

**ISOLASI DAN KLONING GEN  $\alpha$ -AMILASE DARI BAKTERI TERMOFILIK  
PADA *Escherichia coli* DH5 $\alpha$**

***ISOLATION AND CLONING OF  $\alpha$ -AMYLASE GENE FROM THERMOPHILIC  
BACTERIA IN *Escherichia coli* DH5 $\alpha$***

**Patricia Gita Naully**

Program Studi Analisis Kesehatan STIKES Jenderal Achmad Yani Cimahi

[patriciagitanaully@gmail.com](mailto:patriciagitanaully@gmail.com)

**ABSTRAK**

$\alpha$ -amilase adalah enzim yang dapat memecah pati menjadi glukosa, maltosa, atau dekstrin. Enzim ini memiliki peran penting dan dibutuhkan dalam jumlah banyak di berbagai sektor industri. Enzim  $\alpha$ -amilase biasa digunakan dalam reaksi bersuhu tinggi.  $\alpha$ -amilase yang berasal dari hewan, tumbuhan, dan bakteri mesofilik tidak akan stabil pada kondisi reaksi tersebut. Oleh karena itu, dibutuhkan enzim  $\alpha$ -amilase yang bersifat termostabil dari bakteri termofilik. Permasalahannya bakteri termofilik masih sulit untuk dikulturkan pada kondisi laboratorium. Maka dari itu, gen pengode enzim  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik perlu diisolasi dan dikloning pada bakteri yang mudah dikulturkan di laboratorium seperti *Escherichia coli*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi gen  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik dan mengkloning pada *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  dengan menggunakan vektor pJET1.2/blunt. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Kawah Kamojang, Garut, Jawa Barat. Gen  $\alpha$ -amilase dari sampel diisolasi dan diamplifikasi dengan metode PCR yang menggunakan primer spesifik. Keberhasilan proses isolasi dan amplifikasi ditentukan oleh metode elektroforesis. Elektroferogram menunjukkan bahwa gen  $\alpha$ -amilase yang berukuran 1891 pb dari bakteri termofilik berhasil diisolasi. Gen  $\alpha$ -amilase disisipkan pada vektor pJET1.2/blunt untuk menghasilkan plasmid pJET-amilase. Plasmid tersebut dimasukkan ke dalam sel *E. coli* DH5 $\alpha$  dengan metode kejut panas. Keberhasilan proses kloning diuji dengan pengulturan sel pada medium selektif dan analisis restriksi menggunakan enzim restriksi *Bgl*III. Gen  $\alpha$ -amilase tersebut berhasil dikloning pada *E. coli* DH5 $\alpha$  menggunakan vektor pJET1.2/blunt dengan efisiensi transformasi sebesar  $2.44 \times 10^4$  cfu/ $\mu$ g.

**Kata Kunci:** isolasi, kloning,  $\alpha$ -amilase, termofilik

***ABSTRACT***

*$\alpha$ -amylase is an enzyme that can break down starch into glucose, maltose, or dextrin. This enzyme has an important role and is required in large numbers in various industrial sectors.  $\alpha$ -amylase enzyme used in high temperature reactions.  $\alpha$ -amylase derived from animals, plants, and mesophilic bacteria will not be stable at the reaction conditions. Because of that, thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic bacteria is needed. Problem arises because  $\alpha$ -amylase-producing thermophilic bacteria have not been able to be cultured in laboratory. Therefore, the gene encoding  $\alpha$ -amylase enzyme from thermophilic bacteria need to*

*be isolated and propagated in bacteria that easily cultured in the laboratory such as Escherichia coli. This research aimed to isolate and clone the gene encoding  $\alpha$ -amylase from thermophilic bacteria in Escherichia coli DH5 $\alpha$  using pJET1.2/blunt vector. Sample used in this research originated from Kamojang Crater, Garut, West Java. Gene encoding  $\alpha$ -amylase from sample was isolated and amplified using PCR by specific primer. Isolation process success was determined by electrophoresis. Electroferogram showed that 1891 bp  $\alpha$ -amylase gene from thermophilic bacteria has been successfully isolated. Then, isolated alpha amilase gene was inserted into pJET1.2/blunt vector to produce pJET-amylase plasmid. The plasmid was introduced into E. coli DH5 $\alpha$  by heat shock method. The cloning process success was analysed by BglII restriction. The  $\alpha$ -amylase gene was also successfully cloned into E. coli DH5 $\alpha$  using pJET1.2/blunt vector with transformation efficiency of  $2.44 \times 10^4$  cfu/ $\mu$ g.*

