, J M., Flores, J.D, and Siong, R.L.B, (2005). Comparison of fibrin glue and sutures for attaching conjunctival autografts after pterygium excision. *Ophthalmology* 112:667-671.
- Wang, X., Li, X., Zhang, Z., Shen, X., and Zhong, F., (2010). Codon optimization enhances secretory expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in *E. coli*. *Protein Expr. Purif* 72:101-106.
- Zhou, Z., Schnake, P., Xiao, L., and Lal, A.A., (2004). Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization. *Protein Expr. Purif* 34:87-94.



## Sub-Kloning Gen $\alpha$ -amilase *Saccharomyces fibuligera* (*Sfamy*) Dalam Inang *Escherichia coli*

Shabarni Gaffar, Siti Rohanah, Toto Subroto dan Soetijoso Soemitro

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Unpad  
Jl. Raya Bandung-Sumedang Km 21, Jatinangor, Sumedang  
shabarnigf@gmail.com

### Abstrak

$\alpha$ -Amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukan-4-glukanohidrolase [EC. 3.2.1.1]) menghidrolisis ikatan glikosida pada pati untuk menghasilkan dekstrin dan oligosakarida yang lebih kecil. Luasnya aplikasi  $\alpha$ -amilase dibidang industri menyebabkan enzim ini harus diproduksi secara rekombinan. *Escherichia coli* merupakan inang yang sudah umum digunakan untuk produksi protein rekombinan karena memiliki beberapa kelebihan seperti tingkat produksinya tinggi, dan media pertumbuhannya murah. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sub-kloning gen pengode  $\alpha$ -amilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64 (*Sfamy*) menggunakan vektor kloning pJET1.2. *Sfamy* rekombinan selanjutnya akan digunakan untuk mengekspresikan  $\alpha$ -amilase dalam *E. coli*. *Sfamy* diamplifikasi menggunakan metoda PCR dengan penambahan sisi enzim restriksi *Sap1* pada ujung 5' dan *EcoRI* pada ujung 3'. Selanjutnya, fragmen *Sfamy* diligasi ke sisi restriksi yang sama pada vektor pJET1.2 menghasilkan plasmid rekombinan pJET1.2-*Sfamy*, dan di sub-kloning ke *E. coli* galur Top10F'. Plasmid rekombinan dikarakterisasi dengan analisis restriksi dan penentuan urutan DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Sfamy* dengan ukuran 1422 pb telah berhasil diamplifikasi dengan metoda PCR dan telah berhasil diligasikan ke vektor pJET1.2 dan sub-kloning dalam *E. coli* TOP10F'. Hasil analisis restriksi dan penentuan urutan DNA memperlihatkan bahwa urutan *Sfamy* rekombinan memiliki homologi 100% dengan *Sfamy* S. *fibuligera* R64 dengan nomor akses HQ172905 di *Genebank*. Gen *Sfamy* rekombinan yang dihasilkan dari penelitian ini dapat digunakan untuk ekspresi *Sfamy* di *E. coli*.

Kata Kunci: *Sfamy*, sub-kloning, vektor pJET1.2.

### 1. Pendahuluan

$\alpha$ -Amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukan glukanohidrolase [EC 3.2.1.1]) adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis pati atau oligosakarida lain yang memiliki ikatan 1,4- $\alpha$ -glikosida yang menghasilkan produk berupa dekstrin, maltosa atau glukosa (Hashida & Bisgaard-Frantzen, 2000; Itoh *et al.*, 1987).  $\alpha$ -Amilase merupakan satu dari tiga jenis enzim amilolitik yang paling dikenal bersama  $\beta$ -amilase dan glucoamilase, yang berperan sangat penting dalam dunia bioteknologi (Hostinova, 2002; Van der Maarel *et al.*, 2002). Enzim ini berpotensi untuk diaplikasikan pada bidang klinis, analitis dan medis (Pandey *et al.*, 2000). Selain itu, enzim ini juga sudah diaplikasikan pada industri seperti industri deterjen, pengolahan pati, bahan bakar, makanan, tekstil, kertas dan alkohol (Kirk *et al.*, 2002).

