

F/TPG/1992/065

#

KAJIAN TRANSFER DNA *Bacillus licheniformis* KE DALAM SEL *Escherichia coli* DENGAN PENGGUNAAN $CaCl_2$

Oleh
JUSUF
F 24. 0837



1 9 9 2
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
B O G O R

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Halaman ini adalah hak cipta milik IPB University dan tidak boleh disebarluaskan atau diperjualbelikan kembali.
1. Dilarang menyalin, mengutip, atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini tanpa izin tertulis dari IPB University.
2. Dilarang mengutip atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan komersial atau untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
3. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
4. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
5. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
6. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
7. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
8. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
9. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.
10. Dilarang menyalin atau menyalin sebagian atau seluruh isi dari dokumen ini untuk tujuan lain yang melanggar hukum.

IPB University

Jusuf. F 24. 0837. Kajian Transfer DNA *Bacillus licheniformis* ke dalam sel *Escherichia coli* dengan Penggunaan $CaCl_2$. Di bawah bimbingan Maggy T. Suhartono.

RINGKASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari kemungkinan keberhasilan transformasi DNA antara spesies bakteri yang berbeda dengan menggunakan metoda pembentukan spheroplas oleh $CaCl_2$, yaitu dengan menggunakan *Bacillus licheniformis* sebagai donor DNA dan *Escherichia coli* sebagai sel inang. Selain itu juga bertujuan untuk memperoleh sel hasil transformasi DNA yang mempunyai aktivitas proteolitik yang tinggi.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan meliputi isolasi DNA dari *Bacillus licheniformis* dan karakterisasi DNA yang diperoleh. DNA dari *Bacillus licheniformis* diperoleh dengan terlebih dahulu memecah dinding sel bakteri dengan menggunakan SDS 25% dan sonikasi. DNA yang tercampur dengan komponen-komponen lainnya diekstrak dengan menggunakan pelarut-pelarut organik yaitu kloroform:isoamilalkohol (24:1). Karakterisasi DNA yang diperoleh dilakukan dengan metoda karakterisasi secara spektrofotometri dimana DNA dilarutkan dalam buffer potasium fosfat dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 200 - 300 nm juga karakterisasi dengan menggu



nakan Etidium Bromida, yaitu DNA dilarutkan dalam larutan Etidium Bromida kemudian dibandingkan fluoresensinya di bawah sinar ultra violet.

Pembentukan spheroplas dari sel inang dilakukan untuk memperoleh sel yang kompeten untuk transformasi DNA yaitu dengan memperlakukan sel inang tersebut dengan larutan hipotonik $CaCl_2$ pada suhu rendah. Penyerapan DNA oleh sel inang yang kompeten diinduksi dengan menggunakan kejutan panas.

Dari penelitian ini didapatkan dua jenis sel hasil transformasi, TMJ 1 dan TMJ 2. TMJ 1 mempunyai sifat-sifat menghidrolisa kasein, gelatin dan pati, menghasilkan asetilmetil karbinol dan menunjukkan hasil uji metil merah negatif. Hasil pengujian tersebut menunjukkan sifat-sifat yang sama dengan *Bacillus licheniformis*. TMJ 2 mempunyai sifat-sifat menghidrolisa kasein, gelatin dan pati tetapi tidak menghasilkan asetilmetil karbinol serta menunjukkan hasil uji metil merah positif. Sedangkan sel *Escherichia coli* menunjukkan sifat-sifat tidak menghidrolisa kasein, gelatin dan pati, tidak menghasilkan asetilmetil karbinol serta menunjukkan hasil uji metil merah positif. Dengan demikian TMJ 2 ini menunjukkan sifat-sifat diantara kedua induknya. Sel-sel hasil



transformasi juga memperlihatkan morfologi dan ukuran sel yang berbeda dengan *Bacillus licheniformis* dan *Escherichia coli*

1. Untuk memenuhi Undang-undang
2. Yang mengatur sebagian dari seluruh karya yang telah dilaksanakan dan dipublikasikan kembali
3. Perbaikan buku atau keanggotaan perindukan, penulisan, penulisan karya ilmiah, penulisan laporan, penulisan kritik atau penerjemahan atau terjemahan
4. Mengetahui tidak menyetujui keanggotaan yang telah IPB University
5. Mengetahui menyetujui dan menyetujui sebagai berikut karya yang telah dipublikasikan sebagai karya IPB University

**KAJIAN TRANSFER DNA *Bacillus licheniformis* KE DALAM
SEL *Escherichia coli* DENGAN PENGGUNAAN CaCl₂**

**OLEH
JUSUF
F 24 0837**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada JURUSAN TEKNOLOGI PANGAN DAN GIZI
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor**

1992

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR**

INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

KAJIAN TRANSFER DNA *Bacillus licheniformis* KE DALAM
SEL *Eschericia coli* DENGAN PENGGUNAAN $CaCl_2$

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada JURUSAN TEKNOLOGI PANGAN DAN GIZI
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor

OLEH
JUSUF
F 24 0837

Dilahirkan pada tanggal 1 Oktober 1968
di Pematang Siantar
Tanggal lulus : 20 Desember 1991

Bogor, 14 Jan 1992

Disetujui oleh :



DR. Ir. Maggy T. Suhartono

Dosen Pembimbing



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa karena atas kasih dan karunia-Nya telah dapat terselesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.

Terselesainya penelitian dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Untuk itu, izinkanlah penulis untuk menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Ir. Maggy T. Suhartono sebagai Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak meluangkan waktunya dan memberikan saran, masukan dan bimbingan yang sangat berharga kepada penulis.
2. Ibu Dr. Ir. Srikandi Fardiaz, M.Sc dan Bapak Dr. Ir. Jimmy Hariantono, M.Sc yang sebagai Dosen Penguji yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk menguji penulis.
3. Ibunda dan Ayahanda tercinta yang telah mendoakan dan memberi dorongan baik selama penelitian dan penyelesaian skripsi ini.
4. Adik-adikku, Om dan Tante yang tercinta yang telah banyak memberikan bantuan dan dorongannya.



5. Bapak dr. Andi R. Jennie yang telah sangat banyak membantu dan memberikan dorongannya kepada penulis selama ini.
6. Terima kasih yang khusus penulis sampaikan kepada Kris yang telah memberikan bantuan, dorongan, doa dan perhatian yang begitu besar kepada penulis.
7. Teman-teman sekost dan teman-teman sepenelitian atas perhatian dan pengertian yang diberikan, dan kepada semua pihak lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Bogor, Januari 1992

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
I. PENDAHULUAN.....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. <i>Bacillus licheniformis</i>	4
1. Tinjauan Umum.....	4
2. Enzim dari <i>Bacillus licheniformis</i> ...	6
B. <i>Eschericia coli</i>	8
C. ASAM DEOKSIRIBONUKLEAT (DNA).....	11
1. Fungsi dan Struktur DNA.....	11
a. Replikasi DNA.....	13
b. Transkripsi.....	14
2. Isolasi DNA pada Bakteri.....	16
D. TRANSFORMASI DNA.....	18
1. Pengertian Transformasi dan Kompe- tensi.....	18
2. Efisiensi Transformasi.....	21
3. Proses Transformasi.....	24
III. BAHAN DAN METODA.....	27
A. BAHAN DAN ALAT.....	27
B. METODA PENELITIAN.....	27
1. Penelitian Pendahuluan.....	28

Hal. 1 dari 100 halaman | 10/10/2023 10:00:00 AM | IPB University

a.	Persiapan Sel Donor.....	28
b.	Isolasi DNA Sel Donor.....	29
c.	Karakterisasi DNA.....	31
2.	Penelitian Utama.....	32
a.	Persiapan Sel Inang.....	32
b.	Transformasi DNA ke Dalam Sel Inang.....	33
c.	Analisa Sifat-sifat Mikroba.....	34
c.1.	Uji proteolitik (Bergmeyer).....	34
c.2.	Uji proteolitik.....	37
c.3.	Uji hidrolisa pati.....	37
c.4.	Uji Voges-Proskauer.....	37
c.5.	Uji hidrolisa gelatin.....	38
c.6.	Uji metil merah.....	38
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
A.	PENELITIAN PENDAHULUAN.....	39
1.	Produksi Sel Donor.....	39
2.	Isolasi DNA.....	40
3.	Karakterisasi DNA.....	43
a.	Karakterisasi DNA dengan Spektrofotometer.....	43
b.	Karakterisasi DNA dengan Etidium Bromida.....	46
B.	PENELITIAN UTAMA.....	49
1.	Transformasi DNA.....	49
2.	Seleksi Sel <i>Eschericia coli</i> Hasil Transformasi.....	53
3.	Pengamatan Morfologi Sel.....	54

