

## Kloning Gen $\alpha$ -Amilase Pendegradasi Butir Pati dari *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 pada Vektor pGEM-T

Nurul Widya

Dosen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Muhammadiyah Sumatera Barat  
nurulwidya@umsb.ac.id

### Abstract

$\alpha$ -Amylase (EC 3.2.1.1) is an enzyme which hydrolyzes  $\alpha$ -1,4 glycosidic bonds in polysaccharides such as amylose and amylopectin.  $\alpha$ -Amylase is widely applied in industry, such as starch processing, detergent, and pharmaceutical industries.  $\alpha$ -Amylase *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 can degrade raw starch at low temperature, hence it has a potential economic value as an alternative enzyme in starch processing. The long term goal of this research is to produce *B. aquimaris*  $\alpha$ -amylase recombinant, while the short term goals of this research were to amplify the *baqA* gene by PCR method and to clone the resulted DNA fragment gene in pGEM-T vector. The  $\alpha$ -amylase gene amplified by PCR using forward primer and reverse primer has a size of 1.5 kb. Recombinant pGEM-T plasmid containing the 1.5 kb  $\alpha$ -amylase fragment has been obtained.

**Keywords:** raw starch,  $\alpha$ -amylase, *B. aquimaris* MKSC 6.2, recombinant plasmid

### PENDAHULUAN

Pati merupakan polisakarida yang terdiri dari dua jenis polimer, yaitu amilosa dan amilopektin. Umumnya kandungan amilosa pada pati sekitar 20-25% dan amilopektin sekitar 75-80%. Konversi pati menjadi oligosakarida atau glukosa dapat dilakukan dengan menggunakan hidrolisis asam. Selain itu, dapat juga dengan menggunakan hidrolisis secara enzimatik sehingga dihasilkan produk yang spesifik dan efisiensi produk yang tinggi.

$\alpha$ -Amilase (EC 3.2.1.1) merupakan endoenzim yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik pada pati.  $\alpha$ -Amilase dihasilkan oleh berbagai jenis mikroba seperti bakteri, ragi, dan jamur. Untuk aplikasi industri, umumnya  $\alpha$ -amilase yang berasal dari mikroba lebih disukai karena pertumbuhan yang cepat, produktivitas tinggi, dan banyak yang bersifat termotabil (Mishra and Behera, 2008).

$\alpha$ -Amilase paling banyak digunakan pada industri pemrosesan pati menjadi oligosakarida dan sirup glukosa. Konversi enzimatik dari pati melibatkan tahap gelatinisasi untuk membuka struktur butir pati yang memerlukan suhu yang tinggi (105°C) sehingga terbentuk suatu suspensi kental. Tahap selanjutnya adalah liquifaksi yang melibatkan hidrolisis pati parsial dan menurunkan kekentalan suspensi. Tahap terakhir yaitu sakarifikasi yang melibatkan produksi glukosa melalui hidrolisis lebih lanjut. Konversi pati dapat dilakukan tanpa tahap gelatinisasi jika digunakan enzim yang mampu mendegradasi butir pati sehingga proses tersebut menjadi lebih dan menghemat biaya produksi.

*Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 adalah bakteri yang diisolasi dari koral lunak *Sinularia* sp. dari Pulau Merak Kecil, Banten, Indonesia.  $\alpha$ -Amilase *B. aquimaris* MKSC 6.2 menunjukkan kemampuan untuk mendegradasi butir pati jagung, beras, sagu, singkong, dan kentang. Gen pengkode  $\alpha$ -amilase *B. aquimaris* MKSC 6.2 (*baqA*) telah berhasil diisolasi. (Puspasari *et al.*, 2011). Untuk memenuhi kebutuhan industri pati terhadap enzim dalam skala yang besar dan ekonomis, maka perlu dilakukan ekspresi gen pengkode *baqA* pada suatu sel inang dengan teknologi DNA rekombinan. Melalui teknologi DNA rekombinan maka suatu gen rekombinan akan menghasilkan protein tertentu dalam waktu lebih cepat dan jumlah lebih besar daripada produksi secara konvensional. Salah satu sel inang yang potensial untuk memenuhi kebutuhan industri tersebut adalah *Bacillus megaterium*.

*B. megaterium* mampu memanfaatkan berbagai jenis sumber karbon untuk pertumbuhannya. *B. megaterium* tidak menghasilkan endotoksin seperti pada *Escherichia coli*. Selain itu, bakteri ini dikenal dengan kemampuannya mensekresikan protein dengan jumlah yang besar. Sekresi protein

rekombinan ini pada medium pertumbuhannya mengurangi usaha dan harga dari pemurnian protein.