Menurut Cowan (1996), sebagian besar (sekitar 45%) enzim yang telah digunakan diindustri merupakan hasil rekayasa, baik rekayasa pada

tingkat genetik maupun protein. Enzim rekombinan dihasilkan melalui proses kloning, yaitu dengan memindahkan gen pengode enzim tertentu ke suatu inang (*host*), dengan harapan diperolehnya peningkatan produksi. Karena jumlah enzim yang diekspresikan oleh mikroba asalnya biasanya lebih rendah dibandingkan dengan enzim rekombinan (Gogoi *et al.*, 1987).

*E. coli* sudah sering digunakan untuk produksi protein rekombinan, karena tingkat produksinya yang tinggi, media pertumbuhannya murah sehingga memudahkan dilakukan peningkatan skala produksi untuk industri. Sistem ekspresi *E. coli* cocok digunakan untuk ekspresi protein yang tidak memiliki modifikasi pascatranslasi ataupun protein yang diinginkan tidak mengalami modifikasi pascatranslasi (Fukusumi *et al.*, 1988). Beberapa protein telah berhasil diekspresikan menggunakan sistem ekspresi *E. coli* diantaranya,  $\alpha$ -amilase *Pyrococcus fusarius* (Laderman *et al.*, 1993),  $\alpha$ -



amilase *Streptococcus bovis* 148 (Satoh *et al.*, 1993) dan proteinase serin dari *Bacillus spp* (Maciver *et al.*, 1994).

$\alpha$ -Amilase *S. fibuligera* R64 dapat mendegradasi pati mentah, sehingga berpotensi untuk digunakan dalam industri (Hasan *et al.*, 2008). Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah ekspresi  $\alpha$ -amilase *S. fibuligera* R64 (Sfamy) menggunakan sistem ekspresi *E. coli*. Sistem ekspresi *E. coli* dipilih dengan harapan diperolehnya tingkat ekspresi yang tinggi dan tidak terjadi glikosilasi sehingga dapat digunakan untuk penentuan struktur Sfamy. Glikosilasi merupakan salah satu modifikasi pasca translasi, yaitu penambahan beberapa residu oligosakarida pada protein. Tambahan residu oligosakarida ini dapat mengganggu penentuan struktur protein.

Salah satu tahap yang dilakukan pada ekspresi protein adalah konstruksi vektor ekspresi yang membawa gen yang akan diekspresikan. Konstruksi vektor ekspresi biasanya meliputi tahapan amplifikasi gen yang akan dikloning dengan penambahan sisi restriksi yang cocok dengan yang terdapat pada vektor ekspresi, subkloning untuk memperbanyak gen yang akan diekspresikan serta penggabungan gen yang akan diekspresikan ke vektor ekspresi.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bermaksud untuk mengamplifikasi dan mensubkloning gen *Sfamy S. fibuligera* R64 yang selanjutnya akan digunakan untuk ekspresi  $\alpha$ -amilase *S. fibuligera* R64 dalam inang *E. coli*.

## 2. Bahan dan Metoda

### 2.1 Bahan

Galur yang digunakan pada penelitian ini adalah *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) yang digunakan sebagai inang untuk kloning. Templat PCR menggunakan pGemT-*Sfamy* (Gaffar, 2011). Vektor yang digunakan adalah pJET1.2 (Fermentas). Enzim *Eco*R1 dan *Sap*1, *Taq* DNA polymerase, dan T4 DNA ligase dari Fermentas. Primer disintesis oleh First Base Singapore berdasarkan urutan *Sfamy* (Gaffar, 2011) dengan penambahan sisi restriksi pada ujung 5' dan 3' nya. Primer 5'*Sfamy-Sap*I (5'-GAGGAAACGGAAGA-GCTGTGACTCTATTCAAAGAG-3') dan primer 3'*Sfamy-Eco*RI (5'-GAGGAGAATTCTCATG-AACAAATGTCAGAAG-3') dengan urutan yang digaris bawah merupakan urutan sisi pengenalan enzim restriksi. Kit isolasi DNA GeneJET Plasmid Miniprep Kit dari Fermentas. Marker DNA 1 kb dari Fermentas. Media pertumbuhan, *E. coli* TOP10F' dari Pronadisa dan Oxoid. Reagen reagen lain yang umum digunakan pada laboratorium biologi molekuler dari Sigma Aldrich dan Merck.