Halaman ini milik IPB University
 1. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 2. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 3. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 4. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 5. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 6. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 7. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 8. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 9. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University
 10. Untuk lebih jelasnya mengenai hal-hal yang berkaitan dengan hal-hal yang tertera di atas, silakan kunjungi website resmi IPB University

4. Uji Proteolitik.....	57
5. Uji Hidrolisa Pati.....	60
6. Uji Hidrolisa Gelatin.....	64
7. Uji Voges Proskauer.....	67
8. Uji Metil Merah.....	70
9. Uji Aktivitas Protease dengan metoda Bergmeyer.....	71
10. Integrasi DNA Donor dengan DNA Sel Inang.....	73
11. Ekspresi Genetika <i>Bacillus licheniformis</i> dalam sel <i>Eschericia coli</i>	75
V. KESIMPULAN.....	78
VI. SARAN.....	80
DAFTAR PUSTAKA.....	81
LAMPIRAN.....	84

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel	1. Kisaran suhu pertumbuhan bakteri...	10
Tabel	2. Pengukuran aktivitas protease.....	36
Tabel	3. Absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm serta rasio A_{260}/A_{280}	45
Tabel	4. Uji metil merah terhadap sel hasil transformasi, <i>Bacillus licheniformis</i> dan <i>Eschericia coli</i>	71
Tabel	5. Pengukuran aktivitas protease pada media Nutrient Broth. Inkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C.....	72
Tabel	6. Perbandingan sel hasil transformasi dengan kedua induknya.....	75
Tabel	7. Perbandingan sel hasil transformasi dengan kedua induknya (Sudding, 1990)	77

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur DNA.....	15
Gambar 2. Skema masuknya DNA asing ke dalam suatu sel dan berekombinasi dengan DNA sel inang.....	26
Gambar 3. Tahapan penyiapan mikroba.....	28
Gambar 4. DNA <i>Bacillus licheniformis</i>	42
Gambar 5. Larutan campuran DNA dengan Etidium Bromida.....	47
Gambar 6. Larutan Etidium Bromida tanpa DNA.....	48
Gambar 7. Sel <i>Bacillus licheniformis</i> dengan pembesaran 1000 kali.....	55
Gambar 8. Sel <i>Eschericia coli</i> dengan pembesaran 1000 kali.....	55
Gambar 9. Sel hasil transformasi (TMJ 1) dengan pembesaran 1000 kali.....	56
Gambar 10. Sel TMJ 2 dengan pembesaran 1000 kali..	56
Gambar 11. Uji proteolitik <i>Bacillus licheniformis</i> dan <i>E. coli</i> dibandingkan dengan kontrol	59
Gambar 12. Uji proteolitik TMJ 1 yang positif dibandingkan kontrol.....	59
Gambar 13. Uji proteolitik TMJ 2 yang positif dibandingkan dengan kontrol.....	60
Gambar 14. <i>Bacillus licheniformis</i> yang menghidrolisa pati.....	62
Gambar 15. <i>Eschericia coli</i> yang tidak mampu menghidrolisa pati.	62
Gambar 16. Uji hidrolisa pati positif pada sel TMJ 1.....	63

Gambar 17.	Uji hidrolisa pati positif oleh sel TMJ 2.....	63
Gambar 18.	Hasil uji hidrolisa gelatin <i>B. licheniformis</i> dan <i>E. coli</i> dibandingkan kontrol.....	65
Gambar 19.	Sel TMJ 1 yang menghidrolisa gelatin dibandingkan dengan kontrol.....	66
Gambar 20.	Sel TMJ 2 yang menghidrolisa gelatin dibandingkan dengan kontrol	66
Gambar 21.	Perbandingan hasil uji VP yang positif pada <i>B. licheniformis</i> dengan uji negatif pada <i>E. coli</i>	68
Gambar 22.	Uji Voges Proskauer positif pada TMJ 1 dibandingkan dengan kedua induknya....	69
Gambar 23.	Uji Voges Proskauer negatif pada TMJ 2 dibandingkan dengan kedua induknya....	69

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1.	Metoda analisis enzim protease (Bergmeyer dan Grassl, 1983).....	84
Lampiran 2.	Media-media dan bahan-bahan kimia yang digunakan untuk isolasi DNA..	87
Lampiran 3.	Media-media dan bahan-bahan kimia untuk Transformasi DNA.....	89
Lampiran 4.	Media-media dan bahan-bahan kimia yang digunakan untuk uji sifat sel hasil transformasi dan kedua induknya.....	90

I. PENDAHULUAN

Salah satu bidang ilmu yang berkembang pesat pada beberapa dekade terakhir ini adalah bidang ilmu rekayasa genetika. Hal ini disebabkan karena dirasakan adanya sumbangan yang besar dari bidang ilmu ini terhadap kesejahteraan kehidupan umat manusia misalnya dalam bidang kedokteran, pertanian, industri, pengolahan limbah dan lain-lain.

Ilmu rekayasa genetika itu sendiri merupakan bidang ilmu interdisiplin yang melibatkan pemanfaatan ilmu mikrobiologi, biokimia, kimia, teknologi kimia dan lain-lain. Salah satu penerapan ilmu rekayasa genetika yang banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari ialah penggunaan mikroorganismenya untuk menghasilkan produk-produk tertentu atau membantu suatu proses produksi tertentu misalnya untuk menghasilkan antibiotika, enzim-enzim, asam-asam amino, dalam proses fermentasi, pendaaur ulangan limbah dan lain-lain.

Akan tetapi dalam penggunaan mikroorganismenya untuk suatu tujuan tertentu masih ditemukan banyak masalah terutama yang berhubungan dengan sifat mikroorganismenya itu sendiri. Masalah-masalah yang ditemukan antara lain:

1. Produksi suatu produk tertentu yang belum cukup efisien untuk dilakukan dalam skala industri.

2. Keterbatasan suatu mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk dari substrat tertentu.
3. Keterbatasan kemampuan suatu mikroorganisme untuk bertahan dalam kondisi tertentu yang diperlukan selama pengolahan.
4. Kesulitan teknis dalam pemeliharaan suatu mikroorganisme.
5. Dan lain-lain.

Untuk mengatasi masalah-masalah tersebut di atas maka telah dicoba berbagai metode manipulasi genetika yang bertujuan untuk mendapatkan suatu mikroorganisme yang sesuai dengan yang diharapkan. Metode-metode tersebut antara lain adalah:

1. Teknik transformasi yaitu teknik untuk memasukkan suatu DNA asing ke dalam suatu sel inang.
2. Teknik fusi protoplas yaitu teknik untuk menggabungkan sifat-sifat genetik dari suatu mikroorganisme melalui penggabungan protoplas.
3. Teknik mutasi yaitu teknik untuk merubah sifat genetik dari suatu mikroorganisme dengan menggunakan mutagen.

Selain itu masih banyak terdapat teknik-teknik lain dan masih terus bertambah seiring dengan perkembangan ilmu rekayasa genetika misalnya teknik rekombinasi gen, teknik konjugasi, transduksi dan lain-lain. Semua teknik ini telah lama dan sangat banyak dipelajari terutama di negara-negara maju karena potensi yang besar dari ilmu

rekayasa genetika ini untuk lebih dikembangkan lagi di kemudian hari menjadi sesuatu yang berharga. Di Indonesia sendiri bidang ilmu ini belum begitu banyak dipelajari karena hambatan teknologi maupun ekonomis. Untuk mengejar ketinggalan kita dalam bidang ilmu inilah suatu alasan yang kuat maka dilakukan penelitian mengenai teknik transformasi ini mengingat kemungkinan akan perkembangannya di masa depan yang sangat besar.