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk memproduksi  $\alpha$ -amilase *B. aquimaris* MKSC 6.2 rekombinan yang dapat mendegradasi butir pati pada sel inang *B. megaterium*. Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi gen  $\alpha$ -amilase *B. aquimaris* MKSC 6.2 dengan metode PCR dan melakukan subkloning DNA fragmen *baqA* yang dihasilkan pada vektor pGEM-T.

#### METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Program Studi Kimia, Institut Teknologi Bandung. Alat gelas umum yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari gelas kimia, gelas ukur, labu erlenmeyer, tabung reaksi, tabung reaksi tertutup, batang pengaduk, *spreader*, cawan petri, pipet tetes, kuvet, termometer, dan batang L. Alat-alat non gelas terdiri dari jarum ose, spatula, dan berbagai ukuran pipet mikro (*Eppendorf, Germany*) 1- 10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L, dan 100-1000  $\mu$ L, tip dengan warna dan ukuran yang berbeda, tabung mikro 1,5 mL, dan tabung PCR (*Eppendorf, Germany*).

Alat-alat gelas, tip, tabung mikro, dan media yang akan digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme disterilkan dengan *autoclave* (*ALL AMERICAN, Electric Pressures Stem Sterilizer Model No.25X*) dan dikeringkan dengan oven (*Memmert*). Bahan-bahan kimia yang digunakan ditimbang dengan menggunakan neraca analit (*Ohaus*). Homogenisasi campuran dalam jumlah kecil digunakan vortex (*Vortex Genie*). Inkubasi biakan sel pada media cair dilakukan di *shaker incubator* (HT).

Inkubasi biakan sel pada media padat dilakukan pada inkubator suhu 37°C (*Fischer 503*). Biakan sel disimpan di lemari es pada suhu 4°C. DNA dan stok gliserol sel disimpan pada suhu -20°C di *freezer* (*Forma Scientific Inc, USA*). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan *Gen Amp PCR System 2400* (*Perkin Elmer*) dan visualisasi hasil elektroforesis menggunakan lampu UV (*St. Gabriel, USA*) dan kamera canon model IXUS 200 IS.

#### Pembuatan media *Luria bertani* (LB)

Komposisi untuk media padat terdiri dari bakto tripton 1% (b/v), ekstrak ragi 0,5% (b/v), bakto agar 1,5% (b/v), dan NaCl 1% (b/v) yang dilarutkan dalam aquades dan disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C. Media padat disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C dan media cair disimpan pada suhu ruang.

#### Larutan EDTA 0,5 M

Sebanyak 186,1 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O dilarutkan ke dalam 800 mL aquades dan diaduk dengan kuat menggunakan pengaduk magnet, kemudian ditambahkan NaOH ke dalam larutan hingga pH mencapai 8,0, dan larutan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### Larutan bufer TAE 0,5 M

Sebanyak 24,3 g *Trisbase*, 5,71 mL asam asetat glasial, dan 10 mL EDTA 0,5 M dimasukkan ke dalam 84,29 mL aquades, larutan diaduk hingga larut. Larutan stok TAE 0,5 M 50 kali disimpan dalam botol yang tertutup rapat.

#### Peremajaan Kultur *E. coli* TOP 10

Koloni tunggal *E. coli* TOP10 diremajakan dari stok yang tersedia dalam media padat. Koloni tunggal *E. coli* TOP10 ditumbuhkan pada media padat dan diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 16-18 jam. Kultur disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C.

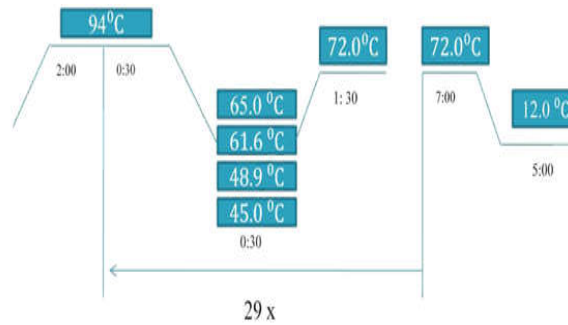
#### Amplifikasi Gen dengan Metode PCR

Primer yang akan digunakan pada penelitian ini dirancang dengan menggunakan aplikasi DNASTAR (Tabel 1). Amplifikasi gen  $\alpha$ -amilase dimulai pada urutan nukleotida 77-97 untuk perancangan primer *forward* dan urutan ke 1539-1514 untuk perancangan primer *reverse*. Campuran reaksi untuk PCR ini terdiri dari 2,5  $\mu$ L bufer *Taq-polymerase* (10 kali), 2,5  $\mu$ L dNTP 10 mM, primer *forward* 20  $\mu$ M sebanyak 0,5  $\mu$ L, primer *reverse* 20  $\mu$ M sebanyak 0,5  $\mu$ L, *taq-polymerase* 0,125  $\mu$ L, 1  $\mu$ L templat gen amilase-pGEMT, dan ddH<sub>2</sub>O steril hingga volume total 25  $\mu$ L.