**Keywords :** *isolation, cloning,  $\alpha$ -amylase, thermophilic*

## PENDAHULUAN

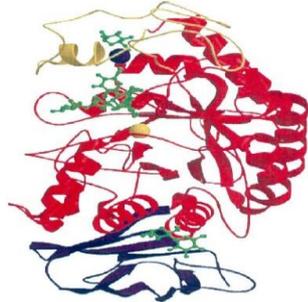
Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim berperan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengatalisis reaksi, antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel. Enzim dibagi ke dalam enam kelas besar, salah satunya adalah hidrolase. Hidrolase merupakan enzim-enzim yang menguraikan suatu zat dengan pertolongan air (Alberts, 2008: 72). Berdasarkan substratnya, kelas hidrolase terbagi menjadi beberapa subkelas dan salah satunya adalah karbohidrase yang mampu menguraikan golongan karbohidrat. Contoh enzim yang termasuk dalam kelas dan subkelas ini adalah enzim amilase (Gupta, 2003: 1599).

Enzim  $\alpha$ -amilase adalah enzim yang dapat mengatalisis reaksi hidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 glicosidik pada pati dan glikogen dengan produk akhir berupa dekstrin dan oligosakarida (Gupta, 2003: 1599). Enzim tersebut mengandung tiga daerah, yaitu A, B, dan C (Alberts, 2008: 72). Daerah A adalah yang paling luas dan menunjukkan tipe bentuk struktur barrel ( $\alpha/\beta$ ). Daerah B berada di antara daerah A dan C yang terikat dengan daerah A melalui ikatan

disulfide. Daerah C mempunyai struktur lembar  $\beta$  yang terikat pada daerah A dengan rantai polipeptida sederhana dan terlihat seperti daerah tunggal yang fungsinya tidak diketahui. Sisi aktif pada  $\alpha$ -amilase terletak pada celah yang panjang di antara ujung karboksil daerah A dan B. Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) berada di antara daerah A dan B serta berperan dalam stabilitas struktur tiga dimensi dan sebagai aktivator alosterik (Gupta, 2003: 1599). Sisi pengikat substrat terdiri atas lima subsisi dengan sisi katalis berada pada subsisi tiga. Substrat dapat diikat dengan gula residu pertama pada subsisi satu atau dua yang memungkinkan pemecahan terjadi di antara gula residu pertama dan kedua atau kedua dan ketiga. Struktur molekuler dari enzim ini adalah  $\alpha$ -1,4-glukanohidrolase.  $\alpha$ -amilase ini memiliki beberapa sisi aktif yang dapat mengikat 4 hingga 10 molekul substrat sekaligus (Poedjiadi, 1994: 35).

$\alpha$ -amilase merupakan kelas enzim industri yang mewakili sekitar 30% dari produksi enzim dunia (Calik, 2001: 61). Enzim tersebut telah diaplikasikan dalam industri makanan, detergen, pengolahan air limbah, bubur kertas, bioremediasi, dan biologi molekuler (Maarel, 2005: 137). Dalam pemanfaatannya di berbagai industri, enzim  $\alpha$ -amilase biasa digunakan dalam reaksi bersuhu tinggi. Menurut Setiasih

(2006: 24), reaksi suhu tinggi dipilih karena dapat mengurangi risiko terjadinya kontaminasi, meningkatkan laju transfer massa, dan mendorong kesetimbangan ke arah pembentukan produk. Contoh penggunaan enzim  $\alpha$ -amilase dalam reaksi suhu tinggi adalah pada tahap likuifikasi pati. Likuifikasi pati biasanya dilakukan pada suhu di atas 50°C dengan suhu optimumnya 70-90°C (Li, 2014: 151).



Gambar 1. Struktur Tiga Dimensi Enzim  $\alpha$ -amilase (De Souza, 2010: 851)

Kestabilan terhadap suhu, pH asam, dan waktu paruh merupakan karakteristik penting untuk mengeksplorasi enzim ini di industri. Kemampuan katalis dan kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase yang berasal dari hewan, tumbuhan, dan mikroba mesofilik akan menurun pada suhu tinggi. Oleh karena itu, dibutuhkan enzim  $\alpha$ -amilase yang bersifat termostabil. Enzim  $\alpha$ -amilase termostabil tidak mengalami denaturasi akibat naiknya suhu lingkungan dan menunjukkan aktivitas optimum pada suhu tinggi (Asgher, 2007: 950). Selain itu, menurut Haki (2003: 17) enzim termostabil lebih tahan terhadap pelarut, detergen, dan senyawa denaturan. Enzim  $\alpha$ -amilase dengan karakteristik tersebut bisa didapatkan dari bakteri termofilik.