Adapun tujuan dari percobaan ini adalah untuk mempelajari aplikasi dari teknik transformasi gen *Bacillus licheniformis* ke dalam sel *Eschericia coli*, mengamati ekspresi dari sel yang berhasil ditransformasi khususnya aktivitas protease ekstraselularnya, dan juga faktor-faktor yang berperan dalam teknik transformasi ini. Dengan demikian diharapkan dalam penelitian-penelitian selanjutnya dapat dilakukan manipulasi genetik dari suatu mikroorganism sehingga akhirnya dapat diperoleh suatu mikroorganism dengan sifat-sifat tertentu yang diinginkan.



II. TINJAUAN PUSTAKA

A. *Bacillus licheniformis*

1. Tinjauan umum

Bacillus licheniformis termasuk ke dalam divisi Protophyta, kelas Schizomycetes, ordo Eubacteriales, famili Bacillaceae serta genus *Bacillus* (Clifton, 1959).

Menurut Brock (1974), mikroba dari genus *Bacillus* dapat dengan mudah diisolasi dari tanah atau udara. *Bacillus* umumnya dapat tumbuh dengan baik pada media sintetik yang mengandung gula, asam organik, alkohol dan lain-lain sebagai sumber karbon utama dan amonium sebagai sumber nitrogen dan beberapa diantaranya memerlukan vitamin. Banyak diantara genus *Bacillus* yang memproduksi enzim hidrolitik ekstraselular yang dapat memecah polisakarida, asam nukleat dan lemak yang menyebabkan organisme ini dapat menggunakan produk-produk tersebut sebagai sumber karbon dan energi. Spesies *B. licheniformis* mempunyai tiga mekanisme yang berbeda dalam metabolisme energinya yaitu respirasi aerobik, denitrifikasi dan fermentasi (Stanier et al., 1963).

1. Untuk meningkatkan pemahaman dan keterampilan mahasiswa dalam memahami konsep-konsep dasar mikrobiologi, terutama mengenai struktur, fisiologi, pertumbuhan, dan metabolisme mikroorganisme. 2. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam menganalisis dan menginterpretasikan hasil-hasil penelitian mikrobiologi. 3. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam mengkomunikasikan hasil-hasil penelitian mikrobiologi. 4. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam menerapkan konsep-konsep mikrobiologi dalam kehidupan sehari-hari. 5. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam mengidentifikasi mikroorganisme yang terlibat dalam berbagai proses mikrobiologi. 6. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam memahami peran mikroorganisme dalam berbagai aspek kehidupan. 7. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam memahami peran mikroorganisme dalam berbagai aspek kehidupan. 8. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam memahami peran mikroorganisme dalam berbagai aspek kehidupan. 9. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam memahami peran mikroorganisme dalam berbagai aspek kehidupan. 10. Untuk meningkatkan kemampuan mahasiswa dalam memahami peran mikroorganisme dalam berbagai aspek kehidupan.

Bacillus licheniformis dikenal sebagai spesies dari spektrum *Bacillus subtilis*. Yang termasuk ke dalam spektrum ini adalah *B. pumilus*, *B. licheniformis* dan *B. subtilis*. Pengelompokan ini dikarenakan ketiga spesies ini mempunyai bentuk morfologis yang mirip dan beberapa sifat fisiologi yang juga mirip (Gordon, 1972).

Bakteri dari genus *Bacillus* adalah bakteri yang bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif, berbentuk batang dan mempunyai endospora refraktil. Dibandingkan dengan sel vegetatifnya, endospora lebih tahan terhadap panas, keadaan kering, disinfektan dan bahan destruktif lainnya dan mungkin dapat tetap bertahan hidup dalam kondisi yang ekstrim selama beberapa abad. *Bacillus licheniformis* merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang dengan panjang antara 1.5 u sampai 3.0 u dan lebar antara 0.6 - 0.8 u. Spora dari *Bacillus licheniformis* berbentuk silindris atau elips dan terdapat pada sentral atau para-sentral dari sel penghasil spora. *B. licheniformis* juga bersifat motil dan memberi hasil positif pada uji katalase. Bakteri ini masih dapat tumbuh pada suhu 50°C serta dalam larutan NaCl 7%. Sifat-sifat lainnya adalah memberikan hasil positif pada uji Voges-Proskauer,

dapat menyebabkan dekomposisi kasein, dapat menggunakan asam sitrat dan propionat, dapat mereduksi NO_3 menjadi NO_2 dan dapat menghidrolisa pati. *Bacillus licheniformis* dapat tumbuh pada suhu maksimum $50 - 55^\circ\text{C}$ dan pada suhu minimum 15°C (Gordon, 1972). Sedangkan suhu pertumbuhan yang biasanya digunakan untuk menghasilkan enzim protease adalah suhu 37°C (Hanlon et al., 1982).

2. Enzim dari *Bacillus licheniformis*

Dubnau (1985) menyatakan bakteri *Bacillus* banyak digunakan secara komersial untuk menghasilkan enzim hidrolitik yang relatif stabil seperti amilase, protease, glucanase dan lipase. Dahulu, galur yang banyak digunakan untuk menghasilkan enzim-enzim ini adalah *Bacillus subtilis* akan tetapi dalam beberapa dekade terakhir ini telah banyak digantikan oleh *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* dan *Bacillus amyloliquefaciens* karena kemampuannya yang tinggi dan biasanya menghasilkan enzim-enzim yang stabil pada suhu tinggi, terutama dengan penambahan ion Ca^{2+} .

Salah satu enzim yang dihasilkan dalam jumlah tinggi dan mempunyai peranan yang sangat penting dari bakteri *Bacillus licheniformis* adalah enzim protease.

Jenis enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* adalah enzim ekstraseluler yang tergolong proteinase serin alkali (Young dan Mandelstam, 1980), yang mana enzim ini merupakan protease yang sangat besar penggunaannya dalam industri secara komersial. Enzim protease yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* dikenal dengan nama Subtilisin Carlsberg. Enzim ini pertama sekali diisolasi oleh Guntelberg dan Ottensen pada tahun 1952 (Ward, 1983). Fogarty dan Kelly (1979) menyatakan bahwa bakteri *Bacillus licheniformis* menghasilkan dua jenis protease, yang satu aktif pada pH netral sedang yang lainnya pada pH alkali.

Untuk mengidentifikasi bahwa suatu mikroba menghasilkan enzim proteolitik ekstraseluler terdapat berbagai cara. Salah satu pendekatan yang biasa digunakan adalah dengan melihat luas daerah difusi hasil-hasil ekstraseluler mikroba pada media agar, yang kadang berupa daerah bening di sekeliling koloni (Ward, 1983). Akan tetapi tidak selamanya terdapat hubungan yang langsung antara diameter dari daerah yang bening di sekeliling koloni mikroba penghasil protease pada media agar dengan kemampuannya dalam menghasilkan protease dengan menggunakan kultur terendam (Aunstrup, 1979).

Ward (1983) mengutip Smith dan kawan-kawan menyatakan bahwa meskipun *Bacillus licheniformis* mempunyai kemampuan yang sangat baik dalam menghasilkan protease dengan menggunakan kultur terendam, hanya memperlihatkan daerah hidrolisis kasein yang sangat kecil.

B. *Escherichia coli*

Menurut Bisset (1963), *Escherichia coli* adalah salah satu jenis bakteri yang paling banyak dipelajari baik secara umum maupun genetis. *Escherichia coli* termasuk ke dalam :

Divisio	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Sub-ordo	: Bacteriineae
Famili ¹	: Bacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>

Genus *Escherichia* bersama-sama dengan beberapa bakteri lainnya dalam famili Bacteriaceae sering disebut sebagai bakteri koliform. Jenis *Escherichia* hanya mempunyai satu species yaitu *Escherichia coli* dan disebut koliform fekal karena ditemukan di dalam saluran usus hewan dan manusia (Fardiaz, 1988). Secara garis besarnya bakteri dalam famili ini dapat dibagi atas dua golongan yaitu : yang dapat menfermentasi campuran asam, contohnya *E. coli* dan yang dapat

menfermentasi butylene glycol contohnya *Enterobacter aerogenes* (Stanier, 1963).