**Tabel 1.** Primer untuk amplifikasi gen *baqA*

Primer	Urutan	Restriksi	T <sub>m</sub> (
pMM- <i>baqA</i> -F	agatctAAGAAGAACGAAAGTGGCAGG	<i>Bgl</i> II	64,60
pMM- <i>baqA</i> -R	gcctgcTTATGATTTGCGGTTTTTCTCCG	<i>Sph</i> I	66,00

Pada amplifikasi fragmen gen pengkode *baqA* dilakukan variasi suhu *annealing* yaitu 45°C; 48,9°C; 61,6°C; dan 65,0°C (Gambar 1). Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis agarosa 0,75% (b/v).

**Gambar 1.** Siklus PCR untuk amplifikasi gen *baqA*

#### Elektroforesis Agarosa

Gel agarosa 1% dibuat dengan melarutkan 0,3 g agarosa dalam 30 mL buffer TAE 1x kemudian dipanaskan hingga larut. Larutan ditambahkan dengan 0,2 µL Etidium bromida 10 mg/mL dan gel dibiarkan memadat. Sampel ditambahkan dengan *loading buffer* (25% bromfenol biru dan 40% (w/v) sukrosa) dengan perbandingan 1:4 untuk sampel, lalu campuran dimasukkan ke dalam sumur gel, dan dielektroforesis pada 80-85 V selama 45 menit sehingga warna biru *loading buffer* bermigrasi sekitar 2/3 panjang gel. Pita-pita DNA divisualisasikan pada sinar UV.

#### Pemurnian fragmen DNA dengan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit*

Sebanyak 300 mg potongan gel agarosa yang mengandung fragmen DNA hasil PCR dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL. Kemudian, ditambahkan sebanyak 500 µL larutan *DF buffer* dan diinkubasi sampai larut pada suhu 55-60°C. Setelah itu, kolom DF ditempatkan dalam tabung 2 mL, kemudian dimasukkan sebanyak 800 µL larutan sampel dan disentrifugasi dengan kecepatan maksimum (12.000 rpm) selama 30 detik. Kolom DF yang mengandung DNA ditambahkan sebanyak 600 µL *wash buffer* dan disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 12000 rpm. Kolom DF ditempatkan ke dalam tabung 1,5 mL dan sebanyak 15-50 µL *elution buffer* dimasukkan ke dalam tabung dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Larutan yang diperoleh merupakan larutan DNA yang murni.

#### Ligasi dengan Vektor pGEM-T

Ligasi gen *baqA* dengan vektor pGEM-T dikatalisis oleh enzim T4 Ligase. Perbandingan jumlah fragmen *baqA* dengan vektor pGEM-T adalah 1:3. Sebanyak 5 µL *2x rapid ligation buffer* dicampurkan dengan 1 µL vektor pGEM-T (50 ng/µL), 3 µL T4 DNA ligase (3 *weiss* unit/µL), 1 µL fragmen *baqA* (25 ng/µL), dan ddH<sub>2</sub>O steril hingga volume total reaksi 10 µL. Perhitungan jumlah fragmen *baqA* dan vektor pGEM-T (1:3) adalah:

$$\frac{\text{ng vektor}}{\text{kb vektor}} \times \frac{\text{kb insert}}{\text{ng insert}} = \frac{1}{3}$$

#### Transformasi Plasmid Rekombinan ke *E. coli* TOP10

Sebanyak 100 µL sel *E. coli* TOP10 kompeten ditambahkan dengan 2 µL hasil ligasi. Kemudian, diinkubasi dalam es selama 30 menit dan inkubasi dilanjutkan pada suhu 42°C selama 90 detik. Setelah itu, diinkubasi kembali dalam es selama 2 menit. Lalu, ditambahkan sebanyak 900 µL media LB cair dan diinkubasi selama 2 jam dalam *shaker* bersuhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C.

Pelet yang diperoleh disebar ke media padat yang telah ditambah antibiotik ampicilin dan diinkubasi selama 18-22 jam pada suhu 37°C.

#### Isolasi Plasmid Rekombinan dengan Metode *Boiling lysis*

Koloni tunggal *E.coli* transforman yang mengandung plasmid pGEMT-baqA ditumbuhkan dalam 5 mL media LB cair yang telah mengandung ampicilin 50 µg/mL. Inokulum diinkubasi dengan laju aerasi 150 rpm pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah itu, dilakukan pemisahan sel dari media pertumbuhan dengan cara sentrifugasi selama 4 menit pada kecepatan 6000 rpm. Pelet sel diresuspensi dengan menambahkan 350 µL bufer STET (8% b/v sukrosa, 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 50 mM EDTA, dan 5% b/v triton x-100). Setelah itu, ke dalam suspensi sel ditambahkan 25 µL lisozim 10 mg/mL, lalu tabung mikro dibolak-balik sebanyak 4-6 kali, dan didiamkan selama 5 menit. Kemudian, suspensi sel diinkubasi dalam air mendidih selama 40 detik dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12000 rpm. Sel dipindahkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambahkan sebanyak 200 µL isopropanol, lalu tabung dibolak-balik sebanyak 4-5 kali, dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah itu, pelet di sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12000 rpm lalu pelet dikeringkan pada suhu 37°C selama 30-60 menit, kemudian dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O steril dan disimpan pada suhu -20°C.