Bakteri termofilik adalah bakteri yang mampu hidup pada suhu di atas 45°C dan hidup optimal pada kisaran 55°C - 65°C (Lestari, 2000: 21). Bakteri termofilik dapat hidup di lingkungan suhu tinggi karena memiliki protein yang stabil dalam suhu tinggi dan mekanisme perbaikan DNA yang

unik. Bakteri tersebut dapat memproduksi enzim termostabil dengan stabilitas operasional tinggi dan waktu paruh panjang (Niehaus, 1999: 711). Terdapat beberapa bakteri termofilik yang dapat menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase, yaitu *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, dan *G. stearothermophilus* (Schallmeyer, 2003: 1).

Permasalahannya, bakteri termofilik masih sulit dikulturkan pada kondisi laboratorium. Salah satu cara untuk mendapatkan enzim  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik adalah dengan mengisolasi gen pengode enzim  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik dan memperbanyak gen tersebut dalam bakteri yang mudah ditumbuhkan di laboratorium. Penelitian Hailemariam (2013: 61) telah membuktikan bahwa gen  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik, yang berasal dari situs geotermal di Etiopia, berhasil diisolasi dengan teknik metagenomik. Gen tersebut juga berhasil dikloning pada *E. coli*. Pada penelitian Berekaa (2007: 178), ditunjukkan bahwa gen  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik *G. thermoleovorans* berhasil dikloning pada *E. coli* DH5 $\alpha$ . Penelitian lain juga membuktikan bahwa gen  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* yang berasal dari sampel tanah Iran dapat diisolasi dan dikloning pada *E. coli* (Javan, 2012: 3). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi gen pengode  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik dan mengkloning gen tersebut pada *E. coli* DH5 $\alpha$  menggunakan vektor pJET1.2/blunt.

## METODE

### Strain, Plasmid, dan Reagen

Sel yang digunakan untuk mengkloning gen  $\alpha$ -amilase pada penelitian ini adalah *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . Vektor kloning yang digunakan adalah plasmid pJET 1.2/blunt. Semua kit yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Invitrogen.

### Isolasi dan Amplifikasi Gen $\alpha$ -amilase

Sampel air yang mengandung genom bakteri termofilik diambil dari Kawah Kamojang, Garut, Jawa Barat. Isolasi dan amplifikasi gen  $\alpha$ -amilase dari bakteri termofilik dilakukan dengan metode PCR. Komposisi untuk setiap reaksi dengan volume akhir 25  $\mu$ l adalah sebagai berikut: 17,8  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O; 2,5  $\mu$ l 10X *buffer* reaksi; 0,5  $\mu$ l 10mM dNTPs; 0,5  $\mu$ l Taq DNA *Polymerase* 5 U/ $\mu$ l; 0,6  $\mu$ l 10 mM primer *amyF* (5'-GATCATATTTTGCATCGGTCCTGGCCG-3'); 0,6  $\mu$ l 10 mM primer *amyR* (5'-GCAGGCATCAAGGCCATGCCA-3'); dan 2,5  $\mu$ l sampel dari Kawah Kamojang. Amplifikasi gen  $\alpha$ -amilase dilakukan sebanyak 30 siklus dengan kondisi inisiasi (95°C selama 3 menit), denaturasi (95°C selama 15 detik), *annealing* (60°C selama 15 detik), *elongasi* (72°C selama 20 detik) dan *elongasi* akhir (72°C selama 5 menit).

### Purifikasi DNA

Gel agarosa yang mengandung fragmen gen  $\alpha$ -amilase dipotong di bawah sinar UV. Potongan gel dimasukkan ke dalam *microtube* dan ditambahkan *buffer* DF sebanyak 500  $\mu$ l. *Microtube* berisi gel diinkubasi di *water bath* pada suhu 55°C selama 10 menit. Setelah 10 menit, *microtube* dikeluarkan dan didinginkan pada suhu ruang sekitar 3 menit.