Buchanan dan Gibbons (1974) menyatakan bahwa *Escherichia coli* bersifat gram negatif, motil ataupun non motil dan berbentuk ellips memanjang dalam keadaan berpasangan ataupun berantai pendek. Tidak berspora dan biasanya tidak berkapsul. Bakteri ini dapat menfermentasi glukosa dan laktosa dan menghasilkan asam dan gas serta CO₂ dan H₂ dalam rasio yang seimbang. *Escherichia coli* mempunyai ukuran yang bervariasi tergantung dari strain dengan ukuran rata-rata 0.5 x 2.0 μm (Brock, 1974).

Escherichia coli mempunyai beberapa sifat lain yaitu menghasilkan indole, tidak menghasilkan asetil metil karbinol serta dapat menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon untuk pertumbuhannya. Dalam fermentasi, *Escherichia coli* dapat menurunkan pH medium yang mengandung 0.5% glukosa hingga mencapai pH 5.0 atau kurang (Jenie dan Fardiaz, 1988).

Singleton (1980), menyatakan bahwa sel *Escherichia coli* biasanya satu-satu ataupun berpasangan dan dapat tumbuh dengan baik pada basal media, misalnya "Nutrient Agar". Pada NA (inkubasi 24 jam, 37°C) *Escherichia coli* secara spesifik

berbentuk koloni licin, tidak berwarna, bulat dan agak cembung dengan diameter 1-3 mm.

Menurut Stanier (1963), total kisaran suhu bagi pertumbuhan mikroorganisme adalah dari $-5 - 80^{\circ}\text{C}$. Walaupun demikian kisaran suhu untuk pertumbuhan bagi suatu mikroorganisme spesifik lebih kecil. *Escherichia coli* yang termasuk bakteri mesofilik mempunyai temperatur minimum untuk pertumbuhan $10 - 12^{\circ}\text{C}$, maksimum 50°C dan optimum pada $37 - 45^{\circ}\text{C}$.

Tabel 1. Kisaran suhu pertumbuhan bakteri ¹

Tipe organisme	min	suhu ($^{\circ}\text{C}$)	
		optimum	maks
Psikrofilik	$-5 - 0$	$6.5 - 7.5$	$8 - 10$
Mesofilik	$10 - 20$	$20 - 40$	$40 - 45$
Termofilik	$25 - 45$	$45 - 60$	$60 - 80$

¹ Stanier (1963)

C. Asam Deoksiribonukleat (DNA)

1. Fungsi dan Struktur DNA

DNA adalah salah satu senyawa asam nukleat yang berfungsi untuk menyimpan, mereplikasi dan mentranskripsi sifat-sifat informasi genetika yang terdapat dalam sel (Gardner, 1984).

Menurut Volk (1988), DNA terdiri dari satuan-satuan basa-basa purin (adenin dan guanin) dan basa-basa pirimidin (timin dan sitosin), deoksiribosa dan fosfat. Komponen-komponen ini secara bersama-sama berikatan membentuk satuan nukleotida. Satuan-satuan nukleotida dihubungkan oleh ikatan fosfodiester membentuk rantai polinukleotida. Basa-basa dari tiap-tiap nukleotida dalam satu untai berpasangan dengan basa-basa dari untai lainnya oleh suatu ikatan hidrogen yang lemah membentuk untai ganda. Ikatan hidrogen ini sangat lemah dibandingkan dengan ikatan fosfodiester sehingga ikatan hidrogen mudah rusak dan terjadi DNA terdenaturasi. Pasangan basa pada DNA ini sedemikian rupa sehingga basa adenin selalu berpasangan dengan timin dan guanin dengan sitosin.

Wirahadikusumah (1983) menyatakan bahwa DNA suatu spesies atau organisme tertentu mempunyai perbandingan dan urutan yang khas untuk keempat unit mononukleo-

tidanya. Juga berat molekulnya berbeda untuk tiap macam organisme. Sel prokariotik yang mengandung hanya satu kromosom mempunyai DNA yang merupakan makromolekul tunggal dengan berat molekul sekitar 2×10^9 .

DNA disimpan dalam suatu organ nukleus (inti sel) yang disebut dengan kromosom. Pada sel eukariot inti sel dikelilingi oleh suatu membran inti sedangkan pada sel prokariot tidak dikelilingi oleh membran sehingga kromosom pada sel prokariot letaknya bebas di dalam sitoplasma dan berbentuk seperti benang. DNA ini berukuran sangat panjang dibandingkan dengan ukuran selnya sendiri, oleh karena itu setiap kromosom terdiri dari satu molekul DNA yang dilipat-lipat dengan sangat padat sehingga kira-kira menjadi 10% dari isi selnya. Pada beberapa bakteri juga ditemukan adanya DNA yang terdapat di luar kromosom yang disebut dengan plasmid (Fardiaz, 1988).

Darnel (1986) mengatakan DNA merupakan pembawa informasi genetika, artinya instruksi tentang fungsi-fungsi biologis yang dimiliki oleh suatu mikroorganisme yang dapat diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Informasi genetika itu meliputi semua informasi yang digunakan untuk mengarahkan

sintesa asam-asam nukleat dan protein dalam sel. Proses sintesa protein dan asam-asam nukleat berlangsung melalui tahap-tahap sebagai berikut (Fardiaz, 1988) :

	replikasi				
DNA	trans- kripsi	RNA	trans- lasi	polipeptida	perpan- jangan protein

a. Replikasi DNA

DNA merupakan untai ganda yang terjadi karena adanya perpasangan basa-basa yang sesuai dari tiap-tiap satuan nukleotida pada setiap untai. Sewaktu proses replikasi, dua untai DNA ini akan berpisah pada tempat dimana untai yang baru akan terbentuk. Pada akhir proses replikasi akan diperoleh dua untai ganda yang baru, dimana masing-masing mempunyai susunan basa-basa yang komplementer terdapat untai yang asli. Karena pada replikasi ini untai ganda yang terbentuk terdiri dari satu untai yang baru dan satu untai yang lama maka proses replikasi ini disebut replikasi semikonservatif (Sudding, 1990 dan Fardiaz, 1988).

b. Transkripsi

Transkripsi adalah proses ekspresi gen dari DNA membentuk RNA yang kemudian akan membentuk protein. Dalam hal struktur RNA adalah sama dengan DNA, namun satuan gulanya adalah ribosa dan basa timin pada DNA diganti dengan urasil pada RNA. Tahap dimana protein disintesa dari RNA adalah tahap yang sangat kompleks dan memerlukan tiga jenis RNA yaitu mRNA, tRNA dan rRNA. Tahap awal dari proses ini adalah terbentuknya mRNA yang bersifat komplementer dari salah satu untai DNA. Kemudian tRNA akan mengikat asam amino yang spesifik terhadapnya, proses ini memerlukan energi dan enzim aktifasi. Tahap kedua adalah rRNA akan bergerak sepanjang untai mRNA sebanyak 1 kodon setiap kali dan setiap 3 kodon tRNA akan membawa asam amino yang sesuai yang ditentukan oleh anti-kodon pada sisi lain dari tRNA. Dengan demikian akan terbentuk suatu protein yang spesifik yang terbentuk dari mulai dari asam amino terminal N sampai terminal C (Fardiaz, 1988).

2. Isolasi DNA pada Bakteri

Salah satu tahap utama dalam manipulasi DNA melibatkan isolasi DNA baik DNA donor maupun DNA yang akan dimanipulasi. DNA tidak terdapat dalam bentuk molekul bebas di dalam sel akan tetapi dalam bentuk campuran yang kompleks antara DNA, RNA dan protein. Secara umum, tahap-tahap dasar untuk mendapatkan DNA yang murni adalah sebagai berikut : (1) penglepasan DNA yang larut dan berberat molekul tinggi dari dinding-dinding dan membran sel yang telah dihancurkan; (2) disosiasi kompleks DNA-protein dengan cara denaturasi atau proteolisis; (3) pemisahan DNA dari makromolekul-makromolekul lainnya (Rodriguez dan Tait, 1988) dan (4) pengrusakan enzim-enzim degradatif yang banyak terbentuk selama terjadinya penghancuran sel bakteri (Clark dan Switzer, 1977).

Dalam memilih metoda isolasi DNA dari golongan mikroba perlu mempertimbangkan keragaman mahluk dalam hal kerentanan dinding selnya terhadap metode pemecahan, kandungan polisakarida mikroba dan ikatan DNA dengan protein di dalam sel (Suhartono, 1990).