#### Penentuan Urutan Nukleotida

Penentuan urutan nukleotida dilakukan menggunakan metode *dye terminator* dideoksi Sanger di Macrogen Korea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Primer yang digunakan untuk sekuensing adalah primer T7 sebagai primer *forward* dan primer sp6 sebagai primer *reverse*.

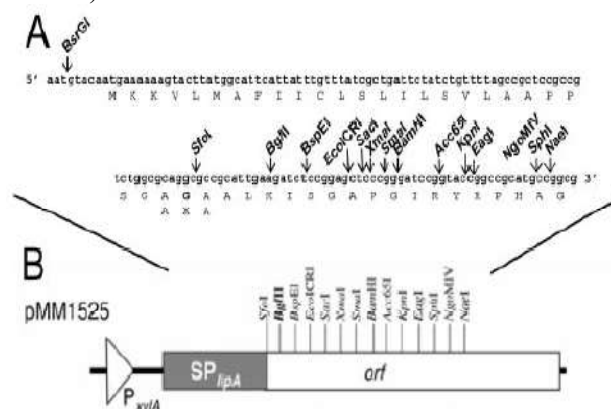
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan  $\alpha$ -amilase *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 yang mampu mendegradasi butir pati pada suhu kamar. Keuntungan dari penggunaan enzim ini adalah lebih ekonomis karena tidak perlu adanya gelatinisasi pada tahap hidrolisis pati. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning gen pengkode  $\alpha$ -amilase *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 pada pGEM-T.

Tahapan pekerjaan yang dilakukan meliputi amplifikasi gen *baqA* dengan metode PCR, pemurnian fragmen DNA, ligasi gen *baqA* dengan vektor pGEM-T, transformasi plasmid rekombinan ke *E. coli* TOP10, isolasi plasmid rekombinan pGEMT-baqA, analisis restriksi plasmid rekombinan pGEMT-baqA, dan analisis urutan nukleotida *baqA*.

#### Amplifikasi Fragmen Gen *baqA* dengan Metode PCR

Primer dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen *baqA* dan sisi restriksi yang terdapat pada vektor ekspresi pMM 1525 (Gambar 2). Primer pMM-baqA *forward* mengandung sisi pemotongan enzim restriksi *Bgl*II (5'-A↓GATCT-3'), sedangkan primer pMM-baqA *reverse* mengandung sisi pemotongan enzim restriksi *Sph*I (5'-G↓CATGC-3'). Primer *forward* memiliki Tm 64,6°C dan 44,4 % GC dengan 27 nukleotida dan primer *reverse* 66,0°C dan 41,9% GC dengan panjang nukleotida adalah 31 (Tabel 1).

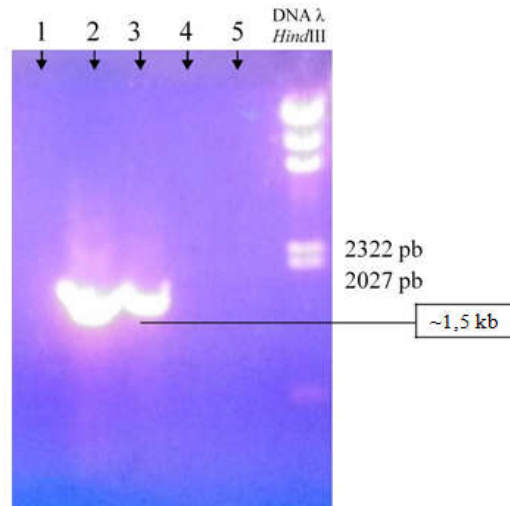


Gambar 2. MCS plasmid pMM 1525

Proses amplifikasi sebanyak 29 siklus terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing*, dan elongasi. Untuk mendapatkan pita fragmen DNA pada hasil elektroforesis, maka dilakukan

terlebih dahulu optimasi suhu *annealing* yang divariasikan menjadi 4 suhu, yaitu 45,0°C, 48,9°C, 61,6°C, dan 65,0°C.