### 2.2 Metode

#### Amplifikasi gen *Sfamy* dengan PCR

Amplifikasi gen *Sfamy* dilakukan dengan metoda PCR dalam 50  $\mu$ L campuran reaksi yang mengandung 20  $\mu$ M masing-masing primer maju 5'*Sfamy-Sap*I dan primer balik 3'*Sfamy-Eco*RI, 1,25 unit enzim *Taq* DNA polimerase, 5  $\mu$ L buffer PCR 10x (10 mM Tris HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 0,01 % gelatin), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP dan 50 ng DNA plasmid pGem-*Sfamy*. Proses PCR dilakukan dalam mesin Mastercycler® 5330 (Eppendorf) sebanyak 30 siklus, dengan masing-masing siklus terdiri dari tahap-tahap denaturasi templat pada suhu 95°C selama 1 menit, tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 50°C selama 1 menit, dan tahap pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 1 menit. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agaros 1% (b/v).

#### Ligasi fragmen *Sfamy* dengan vektor pJET1.2.

Reaksi ligasi dilakukan dengan perbandingan molar antara vektor pJET 1.2 dan fragmen *Sfamy* 1:1. Campuran reaksi ligasi terdiri dari 10  $\mu$ L buffer Ligasi 2x, 1  $\mu$ L *Sfamy* hasil PCR, 1  $\mu$ L (~0,05 pmol) vektor pJET1.2, 1 uL *blunting enzyme*, air bebas nuklease hingga 19  $\mu$ L; dan 1  $\mu$ L enzim T4 DNA ligase. Volume total reaksi ligasi adalah 20  $\mu$ L. Campuran kemudian divortex dan dispin selama 3-5 detik. Campuran diinkubasi pada suhu 22°C selama 5 menit.

#### Transformasi *E. coli* TOP10F' menggunakan plasmid pJET1.2-*Sfamy*.

Pembuatan sel kompeten *E. coli* TOP10F'. Koloni tunggal *E. coli* TOP10F' ditumbuhkan dalam 6 mL media LB cair yang telah mengandung antibiotik tetrasiklin 6  $\mu$ L (15  $\mu$ g/mL) pada suhu 37°C selama 16-18 jam dengan pengocokan 150 rpm. Sejumlah sel (sekitar 250  $\mu$ L) diinokulasikan ke dalam 20 mL media cair LB baru, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm hingga OD<sub>600</sub> mencapai 0,2-0,4. Sel kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi yang jumlahnya disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan ditransformasi. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm, 4°C, selama 5 menit. Pelet sel yang didapatkan kemudian diresuspensi dengan 1 mL larutan kalsium klorida 0,1 M dingin. Setelah diinkubasi di dalam es selama 10 menit, campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C. Pelet sel yang diperoleh diresuspensi kembali dalam 300  $\mu$ L kalsium klorida dingin, kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 2-24 jam sebelum digunakan untuk ditransformasi.

Transformasi *E. coli* TOP10F' menggunakan plasmid pJET1.2-*Sfamy*. Sejumlah 5  $\mu$ L DNA hasil ligasi pJET1.2-*Sfamy* ditambahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi yang berisi 50  $\mu$ L sel kompeten. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C, kemudian dilakukan *heat shock* pada suhu 42°C selama 90 detik. Kemudian segera didinginkan di dalam es selama 10 menit. Ke dalam campuran ini kemudian ditambahkan 950  $\mu$ L media LB cair dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam dengan laju pengocokan 150 rpm. Kemudian disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 detik. Sebanyak 900  $\mu$ L supernatan dibuang, pelet sel diresuspensi dengan sisa supernatan dan kemudian 50  $\mu$ L sel ditumbuhkan pada media LB padat yang telah mengandung tetrasiklin 15  $\mu$ g/mL dan ampisilin 100  $\mu$ g/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

#### Karakterisasi plasmid rekombinan melalui analisis restriksi

Koloni transforman *E. coli* yang tumbuh berwarna putih dikarakterisasi melalui isolasi plasmid rekombinan menggunakan kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) mengikuti prosedur, hasil isolasi plasmid dikarakterisasi dengan elektroforesis agarose 1%. Sebanyak 10 uL plasmid pJET1.2-*Sfamy* hasil isolasi ditambahkan 2 uL buffer *Eco*RI 10x, 1 uL enzim *Eco*RI (10 U/mL), dan air bebas nuklease hingga volume total reaksi 20 uL. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah itu dikarakterisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v).