Untuk mendapatkan DNA, pertama-tama dinding sel harus dipecah baik dengan perlakuan fisis maupun kimia. Perlakuan kimia meliputi penambahan senyawa perusak dinding sel seperti enzim lisozim, selulase

atau hemiselulase dan sodium lauril sulfat. Sedangkan perlakuan fisis meliputi homogenisasi, sonikasi dan pemanasan-thawing (Suhartono, 1990). Proses pemecahan dinding sel bakteri gram negatif yang mempunyai dinding sel yang lebih tipis dibandingkan dengan bakteri gram positif dapat dilakukan hanya dengan menggunakan sodium lauril sulfat. Sedangkan bakteri gram positif memerlukan lisozim untuk lisis dinding selnya karena lisozim dapat menguraikan ikatan pada peptidoglikan yang banyak terdapat pada dinding sel bakteri gram positif. Pemecahan dinding sel ini kemudian disempurnakan dengan penambahan deterjen sodium lauril sulfat, penambahan SDS ini juga mempunyai fungsi merusak aktivitas enzimatis yang ada pada sel karena kemampuannya untuk mendenaturasi protein (Clark dan Switzer, 1977).

Tahap selanjutnya setelah dilakukan pemecahan dinding sel ialah pemurnian DNA dari campuran senyawa-senyawa lainnya. Tahap ini merupakan tahap yang sangat penting di dalam penggunaan DNA selanjutnya (Suhartono, 1990).

Rodriguez (1988) dan Clark (1977) menyatakan setelah lisis dinding sel, larutan diberi perlakuan dengan senyawa pengkelat seperti EDTA yang berfungsi menghambat kerja enzim-enzim nuklease dengan cara mengkelat ion-ion bivalen yang diperlukan untuk akti-

vititas enzim-enzim ini. Larutan dapat juga ditambahkan ribonuklease pankreatik untuk menghidrolisa RNA dan protease untuk memecah protein. Selanjutnya larutan ditambahkan ion perklorat untuk memisahkan protein dari DNA. Sisa-sisa protein dan oligopeptida diekstrak dengan menggunakan larutan organik, misalnya fenol atau campuran fenol dan kloroform. Kemudian DNA yang ada pada dalam larutan dapat dililit setelah diendapkan dengan etanol.

D. Transformasi DNA

1. Pengertian transformasi dan kompetensi

Singleton dan Stanbury (1978) menyatakan bahwa transformasi adalah sejenis transfer genetik dimana pecahan/fragmen DNA dari suatu sel (sel donor) diambil oleh sel yang lain (sel resipien) dan selanjutnya mengalami proses rekombinasi dengan kromosom dari sel penerima.

Transformasi diperkirakan merupakan suatu gejala alami dan banyak terjadi di alam selain yang sengaja dilakukan di laboratorium. Di alam, setelah suatu mikroorganisme mengalami lisis dan melepaskan DNA-nya ke lingkungan; DNA tersebut dapat menginfeksi sel sekitarnya dan mengakibatkan sel tersebut mengalami perubahan genetika (Volk, 1988).

DeBusk (1980), mengatakan walaupun transformasi terjadi secara alami tidaklah mudah dialami karena fenomena terjadinya transformasi hanya dapat diamati apabila fragmen DNA tertentu dari sel donor cukup berbeda nyata dari fragmen yang digantikan pada sel penerima dan terjadi perbedaan karakteristik dari sel yang berhasil ditransformasi.

Menurut DeRobertis (1975), pada peristiwa transformasi, fragmen DNA suatu sel dimasukkan ke dalam sel lainnya. Syarat DNA yang ditransfer adalah fragmennya harus besar dan untai ganda. Tetapi karena DNA itu panjang dan strukturnya tipis, sangat sulit mengisolasi molekul DNA yang lengkap dan tidak patah-patah (Stanier et.al, 1963). Prosedur-prosedur yang biasa digunakan untuk mengekstraksi DNA dari sel donor menyebabkan putusnya rantai DNA yang diisolasi. Pengukuran yang dilakukan menunjukkan rata-rata DNA yang ditransformasi terdiri dari fragmen-fragmen yang ekuivalen dengan sekitar 0.5% dari gen sel donor atau dengan kata lain gen-gen sel donor terpecah menjadi sekitar 200 potong gen-gen kecil (Levy et al., 1973). Adapun syarat sel penerima adalah sel itu harus kompeten artinya dalam keadaan mampu menerima DNA yang ditransfer ke dalamnya. Sifat dasar kompetensi suatu sel belum dipahami sepenuhnya, tetapi hal ini diperki-

rakan karena terjadinya sintesa protein-protein ekstraseluler yang disebut faktor kompetensi yang dapat menyebabkan terbentuknya sisi penerimaan untuk pengikatan DNA yang akan ditransfer.

Sifat kompetensi suatu sel dapat bervariasi secara radikal diantara berbagai macam mikroba bahkan diantara satu spesies tertentu. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa sifat kompetensi ini terjadi selama periode tertentu dalam siklus hidupnya. Sebagai contoh, sifat kompetensi dari *D. pneumoniae* terjadi segera setelah fase pertumbuhannya sedangkan pada genus *Bacillus* terjadi setelah akhir dari fase pertumbuhannya. Sifat kompetensi ini juga dipengaruhi oleh berbagai kondisi lingkungan, tipe media dan adanya senyawa kimia tertentu (Levy et al., 1973).

Berbagai bahan kimia dapat menginduksi sifat kompetensi suatu sel misalnya : CaCl_2 dan RbCl_2 . Sifat kompetensi suatu sel tidak bersifat laten. Biasanya keadaan ini hanya dapat dipertahankan 1 - 2 hari setelah suatu sel dibuat kompeten dengan prosedur yang sesuai. Untuk bakteri yang diberi penambahan CaCl_2 , kompetensi bakteri hanya dapat dipertahankan selama 1 - 2 hari pada suhu 4°C (Suhartono, 1990). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Kaplan dan Fornari (1982) juga menunjukkan bahwa konsentrasi buffer

Tris dan PEG-6000 juga dapat mempengaruhi kompetensi suatu sel dan efisiensi transformasi.

Penyerapan DNA ke dalam suatu sel yang kompeten dilakukan dengan pemberian pemanasan secara tiba-tiba ("heat shock"). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penyerapan DNA dengan cara demikian memberikan hasil transformasi yang lebih tinggi (Suhartono, 1990).

2. Efisiensi Transformasi

Efisiensi transformasi dinyatakan sebagai jumlah transforman per jumlah sel yang tetap hidup (Kaplan, 1982). Banyak faktor yang mempengaruhi efisiensi suatu transformasi misalnya : suhu, perlakuan dengan bahan kimia tertentu, lamanya perlakuan dan jumlah DNA yang ditambahkan (Malik, 1981).

Frekuensi terjadinya transformasi sangat kecil yaitu biasanya kurang dari 1 persen (DeBusk, 1980). Menurut Suhartono (1990), hanya sedikit sel yang dapat menyerap DNA dan hanya sedikit pula DNA yang nyata dapat ditransformasi. Kemungkinan terjadinya adalah 1 per 10.000 DNA.

Karena frekuensi terjadinya transformasi ini sangat kecil, maka dicoba perlakuan dengan bahan-bahan kimia tertentu dengan harapan dapat meningkatkan frekuensi terjadinya transformasi khususnya dalam

percobaan di laboratorium. Malik (1981), menyatakan bahwa ion Ca^{2+} dapat meningkatkan efisiensi transformasi pada *E. coli* dan adanya ion Mg^{2+} dapat melipatgandakan transforman yang diinduksi dengan Ca^{2+} , sedangkan Zn^{2+} dapat menghambat secara total terjadinya transformasi. Ion Ca^{2+} ini diperkirakan menyebabkan pembengkakan sel inang atau pembentukan spheroplast pada sel yang akan ditransformasi yang dapat meningkatkan efisiensi transformasi (Rodriguez, 1988). Suhu juga berperan dalam efisiensi transformasi. Dalam percobaan yang dilakukan Malik (1981) diperoleh bahwa efisiensi transformasi menurun bila dilakukan pada suhu di bawah 32°C sedangkan pada suhu di atas 37°C transformasi tidak terjadi sama sekali. Sehingga ia menyimpulkan bahwa suhu 32°C diperlukan untuk membantu pengikatan DNA pada permukaan sel yang diberi perlakuan dengan Ca^{2+} . Akan tetapi sampai saat ini tidak terdapat suatu kesepakatan pada suhu berapa transformasi harus dilakukan demikian juga faktor-faktor lain yang berhubungan dengan efisiensi transformasi. Sebagai contoh, Rodriguez dan Tait (1988) dan Bergmans et al. (1981) melakukan proses transformasi pada suhu 42°C sedangkan percobaan yang dilakukan Sudding (1990) pada suhu 37°C .