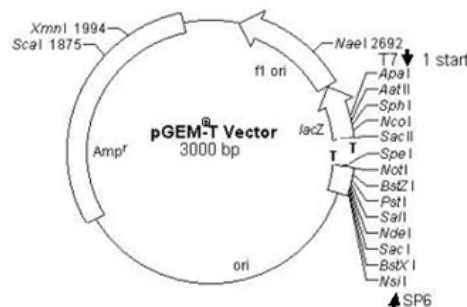
Elektroforesis gel agarosa pada gambar 3 menunjukkan terdapat pita fragmen DNA berukuran sekitar 1,5 kb pada amplifikasi menggunakan suhu 48,9°C dan 61,6°C, sedangkan pada dua suhu yang lain tidak ditemukan adanya pita fragmen DNA. Hal ini berarti bahwa suhu *annealing* yang cocok untuk amplifikasi gen adalah suhu 48,9 °C dan 61,6 °C.



**Gambar 3.** Elektroforegram hasil optimasi suhu *annealing*. Lajur 1, kontrol negatif; lajur 2, 48,9°C; lajur 3, 61,6°C; lajur 4, 45°C; lajur 5, 65,0°C

#### Ligasi pGEM-T dengan Fragmen Gen *baqA* dan Transformasi Hasil Ligasi ke *E. coli* TOP10

Fragmen DNA *baqA* dengan ukuran sekitar ~1500 pb diligasi dengan vektor pGEM-T yang memiliki ukuran 3000 pb (Gambar 4). Fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan *Taq DNA Polymerase* mengandung nukleotida adenin (A) pada ujung 3', sedangkan vektor pGEM-T yang berukuran 3000 pb yang mempunyai nukleotida timin (T) pada ujung 5'. Vektor pGEM-T dan fragmen DNA hasil PCR mempunyai ujung lancip yang saling kompatibel sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen antara nukleotida A pada fragmen DNA hasil PCR dengan nukleotida T pada vektor pGEM-T, kemudian ujung dari kedua DNA tersebut diligasikan oleh enzim T4 DNA ligase membentuk ikatan fosfodiester. Ligasi dari kedua fragmen DNA menghasilkan plasmid rekombinan pGEMT-*baqA* yang berukuran 4500 pb.



**Gambar 4.** Peta Plasmid pGEM-T

Untuk memperbanyak pGEMT-*baqA*, dilakukan kloning pada sel inang *E. coli* TOP10. Media padat yang digunakan untuk transformasi ditambah dengan IPTG (isopropil-beta-D-thiogalaktopiranosida), Xgal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galaktopiranosida), dan antibiotik ampicilin. Transforman yang dihasilkan pada transformasi *E. coli* TOP10 dengan pGEMT-*baqA* berjumlah 145 yang terdiri dari 60 koloni putih dan 85 koloni biru (Gambar 5).

Vektor pGEM-T membawa gen resisten ampicilin, gen pengkode enzim galaktosidase, dan lac-Z. Oleh karena itu, seleksi transforman yang mengandung gen *baqA* dapat dilakukan berdasarkan

resistensi ampisilin dan aktivitas galaktosidase. IPTG menginduksi sintesis galaktosidase yang mengkatalis penguraian X-gal sehingga menghasilkan kromogen berwarna biru. Transforman yang membawa vektor pGEM-T tanpa DNA *baqA* berwarna biru. Namun, adanya insersi gen *baqA* pada daerah lac-Z akan menginaktivasi sintesis  $\alpha$ -galaktosidase sehingga koloni transforman yang memiliki pGEMT-*baqA* akan berwarna putih.