#### Penentuan urutan nukleotida pJET1.2-*Sfamy*

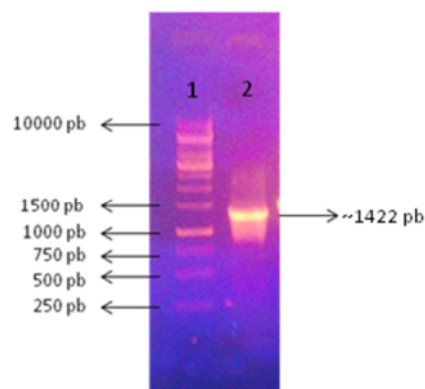
Urutan nukleotida gen *Sfamy* hasil kloning dalam *E. coli* TOP10F' ditentukan dengan metode Dideoksi Sanger (*Dye Terminator*) di First Base, Singapore. Penentuan urutan nukleotida dilakukan menggunakan pasangan primer pJET-for dan pJET-ref (primer universal untuk vektor pJET1.2). Hasil sekuensing di jajarkan menggunakan program Seqman pada program DNASTar.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1 Amplifikasi fragmen *Sfamy* dengan PCR

Pita yang terlihat pada lajur 2 gambar 3.1 menunjukkan bahwa gen *Sfamy* telah berhasil diamplifikasi dengan metoda PCR dengan ukuran 1422 pb. Fragmen DNA hasil PCR ini mengandung tambahan urutan pengenalan enzim *Sap*I pada ujung 5' dan *Eco*RI pada ujung 3'. Adanya sisi pengenalan enzim ini berguna untuk menyisipkan gen *Sfamy* ke dalam vektor ekspresi pTYB21 yang akan digunakan untuk ekspresi  $\alpha$ -amilase di *E. coli*. Sisi restriksi *Eco*RI dan *Sap*I dipilih karena tidak

memotong *Sfamy* sehingga akan memudahkan karakterisasi plasmid rekombinan.



Gambar 3.1 Hasil amplifikasi *Sfamy* dengan metoda PCR. (lajur 1) marker 1 kb, (lajur 2) amplicon *Sfamy*.

#### 3.2 Subkloning *Sfamy* dalam *E. coli* TOP10F'

Ligasi fragmen *Sfamy* dengan pJET1.2 dilakukan menggunakan enzim T4 DNA ligase (Fermentas). Perbandingan mol antara vektor dan fragmen *Sfamy* pada penelitian ini adalah 1:1 (pJET1.2:fragmen *Sfamy*). Perbandingan mol ini digunakan untuk hasil PCR yang tidak dimurnikan mengikuti *sticky-end cloning protocol* (Fermentas). Amplicon *Sfamy* memiliki basa adenin pada ujung 3', sehingga dilakukan prosedur penghilangan basa adenin pada ujung 3' melalui inkubasi pada T=70°C selama 5 menit sehingga fragmen *Sfamy* menjadi *blunt-end*.

Plasmid rekombinan hasil ligasi (pJET1.2-*Sfamy*) digunakan untuk mentransformasi *E. coli* TOP10F'. Transforman *E. coli* [pJET1.2-*Sfamy*] ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung antibiotik tetrasiklin dan ampisilin untuk menyeleksi transforman. Setelah diinkubasi selama semalam, diperoleh sejumlah koloni transforman *E. coli* [pJET1.2-*Sfamy*]. Koloni transforman yang tumbuh semuanya merupakan koloni yang berwarna putih (data tidak diperlihatkan). Vektor pJET1.2 memiliki gen *Eco47IR* yang mengekspresikan enzim endonuklease *Eco47I* yang bersifat mematikan untuk seluruh strain *E. coli* yang tidak mengandung plasmid rekombinan. Adanya DNA sisipan menyebabkan gen *eco47IR* terpotong sehingga enzim *Eco47I* rusak, sehingga semua koloni yang tumbuh merupakan koloni rekombinan.