Larutan gel diambil sekitar 800  $\mu$ l dan dipindahkan ke dalam kolom DF yang ditempatkan pada tabung penampung. Kolom DF disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 rpm. Larutan yang tersimpan dalam tabung penampung dibuang. Kolom DF ditempatkan kembali pada tabung penampung yang baru.

Larutan *buffer* W1 diambil sebanyak 400  $\mu$ l lalu ditambahkan ke dalam kolom DF. Kolom DF disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 rpm. Larutan yang terbentuk pada tabung penampung dibuang. Kolom DF

ditempatkan pada tabung penampung yang baru dan ditambahkan dengan 600  $\mu$ l larutan *buffer* pencuci. Setelah didiamkan selama 1 menit, kolom DF disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 rpm. Tabung penampung yang berisi larutan diganti dengan *tube* yang baru. Kolom DF ditempatkan pada tabung penampung yang baru lalu disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm untuk mengeringkan matriks.

Kolom DF ditempatkan di atas tabung Eppendorf 1.5 ml kemudian *buffer* elusi ditambahkan ke tengah-tengah matriks sebanyak 25  $\mu$ l lalu didiamkan selama 5 menit. Kolom DF disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm untuk melarutkan fragmen DNA yang diisolasi. Hasil purifikasi divisualisasi dengan elektroforesis.

### Konstruksi Plasmid pJET-amilase

Gen  $\alpha$ -amilase hasil purifikasi disisipkan pada vektor pJET1.2/blunt pada sisi restriksi *NotI-Bsu15I*. Perbandingan antara jumlah DNA sisipan dengan vektor yang digunakan adalah 3:1. Komposisi reaksi ligasi dengan volume reaksi 20  $\mu$ l adalah sebagai berikut: 10  $\mu$ l *buffer* ligasi, 4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 3  $\mu$ l gen  $\alpha$ -amilase, dan 1  $\mu$ l enzim *blunting*. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 70°C selama 5 menit. Vektor pJET1.2/blunt dan DNA ligase ditambahkan ke dalam larutan masing-masing sebanyak 1  $\mu$ l. *Microtube* berisi larutan tersebut disentrifugasi selama 3-5 detik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Hasil penyisipan gen  $\alpha$ -amilase pada vektor pJET1.2/blunt dalam penelitian ini disebut plasmid pJET-amilase.

### Transformasi *E. coli* DH5 $\alpha$ dengan Metode *Heat Shock*

Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten dibuat dengan menggunakan buffer CaCl<sub>2</sub>. Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten tersebut ditransformasi menggunakan metode kejut

panas. Sebanyak 5  $\mu$ l plasmid pJET-amilase dimasukkan ke dalam *microtube* yang telah berisi 50  $\mu$ l sel *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten. Suspensi tersebut diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten diberi perlakuan kejut panas pada suhu 42°C selama 90 detik dan diinkubasi kembali di dalam es selama 2 menit.

Sebanyak 600  $\mu$ l medium Luria Bertani (LB) cair ditambahkan ke dalam *microtube* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1.5 jam dengan kecepatan *shaker* 250 rpm. Setelah diinkubasi, *microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 100 $\mu$ l untuk meresuspensi presipitat sel *E. coli* DH5 $\alpha$  transforman. Sebanyak 100 $\mu$ l sel transforman ditumbuhkan pada medium LB padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam.

Hasil transformasi divalidasi menggunakan kontrol positif (Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  yang telah mengandung plasmid pJET1.2/blunt an sel *E. coli* DH5 $\alpha$  yang mengandung gen sisipan dari kit dan kontrol negatif (Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  kompeten tanpa plasmid). Efisiensi transformasi dihitung menggunakan rumus berikut (Sambrook, 1989: 136):

$$\frac{(\text{jumlah koloni})\text{cfu} \times (\text{volume kultur})\text{ml}}{(\text{konsentrasi DNA})\mu\text{g} \times (\text{volume sebar})\text{ml}}$$