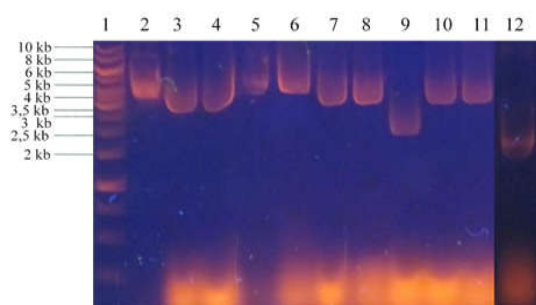


**Gambar 5.** Penapisan koloni putih biru transforman *E. coli* TOP10-pGEM-T yang mengandung fragmen *baqA*.

#### Isolasi Plasmid Rekombinan pGEM-T-*baqA*

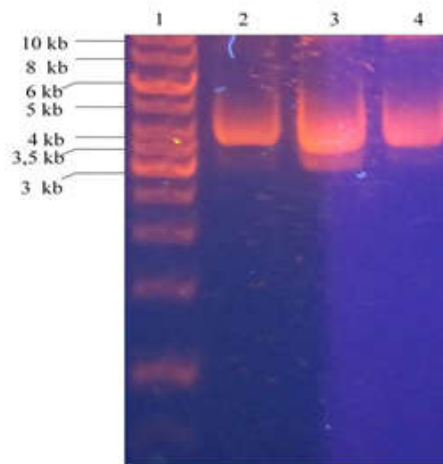
Isolasi plasmid rekombinan dilakukan dengan dua metode, yaitu metode *boiling lysis* dan metode *Biobasic Plasmid DNA Miniprep Kit*. Metode *boiling lysis* menghasilkan plasmid yang tidak murni yang masih mengandung protein dan RNA. Metode ini digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan plasmid rekombinan. Metode *Biobasic Plasmid DNA Miniprep Kit* memberikan plasmid murni dengan jumlah yang cukup banyak. Pada metode *boiling lysis*, fungsi dari masing-masing reagen yang digunakan adalah lisozim untuk memecah sel secara enzimatik, sukrosa untuk menimbulkan perbedaan tekanan osmosis antara lingkungan dalam dan luar sel, dan Triton X-100 yang akan merusak sel dalam keadaan *shaeroplast*.

Pada hasil elektroforesis gel agarosa (Gambar 6) menunjukkan bahwa migrasi pita plasmid pGEM-T yang berukuran 3,0 kb sama dengan pita pada plasmid hasil isolasi koloni pada lajur 9 dan 12, sedangkan migrasi pita koloni pada lajur 2,3,4,5,6,7,8,10,dan 11 lebih lambat daripada koloni pada lajur 9 dan 12. Hal ini mengindikasikan bahwa koloni tersebut memiliki pasang basa yang lebih besar dan merupakan koloni yang mengandung plasmid rekombinan pGEMT-*baqA* yang berukuran sekitar 4,5 kb. Pada elektroforesis gel agarosa hasil isolasi dengan metode *boiling lysis* terlihat masih ada RNA pada sisi bawah gel, hal ini menunjukkan bahwa plasmid rekombinan yang diperoleh belum murni.



**Gambar 6.**Elektroforegram hasil isolasi plasmid (metode *boiling lysis*) transforman *E. coli* TOP10 pGEM-T-*baqA*. Lajur 1 adalah penanda DNA ladder 1 kb; lajur 2-11, koloni transforman putih nomor 1,3,5,6,7,8,9,10,11,12; lajur 12, koloni transforman biru.

Pada elektroforesis hasil isolasi plasmid rekombinan dengan menggunakan metode *Biobasic Plasmid DNA Miniprep Kit* tidak terlihat adanya RNA pada sisi bawah gel karena pada kit tersebut telah ditambahkan RNase. Konsentrasi DNA plasmid rekombinan pGEMT-*baqA* dapat dihitung berdasarkan intensitas warna DNA. Konsentrasi DNA transforman putih (lajur 2 dan 4) memiliki konsentrasi sekitar 105 ng/  $\mu$ L dan konsentrasi DNA transforman putih (lajur 3) adalah sekitar 140 ng/ $\mu$ L (Gambar 7).

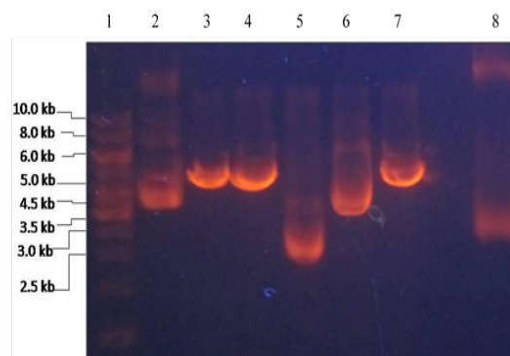


**Gambar 7.** Elektroforegram hasil isolasi plasmid rekombinan (metode *Biobasic Plasmid DNA Minipret Kit*). Lajur 1, penanda DNA ladder 1 kb; lajur 2-4 adalah transforman putih dengan berturut-turut koloni nomor 8,9,dan 12 yang mengandung plasmid rekombinan pGEMT-baqA.

#### Analisis Restriksi pGEMT-*baqA* dengan *Bgl*II

Untuk menentukan adanya fragmen *baqA* pada plasmid rekombinan, maka plasmid pGEM-T-*baqA* dipotong dengan enzim restriksi *Bgl*II yang mengenali urutan nukleotida A↓GATCT. Pemotongan plasmid rekombinan pGEMT-*baqA* dengan *Bgl*II menghasilkan satu fragmen berukuran ~4,5 kb yang merupakan hasil ligasi dari fragmen *baqA* berukuran ~1,5 kb dan plasmid pGEM-T berukuran 3,0 kb.