Penambahan antibiotik bertujuan untuk seleksi koloni transforman. Transforman *E. coli* TOP10F' yang telah mengandung plasmid rekombinan pJET1.2-*Sfamy* akan resisten terhadap antibiotik ampisilin karena vektor pJET1.2 membawa gen pengode resistensi ampisilin. Antibiotik tetrasiklin ditambahkan ke dalam media karena *E. coli* TOP10F' resisten terhadap tetrasiklin. Dengan

demikian, hanya *E. coli* yang mengandung plasmid rekombinan yang akan tumbuh pada media pertumbuhan LB padat.

Setiap koloni tunggal transforman *E. coli* TOP10F' [pJET1.2-*Sfamy*] diremajakan dengan cara direplika dan ditumbuhkan kembali dalam medium LB padat baru yang mengandung antibiotik tetrasiklin dan ampisilin. Hasil replika diperoleh sebanyak 104 koloni (foto tidak diperlihatkan).

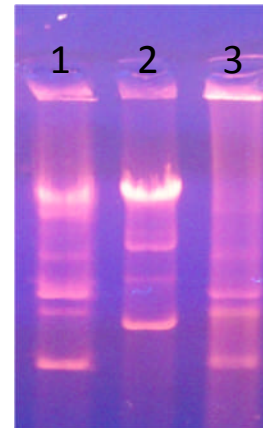
### 3.3 Karakterisasi transforman *E. coli* TOP10F' [pJET1.2-*Sfamy*]

Karakterisasi transforman dilakukan untuk memastikan *E. coli* TOP10F' sudah mengandung plasmid rekombinan yang diinginkan. Karakterisasi yang dilakukan meliputi isolasi plasmid pJET1.2-*Sfamy* dengan metode miniprep (Sambrook, *et al.*, 1989), analisis restriksi pJET1.2-*Sfamy*, dan penentuan urutan nukleotida *Sfamy*.

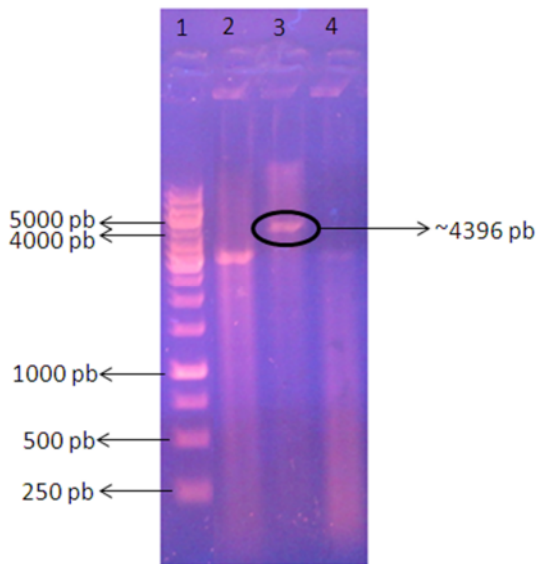
#### Isolasi plasmid pJET1.2-*Sfamy* dengan metode miniprep.

Hasil isolasi plasmid rekombinan pJET1.2-*Sfamy* dengan metode miniprep (Sambrook *et al.*, 1989) ditunjukkan pada Gambar 3.2. Plasmid pJET1.2-*Sfamy* memiliki ukuran ~4396 pb. Hasil isolasi plasmid kemudian dikarakterisasi dengan

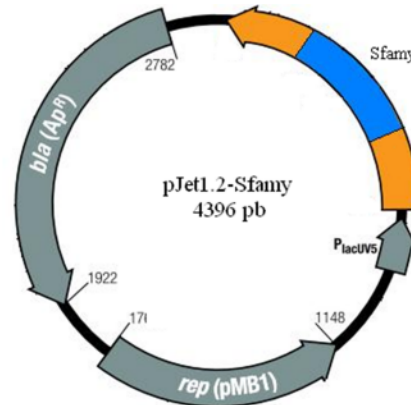
elektroforesis gel agarosa. Pada Gambar 3.2 dapat dilihat pita plasmid pJET1.2-*Sfamy* lebih dari satu pita dalam satu lajur. Adanya beberapa pita pada satu lajur menunjukkan bahwa hasil isolasi mengandung DNA plasmid yang sama tetapi memiliki konformasi superkoil yang berbeda-beda seperti *supercoiled monomer*, *supercoiled dimer*, dan *nicked circular* (Jazwinski & Edelman, 1982).