### Isolasi dan Restriksi Plasmid pJET-amilase

Kultur *E.coli* DH5 $\alpha$  transforman sebanyak 1.5 ml disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Endapan sel diresuspensi dengan 200  $\mu$ l larutan I (Glukosa, EDTA, Tris-HCl, deion) dingin. Suspensi divorteks hingga seluruh endapan sel terlarut. Larutan II (NaOH, SDS, deion) ditambahkan sebanyak 400  $\mu$ l segera ditambahkan lagi dengan 300  $\mu$ l larutan III (Asam asetat glasial, Kalium

asetat, deion) dingin. *Microtube* dirotasi sebanyak 3 sampai 5 kali lalu dimasukkan ke dalam es. *Microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 400  $\mu$ l, dipindahkan ke *microtube* baru lalu ditambahkan 800  $\mu$ l EtOH absolut. Supernatan tersebut diinkubasi pada suhu -80 °C selama 45 menit. Setelah selesai inkubasi, *microtube* disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang kembali lalu ditambahkan EtOH 70% sebanyak 200  $\mu$ l. *Microtube* yang berisi campuran endapan sel dengan EtOH 70% disentrifugasi 14.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang. Endapan dilarutkan dalam 30  $\mu$ l TE buffer dan disiapkan untuk uji restriksi. Komposisi reaksi restriksi adalah sebagai berikut: 16  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l buffer *Bgl*III 10X, 1  $\mu$ l plasmid pJET-amilase hasil isolasi, dan 1  $\mu$ L enzim *Bgl*III. *Microtube* yang berisi larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Keberhasilan proses restriksi divisualisasi dengan elektroforesis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Gen $\alpha$ -amilase dari Bakteri Termofilik

Proses isolasi gen yang konvensional diawali dengan menumbuhkan bakteri pada medium pertumbuhan yang tepat. Setelah mencapai kepadatan sel tertentu, dilakukan isolasi DNA genom menggunakan kit isolasi yang telah tersedia secara komersil. Metode tersebut tidak dapat dilakukan pada penelitian ini karena bakteri yang digunakan adalah bakteri termofilik. Bakteri termofilik masih belum banyak dieksplorasi oleh para peneliti sehingga pemahaman tentang kondisi dan komposisi medium pertumbuhannya masih belum banyak diketahui (Gome, 2004: 223). Selain itu, bakteri ini membutuhkan suhu

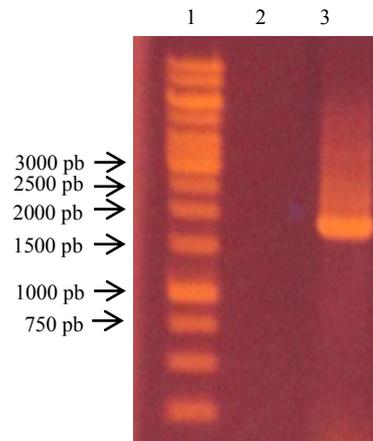
tinggi untuk dapat tumbuh. Hal-hal tersebut menyebabkan bakteri termofilik masih sulit dikulturkan pada kondisi laboratorium standar.

Proses isolasi pada penelitian ini menggunakan teknik metagenomik. Teknik metagenomik digunakan untuk mempelajari genom kolektif dari anggota komunitas mikroba yang tidak dapat terkulturkan dengan teknik standar (Dale, 2010: 85). Teknik ini diawali dengan pengambilan sampel dari lingkungan yang diinginkan. Di dalam sampel tersebut, pasti terdapat campuran DNA genom organisme yang hidup dalam lingkungan tersebut. Gen target dapat langsung diisolasi dan diamplifikasi dari sampel dengan teknik PCR. Proses amplifikasi harus menggunakan primer yang spesifik terhadap gen target.

Proses isolasi dan amplifikasi gen  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan metode PCR yang menggunakan primer spesifik. Kelayakan primer yang digunakan dalam penelitian ini sudah diuji menggunakan program National Center for Biotechnology Information (NCBI). Urutan gen  $\alpha$ -amilase yang dijadikan acuan dalam perancangan primer berasal dari bakteri termofilik *B. stearothermophilus* dengan panjang gen sebesar 1891 bp. *B. stearothermophilus* dikenal dapat memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase yang dapat menghidrolisis ganula pati mentah. Bakteri tersebut dilaporkan memiliki  $\alpha$ -amilase dengan aktivitas tinggi (Al-Qodah, 2006: 850).

Elektroferogram (Gambar 2) menunjukkan tidak adanya *smear* yang terbentuk pada kontrol negatifnya pun tidak ada pita DNA yang terbentuk (Lajur 2). Hal ini menunjukkan bahwa primer yang dirancang dapat mengenali gen  $\alpha$ -amilase secara spesifik. Pada proses PCR yang menggunakan sampel bakteri termofilik, terbentuk sebuah pita DNA yang berukuran 1891 pb (Lajur 3). Hasil ini menunjukkan bahwa gen  $\alpha$ -amilase yang berukuran 1891

pb telah berhasil diisolasi dari bakteri termofilik.