Elektroforegram pada Gambar 8 menunjukkan hasil pemotongan 6 transforman putih yang dipotong dengan enzim restriksi *Bgl*II. Pemotongan plasmid rekombinan yang diisolasi dari koloni transforman putih (lajur 3,4, dan 7) menghasilkan pita yang berukuran 4,5 kb yang sesuai dengan ukuran yang diharapkan. Koloni transforman putih (lajur 2,5, dan 6) menghasilkan pita yang berukuran 3,0 kb yang mengindikasikan bahwa koloni tersebut tidak mengandung DNA sisipan. Pemotongan koloni transforman biru (lajur 8) menghasilkan ukuran pita DNA sebesar 3,0 kb yang sesuai dengan ukuran pGEM-T.



**Gambar 8.** Elektroforegram plasmid yang dipotong dengan *Bgl*II. Lajur 1, DNA ladder 1kb; lajur 2,3,4,5,6,dan 7 adalah plasmid yang diisolasi dari transforman nomor 7,8,9,10,11,12; lajur 8, plasmid yang diisolasi dari transforman biru.

#### Penentuan Urutan Nukleotida *baqA*

Urutan nukleotida gen *baqA* ditentukan dengan metode *dideoxy* Sanger menggunakan *dye terminator*. Penentuan urutan nukleotida dilakukan menggunakan primer T7 sebagai primer *forward* (5'-AATACGACTCACTATAG-3') dan primer Sp6 sebagai primer *reverse* (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'). Primer *forward* (T7) dapat membaca urutan nukleotida sebanyak 900 bp dan primer *reverse* (SP6) dapat membaca urutan nukleotida sebanyak 900 bp,

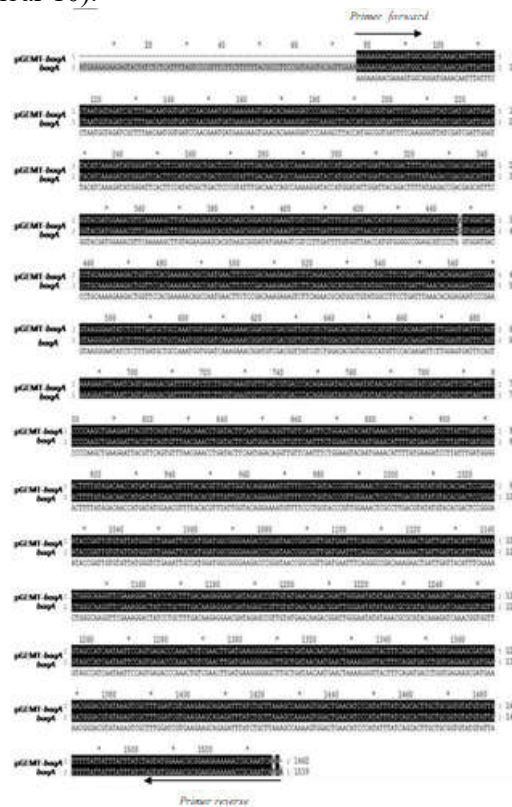
sehingga dari penggabungan urutan nukleotida tersebut menghasilkan urutan nukleotida dari gen *baqA* yang berukuran 1474 bp (Gambar 9).

```

AGATCTAAGAAGAACGAAAGTGGCAGGATGAAACAAATTTATCTCTAAGGTAGATCGCTTAAACAATGG 70
TGATCCAAACAAATGATAAAGAGTGAACCAAAGGATCCCAAGGCTTACCATGGCGGTGATTCGAAGGG 140
GTTATCGATCGATTGGATTACATCAAAGATATGGGATTCACCTTCATATGGTGACTCCCGTATTGACA 210
ACCAGCCAAAAGGATACCATGGATATGGATTACGGACTTTTATAAGCCGACGAGCATTCGGTACGAT 280
GGAACGTTCAAAAAGCTTGTAGAAGAACCAATAGCGGGATATGAAAGTCGCTTGTATTGTTGTT 350
AACCATGTGGGGCCGGACATCCCTGAGTGGATGACCTGCAAAAAGAGCTGTTCCACGAAAAACAGC 420
CAATGAACCTTCCGACAAAAGAACTTTCAGAACCCATGGCTGATGCGCTTCTCGATTAAACACAGA 490
GAATCCCGAAGTAAGGGAATATCTTTGATGCTGCCAAATGGTGGTCAAGAAACGGATGCGACGGT 560
TATCGTCTGGACACGGTGCCTCATGTTCCACAAGATTCTTGGAGTGTTCAGTAAAGAAAGTAAATCAG 630
TGAAGACGATTTTATCTTCTTGGTGAAGTGTGATGCTGACCCACAGAGGATAGCAGATATAACGA 700
TGTGGTATCGATTGATTCGTTAAATTTCCCAAAGCTGAGAAATACGTTTCAAGTTTTAAACAACCTGAT 770
ACTTCAATGGACAGGTTTCAATTTCTGGAAGTACAATGAAACATTTTAAAGAGATCTTATTGATGG 840
GGACTTTATAGACAACCATGATATGGAACGTTTACACGTTTATTGGTACAGGAAATGTTTCCCTGG 910
TACCCTTGGAAACTCGCTTACGTATATGTACACGACTCGGGAATACGATTGTATTATGGGCT 980
GAAATTCGCATGATGGCGGGAAAGCCGGATACCGCGGTTGATGAAATTCAGGCGCCACAAGAAC 1050
TGATTGATACATTTCAAACCTGGCAAGGTTGAAAGGACTATCTGCTTTGACAAAGGAGACGATAGA 1120
GCCGTTGTAGAACAGACGATTGGGAATATATAAACCGCATACAAGATCAACGGTGGTGTAGCC 1190
ATCAATAATCCAGTGACGCCAAACTGTCGAATTCGATGAGGGGAGCTTCTGATAAACAATGAACTAA 1260
AAGGTTTCTTTCAGATGACCTGGTGAAGCGATGAAACGGGCGTATAAAGTCTTGGATCGTGA 1330
AGAACGAGAGATTATCTGCTTAAAGCAAAAAGTGGACTGAACTCCATATTTATCAGCACTGCTGG 1400
GTGTGTATTATTTTATTATTATCTAGTATGAAACCGGAAAGAAAAACCGCAATCAAAGC 1470
ATGC 1474
    
```