Gambar 3.2 Hasil isolasi plasmid pJET1.2-*Sfamy*. (lajur 1) koloni 30A, (lajur 2) koloni 43A, (lajur 3) koloni 47A.



A



B

Gambar 3.3 Hasil restriksi plasmid pJET1.2-*Sfamy* dengan enzim *EcoRI*. (lajur 1) marker 1 kb, (lajur 2) pJET1.2-*Sfamy* koloni 30A/*EcoRI*, (lajur 3) pJET1.2-*Sfamy* koloni 43A/*EcoRI*, (lajur 4) pJET1.2-*Sfamy* koloni 47A/*EcoRI*.

#### Analisis restriksi plasmid pJET1.2-*Sfamy*

Analisis restriksi dilakukan untuk memastikan bahwa plasmid pJET1.2-*Sfamy* yang diisolasi dari

transforman *E. coli* TOP10F' [pJET1.2-*Sfamy*] merupakan plasmid rekombinan yang diinginkan. Analisis restriksi dilakukan dengan menggunakan



enzim restriksi EcoRI yang merupakan salah satu sisi pengenalan enzim restriksi yang ditambahkan pada ujung 3'Sfamy. Enzim restriksi EcoRI merupakan enzim restriksi endonuklease yang diisolasi dari *E. coli*, memiliki sisi pengenalan pada urutan polindrom 5' G↓AATTC 3' dan menghasilkan ujung lengket (sticky-end) dan mempunyai kondisi reaksi optimum pada suhu 37°C dan mengalami inaktivasi pada suhu 65°C.

Hasil restriksi plasmid yang ditunjukkan pada Gambar 3.3A menunjukkan bahwa koloni 43 (lajur 3) positif mengandung plasmid pJET1.2-Sfamy, ditunjukkan dengan adanya pita pada daerah ~4396 pb yang sesuai dengan ukuran plasmid pJET1.2 (2974 pb) ditambah Sfamy (1422 pb). Koloni

lainnya (lajur 2 dan 4) diduga mengandung vektor pJET1.2 yang mengalami religasi. Peta plasmid rekombinan pJET1.2-Sfamy diperlihatkan pada gambar 3.3B.