Gambar 2. Elektroferogram Hasil PCR Gen  $\alpha$ -Amilase. Lajur 1 Ladder Thermoscientific 1 Kb. Lajur 2. Kontrol Negatif. Lajur 3. Sampel Bakteri Termofilik

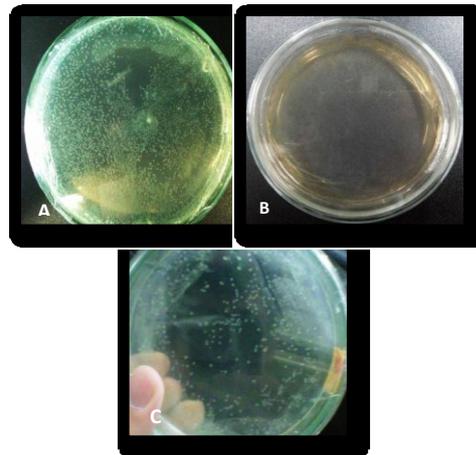
#### Kloning Gen $\alpha$ -Amilase pada *E. coli* DH5 $\alpha$

Untuk memperbanyak gen  $\alpha$ -amilase, gen tersebut harus dikloning pada sel inang yang dapat ditumbuhkan pada kondisi laboratorium. Proses kloning terbagi menjadi dua tahap, yaitu konstruksi plasmid pJET-amilase dan transformasi sel *E. coli* DH5 $\alpha$ . Pada tahap konstruksi, vektor yang digunakan adalah pJET1.2/blunt. Vektor ini dipilih karena menawarkan sistem seleksi yang mudah dan cepat. Vektor ini mengandung gen resistensi ampisilin sebagai gen seleksi proses transformasi dan gen *eco47IR* sebagai gen penanda keberhasilan proses penyisipan gen atau ligasi (Thermo Scientific, 2012: 2). Pada konstruksi plasmid pJET-amilase, gen  $\alpha$ -amilase disisipkan pada sisi restriksi *NotI*-*Bsu15I*. Sisi restriksi tersebut terletak di antara gen *eco47IR*. Gen *eco47IR* merupakan gen yang dapat menyebabkan kematian pada sel transforman (Thermo Scientific, 2015: 2). Ketika gen  $\alpha$ -amilase berhasil disisipkan pada sisi restriksi tersebut, gen *eco47IR* tidak dapat

diekspresikan sehingga sel transforman tidak akan mati.

Pada tahap transformasi, sel inang yang digunakan adalah *E. coli* DH5 $\alpha$ . *E. coli* DH5 $\alpha$  dipilih untuk memperbanyak gen  $\alpha$ -amilase karena sudah banyak digunakan sebagai sistem kloning, mudah dimanipulasi, dan mudah ditumbuhkan di laboratorium. Pada penelitian ini, metode seleksi yang digunakan untuk menentukan keberhasilan proses transformasi adalah *lethal screening*. *Lethal screening* merupakan metode seleksi transforman yang berdasarkan hidup atau matinya sel (Sambrook, 1989: 57). Hasil transformasi divalidasi menggunakan sel *E. coli* DH5 $\alpha$  yang sudah mengandung gen sisipan dari kit (kontrol positif) dan sel *E. coli* DH5 $\alpha$  tanpa plasmid (kontrol negatif). Proses transformasi sel *E. coli*

DH5 $\alpha$  berlangsung dengan baik. Hal ini ditunjukkan dengan hasil yang didapat pada kontrol positif dan negatif. Pada kontrol positif, terlihat banyak koloni sel *E. coli* DH5 $\alpha$  yang tumbuh (Gambar 3A), sedangkan pada kontrol negative, tidak ada satu pun sel *E. coli* DH5 $\alpha$  yang tumbuh (Gambar 3B). Pada gambar 3C, terlihat ada 305 koloni sel *E. coli* DH5 $\alpha$  yang tumbuh di permukaan medium LB ampisilin. Tumbuhnya sel *E. coli* DH5 $\alpha$  pada medium selektif LB ampisilin menunjukkan bahwa sel *E. coli* DH5 $\alpha$  berhasil ditransformasi menggunakan plasmid pJET-amilase. Vektor pJET1.2/blunt memiliki gen resistensi ampisilin sehingga sel yang berhasil ditransformasi dengan vektor tersebut dapat tumbuh pada medium yang mengandung ampisilin (Thermo Scientific, 2015: 2).