Menurut Stent (1978), transformasi akan bertambah jika DNA yang ditambahkan ke dalam sel yang kompeten bertambah sampai ke suatu titik kejenuhan dimana jumlah DNA yang ditambahkan justru menurunkan efisiensi transformasi. Sel resipien akan menjadi jenuh apabila setiap sel telah mengikat sekitar 10 potong DNA yang ditambahkan (Levy et al., 1973). Hal di atas terjadi karena: (1) adanya peristiwa "auto-inhibisi" DNA oleh DNA itu sendiri (2) hanya sebagian kecil dari sel penerima yang menjadi kompeten dan siap untuk ditransformasi. Faktor lainnya yang mempengaruhi efisiensi transformasi adalah:

- (1) Adanya enzim DNAase dimana enzim ini dapat menguraikan DNA sehingga menurunkan efisiensi transformasi (Tanooka, 1973).
- (2) Lama dan cara pemberian "heat shock" (Bergmans, 1981).
- (3) Viabilitias sel setelah perlakuan dengan bahan kimia dan penyimpanan (Rodriguez dan Tait, 1988).
- (4) Efisiensi pembentukan spheroplast pada sel inang (Rodriguez dan Tait, 1988).
- (5) Konformasi dan kemurnian DNA yang ditambahkan (Rodriguez dan Tait, 1988).

3. Proses Transformasi

Secara umum, untuk melakukan proses transformasi di laboratorium harus melalui beberapa tahap. Tahap-tahap tersebut meliputi isolasi DNA dari sel donor, pembentukan sel penerima yang kompeten dan diikuti dengan pemasukan DNA asing ke dalam sel yang kompeten tersebut (Sudding, 1990).

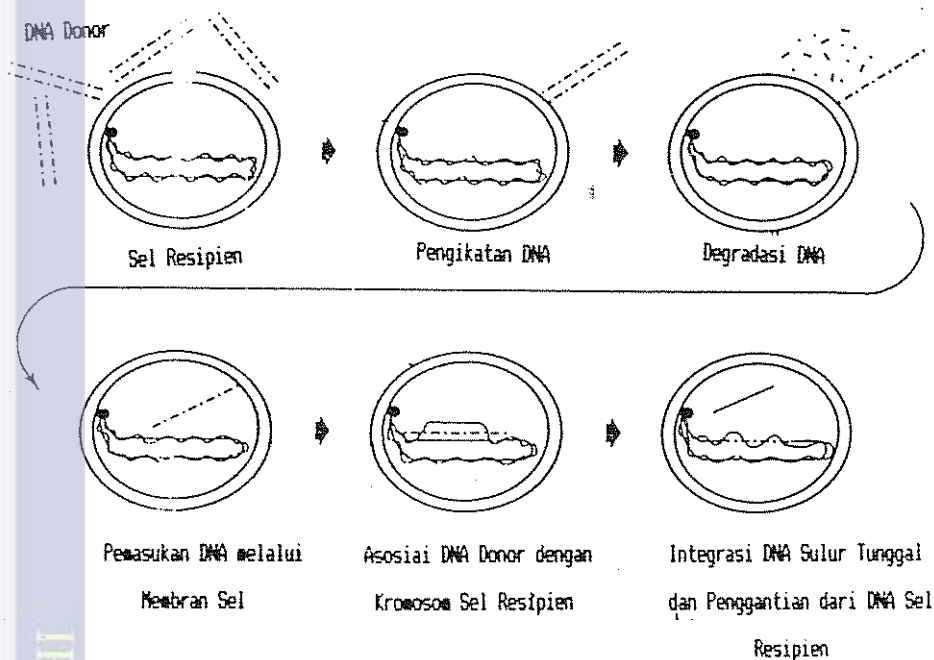
DNA asing yang masuk ke dalam sel penerima akan mengalami pemecahan oleh enzim restriksi menghasilkan fragmen-fragmen. Sebagian dari fragmen tersebut akan berintegrasi dengan pasangan basa dari DNA inang yang homolog (Sudding, 1990). Mekanisme masuknya DNA asing ke dalam suatu sel tidaklah diketahui dengan jelas, juga tidak diketahui apakah DNA yang masuk ke dalam sel berupa untai ganda ataupun untai tunggal (Dubnau, 1985). DNA asing yang masuk ke dalam sel akan berekombinasi dengan DNA sel inang dan secara bersama-sama akan mengalami replikasi. Rekombinasi dapat terjadi dengan DNA kromosom atau hanya berintegrasi dengan DNA plasmid. Rekombinasi ini dapat berbentuk "additive recombination" artinya terjadi penambahan pada total DNA yang ada sebelumnya pada sel inang ataupun berbentuk "substitutive recombination" yaitu terjadi pergantian sebagian dari DNA sel inang oleh DNA asing. Kemungkinan lain yang terjadi adalah DNA asing tidak

berekombinasi dengan DNA dari sel penerima. Dalam hal ini fragmen-fragmen DNA tersebut membentuk DNA lingkaran yang disebut plasmid. Plasmid yang terbentuk ini akan memperbanyak diri apabila terdapat titik replikasinya (Sudding, 1990).

Dalam proses transformasi ini terdapat beberapa masalah yaitu: sulit menentukan apa yang akan terjadi dalam sel setelah DNA asing masuk ke dalam sel tersebut. Hal ini disebabkan semua proses yang terjadi dalam sel berjalan secara alamiah sehingga peneliti tidak dapat berbuat banyak dalam menentukan sifat-sifat sel hasil transformasi. Masalah lainnya adalah adanya dinding atau membran sel yang menjadi penghalang masuknya DNA asing. Selain itu DNA asing yang masuk ke dalam sel masih menghadapi serangan enzim-enzim restriksi di dalam sel penerima itu sendiri yang akan menghancurkan DNA asing tersebut. Hanya fragmen-fragmen DNA yang homolog dengan DNA sel penerima yang tidak dihancurkan oleh enzim restriksi. Itulah sebabnya sebaiknya transformasi dilakukan antar spesies karena kemungkinan mempunyai gen-gen yang homolog akan lebih besar. Walaupun demikian kemungkinan adanya gen-gen yang homolog pada spesies yang berbeda tetap ada (Sudding, 1990).

Sebaliknya enzim restriksi juga sangat diperlukan dalam transformasi sebab rekombinasi DNA asing dengan DNA dari sel penerima tidak akan terjadi tanpa adanya enzim restriksi untuk membuka untai DNA baik DNA asing maupun DNA sel penerima. Sehingga enzim restriksi juga tidak dapat dihilangkan sama sekali tetapi dimanipulasi sedemikian rupa agar tidak sampai menghambat proses transformasi (Sudding, 1990).

Salah satu mekanisme yang diusulkan mengenai cara masuknya suatu DNA asing ke dalam suatu sel yang kemudian berekombinasi dengan DNA sel inang adalah sebagai berikut (Rodriguez dan Tait, 1990):



Gambar 2. Skema masuknya DNA asing ke dalam suatu sel dan berekombinasi dengan DNA sel inang.



BAHAN DAN METODA

A. BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah kultur murni *Bacillus licheniformis* yang didapatkan dari Balai Penelitian Veteriner, Bogor dan kultur murni *Eschericia coli* yang didapat dari Street Food Project - IPB, Bogor. Bahan-bahan lainnya yang digunakan adalah media-media dan bahan kimia lainnya yang akan dirinci pada metoda penelitian.

Alat yang digunakan adalah inkubator bergoyang merek GFL, "sterilizer", sentrifusa untuk pemisahan sel dan DNA merek Jouan CR-412, spektrofotometer Shimadzu uv-160 dan Spectronic 21, sonikator merk Cole Palmer 8852, "ultraviolet cabinet" merek Camag, lemari es & "freezer", inkubator, mikroskop Olympus BH-2, camera merek Pentax LX, penangas air, timbangan analitis Libror AEL-200 dan Metler PJ300, "freeze-dryer" dan alat-alat gelas.