Karakterisasi (isolasi plasmid dan analisis restriksi) dilanjutkan untuk koloni 9B, 25B, 32B, 43B, dan 49B. Hasil karakterisasi keempat koloni tersebut menunjukkan koloni 9B, 25B, 32B, 43B, dan 49B merupakan koloni positif mengandung plasmid pJET1.2-Sfamy, ditunjukkan dengan adanya pita hasil restriksi pada daerah ~4396 pb (gambar tidak ditunjukkan). Berdasarkan hasil analisis ini, telah diperoleh 6 koloni *E. coli* yang positif mengandung plasmid rekombinan pJET1.2-Sfamy.

```

>lcl|32513
Length=1485

Score = 1932 bits (1046), Expect = 0.0

Query 1      GTGACTCTATTCAAAGAGAACTAATGCTGATAAATGGAGATCACAGTCTATTTATCAA 60
Sbjct 61      GTGACTCTATTCAAAGAGAACTAATGCTGATAAATGGAGATCACAGTCTATTTATCAA 120

Query 61      ATTGTCACCTGACAGATTTGCTAGAACCGATGGTGATACAAGTGTCTTCTGTAACACAGAA 120
Sbjct 121     ATTGTCACCTGACAGATTTGCTAGAACCGATGGTGATACAAGTGTCTTCTGTAACACAGAA 180

Query 121     GATAGACTTTACTGTGGTGGTTCTTTTCCAAGGCATCATAAAGAAGTTGGATTACATCAA 180
Sbjct 121     GATAGACTTTACTGTGGTGGTTCTTTTCCAAGGCATCATAAAGAAGTTGGATTACATCAA 240

Query 481     AACTATGATGACCAAGCTCAGGTTCAAATTTGCTGGGAAGGTGACTCTTCAGTTGCATTA 540
Sbjct 541     AACTATGATGACCAAGCTCAGGTTCAAATTTGCTGGGAAGGTGACTCTTCAGTTGCATTA 600

Query 541     CCAGATTTGAGAACGGGAAGATAGCGACGTGGCCCTCAGTTTTCAATTCCTGGGTTAAAGAT 600
Sbjct 601     CCAGATTTGAGAACGGGAAGATAGCGACGTGGCCCTCAGTTTTCAATTCCTGGGTTAAAGAT 660

Query 601     TTTGTTGGCAATTACTCAATTTGATGGTTTAAAGAAATGATAGTCTAAACATGTGAACCAA 660
Sbjct 661     TTTGTTGGCAATTACTCAATTTGATGGTTTAAAGAAATGATAGTCTAAACATGTGAACCAA 720

Query 661     GGCTTTTCCCGGATTTTGTAGTGCATCTGGAGTTTACTCAGTAGGCGAAGTTTCCAA 720
Sbjct 721     GGCTTTTCCCGGATTTTGTAGTGCATCTGGAGTTTACTCAGTAGGCGAAGTTTCCAA 780

Query 721     GGAGACCCAGCTTATACATGCCCATACAAAATTACATTCAGGGTTAGTAATTATCCA 780
Sbjct 781     GGAGACCCAGCTTATACATGCCCATACAAAATTACATTCAGGGTTAGTAATTATCCA 840

Query 781     TTGTAACCCAACCCAGAGATTTTAAACTACTGATTCAACTCCAGTGAAGTTGACT 840
Sbjct 841     TTGTAACCCAACCCAGAGATTTTAAACTACTGATTCAACTCCAGTGAAGTTGACT 900

Query 841     CAAATGATTTCAAGCGTTGCTTCCAGTTGTTCCGGATCCAACTTTGTTGACAAACTTTGTA 900
Sbjct 901     CAAATGATTTCAAGCGTTGCTTCCAGTTGTTCCGGATCCAACTTTGTTGACAAACTTTGTA 960

Query 901     GAAAATCAGATAAATGAAAGGTTCCGCTTCAATGACCGACCAAGTTTGTATTCTAAT 960
Sbjct 961     GAAAATCAGATAAATGAAAGGTTCCGCTTCAATGACCGACCAAGTTTGTATTCTAAT 1020

Query 961     GCTATTGCAITTTGCTCTTTGGGTGATGGTATTCTCTGTCATTTACTATGGACAAGAACAA 1020
Sbjct 1021    GCTATTGCAITTTGCTCTTTGGGTGATGGTATTCTCTGTCATTTACTATGGACAAGAACAA 1080

Query 1021   GGCTTGAGCGGAAAAAGTGACCCAAA 1046
Sbjct 1081   GGCTTGAGCGGAAAAAGTGACCCAAA 1106
    
```

Gambar 3.4. Hasil homologi urutan nukleotida *Sfamy* dengan program BLAST.

**Penentuan urutan nukleotida gen *Sfamy*.**

Penentuan urutan nukleotida *Sfamy* dilakukan untuk memastikan bahwa urutan nukleotida *Sfamy* yang dikloning dalam vektor pJET1.2 sesuai dengan urutan gen *Sfamy* NCBI (nomor akses: HQ172905.1). Penentuan urutan nukleotida dilakukan dengan menggunakan metode Dideoksi Sanger dengan menggunakan primer pJET-for.

Urutan nukleotida yang dihasilkan kemudian dibandingkan dengan urutan nukleotida gen *Sfamy* (Genebank: HQ172905.1) menggunakan perangkat analisis *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui tingkat homologi antara kedua urutan nukleotida tersebut. Hasil analisis BLAST diperoleh informasi urutan gen *Sfamy* hasil subkloning dalam *E. coli* memiliki



homologi 100% dengan urutan gen *Sfamy* NCBI nomor akses: HQ172905.1 (Gambar 3.4).

Pada hasil analisis BLAST (Gambar 3.4), menunjukkan bahwa urutan basa *Sfamy* hasil sekuensing dimulai dari urutan basa nomor 61 pada *Sfamy* NCBI HQ172905.1. Urutan basa nomor 1-60 pada *Sfamy* NCBI merupakan urutan pengode peptida sinyal, sedangkan *Sfamy* hasil sekuensing tidak memiliki urutan pengode paptida sinyal. Gen *Sfamy* yang disubkloning di dalam *E. coli* dirancang tidak memiliki pengode peptida sinyal karena akan digunakan untuk ekspresi dalam sistem ekspresi *E. coli*. Ekspresi protein asing di *E. coli* akan menghasilkan protein intraselular karena *E. coli* merupakan prokariot yang tidak memiliki organel perangkat untuk sekresi protein, oleh sebab itu urutan pengode peptida sinyal tidak diperlukan. Selanjutnya, gen *Sfamy* hasil subkloning ini akan disisipkan ke vektor ekspresi pTYB21 untuk *E. coli*. Menggunakan vektor ekspresi ini,  $\alpha$ -amilase akan diekspresikan dalam bentuk protein fusi dengan intein, suatu protein yang dapat melakukan *self-splicing*. *Multi cloning site* (MCS) pada vektor ini berada setelah intein, sehingga tidak diperlukan *start codon* (AUG) dari *Sfamy* untuk memulai sintesis protein.