Gambar 3. A) Kontrol Positif Transformasi Sel *E. coli* DH5 $\alpha$ . (B) Kontrol Negatif Transformasi Sel *E. coli* DH5 $\alpha$ . (C) Hasil Transformasi Sel *E. coli* DH5 $\alpha$  Menggunakan Plasmid pJET-amilase.

Keberhasilan proses transformasi bukan hanya ditentukan dari tumbuhnya sel transforman pada medium selektif, tetapi dapat ditentukan juga dengan nilai efisiensi transformasi. Efisiensi transformasi pada penelitian ini adalah  $2.44 \times 10^4$  cfu/ $\mu$ g.

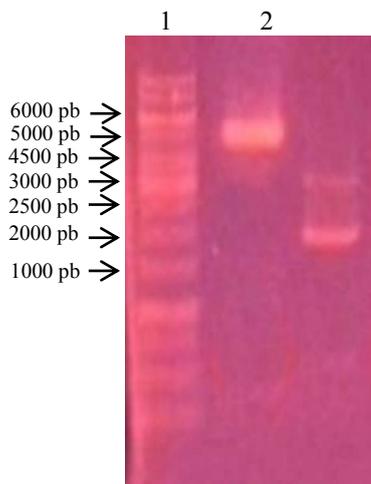
#### Analisis Restriksi Plasmid pJET-amilase

Pada penelitian ini, dilakukan analisis restriksi untuk memastikan bahwa gen yang

terinsersi pada vektor kloning pJET1.2/blunt adalah gen  $\alpha$ -amilase bukan gen yang lain. Pada analisis restriksi, digunakan enzim restriksi *Bgl*III karena memiliki dua buah sisi restriksi (A<sup>^</sup>GATCT) pada vektor pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, 2015: 1). Hal tersebut memungkinkan enzim restriksi *Bgl*III untuk memotong gen  $\alpha$ -amilase yang berukuran

1891 pb dari plasmid pJET-amilase yang berukuran total 4865 pb.

Elektroferogram (Gambar 4) memperlihatkan adanya perbedaan hasil antara plasmid yang direstriksi dan tidak direstriksi. Pada sampel plasmid pJET-amilase yang tidak direstriksi (Lajur 2), terbentuk sebuah pita DNA berukuran sekitar 5.000 pb sedangkan pada sampel plasmid pJET-amilase yang direstriksi (Lajur 3) terbentuk dua buah pita DNA yang berukuran 1.891 pb dan 2.974 pb. Hal ini menunjukkan bahwa plasmid pJET-amilase mengandung gen  $\alpha$ -amilase yang berukuran 1.891 pb dan vektor pJET1.2/blunt yang berukuran 2.974 pb.



Gambar 4. Analisis Restriksi plasmid pJET-amilase. Lajur 1 Ladder ThermoScientific 1 Kb. Lajur 2 Plasmid pJET-amilase yang Tidak Direstriksi. Lajur 3 Plasmid pJET-amilase yang Direstriksi.

Melalui penelitian ini, dibuktikan bahwa gen pengode enzim termostabil dapat diisolasi dan dikloning pada bakteri lain yang lebih mudah ditumbuhkan. Kunci keberhasilan dari isolasi dan amplifikasi terletak pada primer yang digunakan. Primer tersebut harus dirancang dengan baik dan dapat mengenali gen target secara spesifik sehingga tidak dapat mengamplifikasi gen lain. Selain itu, sistem seleksi yang digunakan untuk mendapatkan

sel transforman yang mengandung gen  $\alpha$ -amilase perlu disesuaikan dengan karakteristik vektor kloning yang digunakan.