B. METODA PENELITIAN

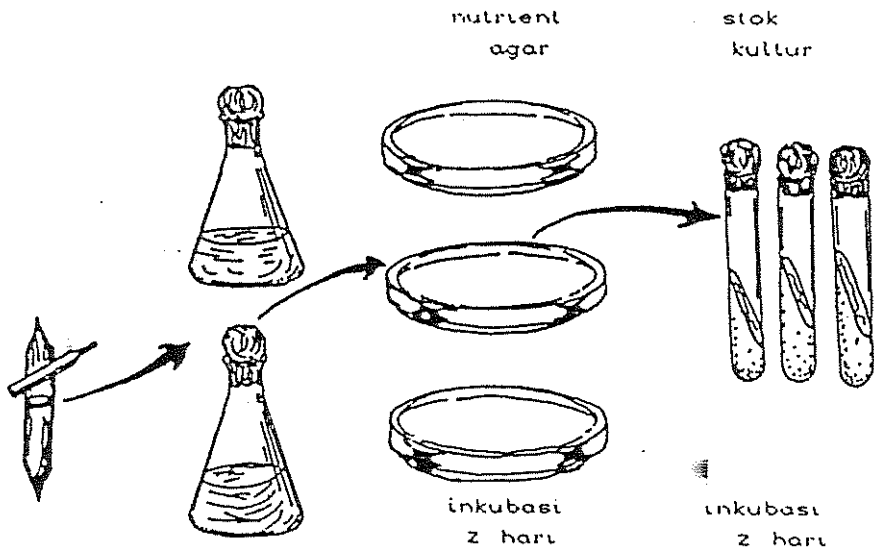
Penelitian ini terbagi atas tiga tahap, yaitu penelitian pendahuluan yang meliputi produksi sel donor dan isolasi DNA serta karakterisasi DNA, dan penelitian utama yang meliputi tahap transformasi DNA

ke dalam sel inang dan tahap analisis sel hasil transformasi.

1. Penelitian Pendahuluan

a. Persiapan Sel Donor

Tahap penyiapan mikroba secara skematis dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Tahapan penyiapan mikroba

Ampul kultur dikerat melingkar pada bagian tengah kapas penyekat kemudian dioles dengan alkohol pada dinding ampul dan dibungkus dengan kertas tissue lalu dipatahkan. Pipet sebanyak 0.5 ml air steril dengan pipet pasteur ke dalam ampul dan dikocok hingga homo-

gen. Larutan ini sebagian dipindahkan ke dalam erlenmeyer berisi 50 ml Nutrient Broth dan diinkubasikan selama 24 jam sedangkan sebagian lagi dibiakkan ke cawan petri yang berisi Nutrient Agar dan diinkubasi 48 jam.

Setelah 24 jam, dengan menggunakan ose mikroba yang tumbuh pada Nutrient Broth digoreskan pada agar miring yang telah disiapkan sebelumnya. Agar miring ini kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri yang tumbuh ini kemudian dijadikan kultur stok.

Kultur stok ini kemudian digunakan dalam percobaan selanjutnya sedangkan yang belum digunakan disimpan dalam lemari es. Semua pengerjaan di atas harus dilakukan secara aseptis.

b. Isolasi DNA Sel Donor

Kultur mikroba yang telah tumbuh pada agar miring ditambahkan air steril sebanyak 10 ml setiap tabung kemudian dikocok hingga homogen. Larutan ini kemudian dipindahkan ke dalam 100 ml media steril Nutrient Broth dan diinkubasikan pada suhu 37°C hingga sel yang ada cukup banyak. Sel yang ada ini kemudian

dipanen dengan menggunakan sentrifusa pada kecepatan 5000 rpm (3150 g) selama 20 menit.

Suspensi sel yang diperoleh dari hasil sentrifuse dicuci dengan buffer SET dua kali kemudian endapannya ditambah dengan buffer SET dan dikocok hingga terbentuk suspensi. Suspensi ini diendapkan kembali dengan sentrifuse lalu diperlakukan kembali dengan prosedur yang sama. Suspensi yang terbentuk dari hasil sentrifuse kedua kali ini ditambahkan dengan sekitar 15 ml Larutan Sodium Dodecyl Sulfat 25% dan disonikasi dengan frekuensi sebesar 100 kHz selama 5 menit lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 20-30 menit. Larutan kemudian ditambahkan NaClO₄ 5M sebanyak 10 ml dan kloroform:isoamil alkohol (24:1) 15 ml. Larutan dikocok hingga homogen dan diinkubasikan semalam pada suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan air steril 6 ml dan kloroform:isoamil alkohol hingga volumenya menjadi dua kali dan dikocok hingga merata. Sentrifuse semua larutan pada 3500 rpm (1542 g) 30 menit. Larutan akan terpisah menjadi tiga fase, fase atas yang bening kekuningan diambil dengan pipet bermulut besar lalu

ditambahkan kloroform:isoamil alkohol secukupnya dan dikocok pelan-pelan hingga sempurna dan dilakukan sentrifuse lagi pada kecepatan dan waktu yang sama (lakukan hal ini sebanyak tiga kali). Sekali lagi fase atas yang berwarna bening kekuningan diambil dengan pipet bermulut besar dan diteteskan melalui dinding tabung reaksi yang berisi etanol dingin: NaCl 5M (10:1). Benang DNA yang terbentuk kemudian dililit dan dilarutkan kembali dalam buffer TEN lalu disentrifuse pada 8000 rpm (8057 g) 10 menit. Teteskan kembali dalam campuran etanol dingin: NaCl 5M (10:1). Serabut DNA kemudian dililit dan direndam dalam etanol 70%, simpan pada suhu 4°C hingga saat digunakan.

c. Karakterisasi DNA

Untuk percobaan karakterisasi DNA dilakukan dengan dua metode yaitu dengan karakterisasi spektral dan pengukuran melalui fluoresensi Etidium Bromida. Pengukuran hanya dilakukan secara kualitatif untuk membuktikan bahwa yang berhasil diisolasi adalah DNA. Prosedur untuk kedua metode tersebut adalah:

c.1. Karakterisasi dengan spektrofotometer

DNA yang telah dimurnikan dilarutkan dalam buffer Potasium fosfat kemudian diambil sebagian untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 200 hingga 300 nm.

c.2. Dengan fluoresensi Etidium Bromida

Etidium bromida dilarutkan ke dalam buffer TE dengan konsentrasi 2 $\mu\text{gr/ml}$. DNA juga dilarutkan dalam larutan saline-sitrat. Disiapkan dua buah preparat, satu hanya dengan larutan Etidium Bromida di dalam buffer TE sedangkan yang lain merupakan campuran larutan Etidium Bromida dan larutan DNA dalam volume yang sama lalu diamati dan dibandingkan kedua preparat ini di bawah lampu ultraviolet dalam "uv-cabinet".

2. Penelitian Utama

a. Persiapan Sel Inang

Kultur miring yang mengandung biakan murni *Escherichia coli* ditambah 1 ml air steril kemudian dikocok hingga homogen.