#### 4. Kesimpulan

Gen pengode  $\alpha$ -amilase *S. fibuligera* telah berhasil di subkloning menggunakan vektor pJET1.2 untuk *E. coli*. Hasil penentuan urutan nukleotida menunjukkan urutan *Sfamy* hasil subkloning homologi dengan urutan *Sfamy* yang terdapat di GenBank.

#### Daftar Pustaka.

- Cowan, D. 1996. Industrial enzyme technology. *Trends Biotechnol.* **14**, 177-178.
- Fermentas, 2010. *Molecular Biology Catalog and Product Application Guide*. Canada.
- Fukusumi, S., S. Horinouchi, T. Ohshima & T. Beppu. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of two additional amylase genes of a strictly anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*, and their nucleotide sequences with extremely low guanine-plus-cytosine contents. *Eur. J. Biochem.* **176**, 243-253.
- Gogoi, B.K., R.L. Bezbaruah, K.R. Pillai & J.R. Baruah. 1987. Production, purification and characterization of an  $\alpha$ -amilase produced by *Saccharomycopsis fibuligera*. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 373-379.
- Hasan, K., Ismaya, W.T., Kardi, I., Andiyana, Y., Kusumawidjaya, S., Ishmayana, S., Subroto, T., and Soemitro, S. 2008. Proteolysis of  $\alpha$ -amilase from *Saccharomycopsis fibuligera*: characterization of digestion products. *Biologia.* **63**: 1044-1050.
- Hashida, M & H. Bisgaard-Frantzen. 2000. Protein engineering of new industrial amylase. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **12**, 389-401.
- Hostinova, E. 2002. Amylolytic enzymes produced by the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biologia, Bratislava.* **57**, 247-251.
- IMPACT™. 2004. CN Instruction Manual, New England Biolabs.
- Itoh, T., I, Yamashita & S. Fukui. 1987. Nucleotide sequence of the  $\alpha$ -amilase gene (*ALP1*) in the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *FEBS Lett.* **219**, 339-342.
- Jazwinski, S.M. & G.M. Edelman. 1982. Protein complexes from active replicative fractions associate in vitro with the replication origins of yeast 2- $\mu$ m DNA plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 3428-3432.
- Kirk, O., T.V. Borchert & C.C. Fuglsang. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 345-351.
- Laderman, K.A., K. Asada, T. Uemori, H. Mukai, Y. Taguchi, I. Kato & C.B. Anfinsen. 1993.  $\alpha$ -Amylase from the Hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* **268**, 32.
- Maciver, B., R.H. McHale, D.J. Saul & P.L. Bergquist. 1994. Cloning and sequencing of a serine proteinase gene from a Thermophilic Bacillus Species and its expression in *Escherichia coli*. *Applied and Enviromental Microbiology.* **60**, 3981-3988.
- Pandey, A., P. Nigam, C.R. Soccol, V.T. Soccol, D. Singh & R. Mohan. 2000. Review: advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 135-152.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.
- Shabarni Gaffar. 2011. Pengaruh kombinasi manipulasi genetik terhadap tingkat sekresi  $\alpha$ -amilase *Saccharomycopsis fibuligera* r64 dalam *Pichia pastoris*. Disertasi. Universitas Padjadjaran.
- Satoh, E., Y. Niimura, T. Uchimura, M. Kozaki & K. Komagata. 1993. Molecular cloning and expression of two  $\alpha$ -amilase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Applied and Enviromental Microbiology.* **59**, 3669-3673.
- Van der Maarel, M.J.E.C., B. Van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis & L. Dijkhuizen.





2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J.*

*Biotechnol.* **94**, 137-155.