Gambar 9. Urutan nukleotida gen *baqA*

Pada penjajaran urutan nukleotida dapat dilihat bahwa gen *baqA* yang diamplifikasi menunjukkan kesamaan dengan gen *baqA* yang telah diisolasi dari penelitian pendahulu. Adanya dua mutasi yang dihasilkan pada penjajaran nukleotida di atas diduga terjadi karena perbedaan proses amplifikasi dengan metode PCR (Gambar 10).



Gambar 10. Penjajaran urutan nukleotida gen *baqA* (no akses GenBank JN797599) hasil amplifikasi dan *baqA* cetakan

**KESIMPULAN**

1. Amplifikasi gen *baqA* dengan metode PCR menggunakan primer pMM-*baqA* f dan pMM-*baqA* r menghasilkan fragmen DNA berukuran 1,5 kb.
2. Plasmid rekombinan hasil ligasi pGEM-T dengan gen *baqA* berukuran 4,5 kb telah berhasil diperoleh.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Banks, W., and Greenwood, C.T. (1977). Mathematical models for the action of  $\alpha$ -amylase on amylose. *Carbohydrate Research*, **57**. 301–315.
- Hill, R. D., & McGregor, A. W. (1988). Advances in cereal science and technology. In Y. Pomeranz, St Paul, USA: AACC. **9**. 217–261
- Hrafnso'ttir, S., J. W. Nichols, and A. K. Menon. (1997). Transbilayer movement of fluorescent phospholipids in *Bacillus megaterium* membrane vesicles. *Biochemistry*. **36**. 4969–4978
- Kadziola, A., Abe, J., Syensson, B., and Haser, R. (1994). Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *Journal of Molecular Biology*. **239**. 104-121
- Kuriki, T., and Imanaka, T. (1999). The concept of alpha amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Jurnal of Bioscience and Bioengineering*. **87(5)**. 557-565
- Lin, L. L., Chyau, C. C., dan Hsu, W. H. (1998). Production and Properties of a Raw-Starch-Degrading Amylase from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23, *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **28**. 61–68
- Mishra, S., Behera, N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *Indian Journal of Chemistry*. **3326**
- Muralikrishna, G., Nirmala, M. (2005). Cereal  $\alpha$ -amylases- an overview. *Carbohydrate polymers*. **60**. 163-173
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Sing, D., dan Mohan, R., (2000), Advances in Microbial Amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **31**, 135–152
- Pedersen, S., Hendriksen, H. V., dan Bisgard-Frantzen, H. (1999). A Process for Textile Warp Sizing Using Enzymatically Modified Starches. *Patent Application WO*. **99**, 35325
- Puspasari, F., Nurachman, Z., Noer Saefuddin, A., Natalia, D. (2011). Characteristic of raw starch degrading  $\alpha$ -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 associated with soft coral *Simularia sp.*, *Starch-Starke*. **63**. 1-2.
- Tao, Y.P and Vary, P.S. (1992). Cloning and sequencing of the *spoIIA* operon of *Bacillus megaterium*. *Biochimie*. **74**. 695-704.
- Yu, T., Zeeman, S., Thorneycroft, D., Fulton, D., Dustan, H., Lue, W., Hegemann, B., Tung, S., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D., Wang, S., Smith, A., Chen, J., And Steven, S. (2005).  $\alpha$ -Amylase is not required for breakdown of Transitory starch in *Arabidopsis* Leaves. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**. 9773.
- Van der Maarel, M.J.E.C., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C. M., leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and application of starch converting enzymes of the amylase family, *Journal of Biotechnol.* **94**