#### SIMPULAN

Pada penelitian ini, gen  $\alpha$ -amilase yang berukuran 1.891 pb dari bakteri termofilik telah berhasil diisolasi dan diamplifikasi dengan metode PCR. Gen  $\alpha$ -amilase tersebut telah berhasil dikloning pada *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  menggunakan vektor pJET1.2/blunt dengan efisiensi transformasi sebesar  $2.44 \times 10^4$  cfu/ $\mu$ g.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B.; A. Johnson; J. Lewis; M. Raff; K. Roberts; & P. Walter. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Sciences.
- Al-Qodah, Z. 2006. "Production and Characterization of Thermostable  $\alpha$ -Amylase by Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*". *Biotechnology Journal*. 1 (7-8), hlm. 850–857
- Asgher, M.; A. Javaid; S.U. Rahman; & R.L. Legge. 2007. "A Thermostable A-Amylase from A Moderately Thermophilic *Bacillus subtilis* Strain for Starch Processing". *J Food Engin.* 79(3), hlm. 950–955
- Berekaa, M.M.; N.A. Soliman; & Y.R.A. Fattah. 2007. "Production, Partial Characterization and Cloning of Thermostable A-Amylase of a Thermophile *Geobacillus thermoleovorans* YN". *Biotechnology*. 6(2), hlm. 175-183
- Calik, P. & T.H. Ozdamar. 2001. "Carbon Sources Affect Metabolic Capacities of *Bacillus* Species for The Production of Industrial Enzymes: Theoretical Analyses for Serine and Neutral Proteases and

- Alpha-Amylase". *Biochem Eng J.* 8 (1), hlm. 61–81
- Dale, J.W. & S.F. Park. 2010. *Molecular Genetics of Bacteria*. UK: Wiley-Blackwell.
- De Souza, P.M.; P.D.O.E. Magalhaes. 2010. Application Of Microbial A-Amylase in Industry – A Review. *Brazilian Journal of Microbiology.* 41, hlm. 850-861
- Gome, J & W. Steiner. 2004. "The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes". *Food Technol. Biotechnol.* 42(4), hlm. 223–235
- Gupta, R.; P. Gigras; H. Mohapatra; V.K. Goswami; & B. Chauhan. 2003. "Microbial A-Amylases: A Biotechnological Perspective. *Proc. Biochem.* 38, hlm. 1.599-1.616
- Hailemariam, A.T.; T.B. Gezmu; G.D. Haki. 2013. "Thermostable Alpha-Amylase from Geothermal Sites of Ethiopia (Afar Region): Isolation, Purification and Characterization". *Greener Journal of Biological Sciences.* 3 (2), hlm. 61-73
- Haki, G.D. & S.K. Rakshit. 2003. "Developments in Industrially Important Thermostable Enzyme : A Review". *Journal Bioresource Technology.* 89, hlm. 17-34
- Javan, F.A. & M.M. Dehkordi. 2013. Amplification, Sequencing and Cloning of Iranian Native *Bacillus subtilis* Alpha-amylase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Jundishapur J Microbiol.* 6(8), hlm. 1-7
- Lestari, P. 2000. "Eksplorasi Enzim Termostabil dari Mikroba Termofil". *Jurnal Hayati.* 7 (1), hlm. 21-25
- Li, Z.; S. Chena; Z. Gua; J. Chena: J. Wua. 2014. "Alpha-cyclodextrin: Enzymatic Production and Food Applications". *Elsevier.* 35 (2), hlm. 151-160
- Maarel, V.D.; V.D. Veen B; H.U. Leemhuis; & L. Dijkhuizen. 2005. "Properties and Applications of Starch Converting Enzymes of The Alpha-Amylase Family". *J. Biotechnol.* 94, hlm. 137–155
- Niehaus, F.; C. Bertoldo; M. Kahler; & G. Antranikian. 1999. "Extremophiles as a Sources of Novel Enzymes for Industrial Application". *Applied Microbiol. Biotechnol.* 51, hlm. 711-729
- Poedjiadi, A.1994. *Dasar – dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Richana, N. 2000. "Prospek dan Produksi Enzim Alfa-amilase dari Mikroorganisme". *Tinjauan Ilmiah Riset Biologi dan Bioteknologi Pertanian,* 3 (2).
- Sambrook, J.; E.F. Fritsch; & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schallmeyer, M.; A. Singh; & O.P. Ward. 2003. "Developments in The Use Of Bacillus Species for Industrial Production". *Canadian Journal Microbiology.* 50, hlm. 1-17
- Setiasih, S.; B. Wahyuntari; Trimillah; & D. Aprilliani. 2006. "Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase Ekstrasel dari Isolat Bakteri Termofi SW2". *Jurnal Kimia Indonesia.* 1(1), hlm. 22-27
- Thermo Scientific. 2015. Product Information Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit. California: Thermo Fisher Scientific Inc.