Cairan yang telah homogen ini dituangkan ke dalam Luria Broth 100 ml dan diinkubasikan pada suhu 37°C dengan pengocokan selama semalam. Kultur miring yang belum digunakan disimpan di dalam lemari es.

b. Transformasi DNA ke dalam Sel Inang

Luria Broth yang telah berisi *Escherichia coli* dituangkan ke dalam tabung sentrifusa kemudian didinginkan pada suhu es selama 10 menit. Sel yang ada dikumpulkan dengan melakukan sentrifuse pada kecepatan 8000 rpm (8057 g) 4°C . Sel yang terkumpul diresuspensi dalam 2.5 ml CaCl_2 0,1 M dan dibiarkan pada suhu dingin selama 20 menit. Kemudian diulangi sentrifuse dan resuspensi sel dengan 1 ml CaCl_2 0,1 M. Suspensi sel dipindahkan ke dalam tabung gelas steril kemudian ditambahkan DNA ke dalam suspensi tersebut setelah terlebih dahulu dilarutkan dalam buffer TE dan campuran dibiarkan pada suhu es selama 30 menit. Campuran kemudian dipindahkan ke penangas air untuk "heat shock" pada suhu 40° selama 2 menit dan dipindahkan kembali ke suhu es. Tahap selanjutnya adalah dipindahkan ke

dalam media Luria Broth untuk "reviving" dan diinkubasikan pada inkubator bergoyang suhu 37°C selama 60 - 90 menit. Sel yang telah di"revive" ini kemudian dilakukan plating pada media selektif berupa Nutrient Agar + kasein 1% untuk menyeleksi mikroba yang berhasil ditransformasikan dengan pengenceran 10^{-2} hingga 10^{-8} .

c. Analisa Sifat-sifat Mikroba

c.1. Uji proteolitik (metode Bergmeyer)

Setiap sampel yang dianalisa disertai dengan blanko dan standar. Prosedur analisa disajikan pada Tabel 2. Cara menghitung unit aktivitas enzim adalah sebagai berikut. Setiap sampel yang akan dihitung unit aktivitasnya mempunyai nilai absorbansi untuk sampel, blanko dan standar sendiri-sendiri. Dengan menggunakan rumus di bawah ini dapat dihitung unit aktivitas dari enzim. Waktu inkubasi yang digunakan pada metoda ini adalah 10 menit.

$$U = \frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times P \times \frac{1}{T}$$

Dimana,

U = unit aktivitas protease per menit
(unit/ ml).

A_{sp} = nilai absorbansi sampel

A_{st} = nilai absorbansi standar

A_{bl} = nilai absorbansi blanko

P = faktor pengenceran

T = waktu inkubasi (menit)

Tabel 2. Pengukuran aktivitas protease

	Blanko (ml)	Std (ml)	Sampel (ml)
Buffer borat (0.01M, pH 8)	1.0	1.0	1.0
Substrat kasein (20 mg/ml, pH 8)	1.0	1.0	1.0
HCl (0.05 M)	0.2	0.2	0.2
Enzim dalam CaCl_2 (2 mmol/L)	-	-	0.2
Tirosin standar (5 mmol/L)	-	0.2	-
Akuades	0.2	-	-
Inkubasi pada 37°C tepat 10 menit			
TCA (0.1 M)	2.0	2.0	2.0
CaCl_2 (2 mmol/L)	-	-	0.2
Enzim dalam CaCl_2 (2 mmol/L)	0.2	0.2	-
Diamkan pada suhu 37°C selama 10 menit sentrifuse pada 4000 rpm selama 10 menit			
Filtrat	1.5	1.5	1.5
Na_2CO_3 (0.4 M)	5.0	5.0	5.0
Fenol reagen (1 + 2)	1.0	1.0	1.0
Diamkan 20 menit pada suhu 37°C dan baca absorbansi pada panjang gelombang 578 nm			

c.2. Uji Proteolitik

Mikroba dapat diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi Nutrient Agar + kasein 1% dengan metode gores ataupun tuang. Cawan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 hari. Mikroba yang bersifat proteolitik akan menghasilkan areal bening.

c.3. Uji Hidrolisa Pati

Setiap mikroba yang akan diuji diambil dengan ose kemudian digoreskan secara langsung pada setengah bagian cawan yang berisi Starch Agar. Cawan kemudian diinkubasikan pada suhu 30-32°C selama tiga hari. Setelah tiga hari cawan ditetesi dengan larutan gram Yodium hingga menutupi seluruh permukaannya. Hidrolisa pati ditandai dengan adanya areal bening yang berwarna kuning.

c.4. Uji Voges - Proskauer

Satu ose kultur diinokulasikan ke dalam MR-VP Broth kemudian diinkubasi dua hari pada suhu 35°C. Satu ml kultur dari

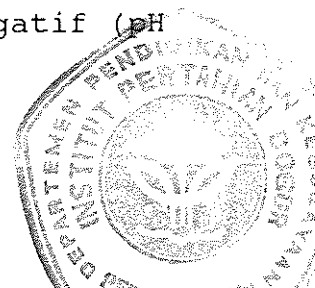
medium ini ditambah 0.6 ml larutan 0.5% alfa-naftol dalam alkohol absolut dan 0.2 ml larutan KOH 40%, setelah dikocok amati terbentuknya warna merah muda hingga merah yang menunjukkan uji positif.

c.5. Uji Hidrolisa Gelatin

Kultur yang akan diuji diinokulasikan 1 ose ke dalam medium Nutrient Gelatin kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 5-8 hari. Uji positif ditunjukkan dengan tetap mencairnya media jika ditempatkan dalam es selama setengah jam.

c.6. Uji Metil Merah

Satu ose kultur diinokulasikan ke dalam medium MR-VP lalu diinkubasikan pada suhu ruang antara 5-7 hari. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna merah setelah ditetesi larutan metil merah (pH kurang atau sama dengan 6.0) sedangkan warna kuning menunjukkan uji negatif (pH lebih dari 6.0).





IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PENELITIAN PENDAHULUAN

1. Produksi Sel Donor

Bacillus licheniformis yang diperoleh dari Balitvet Culture Collection dan *Escherichia coli* yang diperoleh dari "Street Food Project" - IPB sama-sama ditumbuhkan pada agar miring Nutrient Agar. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama sehari. Setelah sehari koloni sudah mulai tampak dengan jelas. Koloni *Escherichia coli* biasanya mempunyai penampakan dan warna yang lebih keruh dibandingkan dengan *Bacillus licheniformis*. *Bacillus licheniformis* juga membentuk koloni yang agak kasar dengan pinggiran koloni yang agak mengkerut (Buchanan dan Gibbons, 1974).

Kedua jenis mikroba ini dapat tumbuh dengan baik pada media padat yang sama karena memang kedua jenis mikroba ini masih termasuk dalam kelompok yang sama yaitu bakteri. Media padat Nutrient Agar biasa digunakan untuk pertumbuhan bakteri (Fardiaz, 1987).

Untuk panen sel baik sel donor maupun sel inang digunakan media cair. Media cair yang digunakan untuk sel donor adalah Nutrient Broth

dan limbah cair tahu. Hasil percobaan menunjukkan penggunaan medium cair Nutrient Broth lebih baik dibandingkan limbah cair tahu karena medium menjadi lebih keruh setelah diinkubasi pada suhu 35°C selama dua hari juga sel yang terbentuk setelah disentrifuse jauh lebih banyak. Keuntungan lain dari penggunaan Nutrient Broth adalah tidak adanya ampas tahu yang ikut mengendap sewaktu dilakukan pengendapan sel dengan sentrifuse. Ampas tahu ini perlu dihindari karena merupakan protein yang dapat mengkontaminasi DNA dan menyebabkan pemurnian DNA lebih sulit serta mempengaruhi karakterisasi DNA dengan penggunaan spektral.

Panen sel donor yang digunakan untuk diisolasi DNA-nya dilakukan setelah diinokulasi selama dua hari dimana sel yang terbentuk telah cukup banyak. Setelah dua hari dapat dikatakan tidak terjadi lagi pertumbuhan sel baru karena kekeruhan medium tidak bertambah lagi.

2. Isolasi DNA

Isolasi dilakukan dengan menggunakan kombinasi metoda Sudding (1990), Clark (1977), Rodriguez dan Tait (1988) serta Suhartono (1990) yang kesemuanya telah dimodifikasi sebagaimana yang terdapat dalam Bab III. Sel yang akan diisolasi DNA-

nya dipanen setelah dua hari karena dianggap pertumbuhan sel telah cukup banyak. Pada umur sel yang telah cukup tua ini terdapat kemungkinan dinding sel yang ada sudah agak tebal sehingga sulit dihancurkan. Keadaan ini diatasi dengan memberi perlakuan untuk lisis sel yang lebih keras berupa penggunaan sonikator dan suhu tinggi (60°C) setelah penambahan SDS. Dengan perlakuan ini ternyata dinding sel dapat dipecah, hal ini ditandai dengan terbentuknya suspensi yang kental dan lebih bening akibat keluarnya cairan pada sitoplasma (Suhartono, 1990). Setelah pemecahan dinding sel, DNA yang bercampur dengan protein dipisahkan dengan menggunakan pelarut organik. Ion perklorat yang ditambahkan berfungsi membantu melangsungkan disosiasi protein dari DNA. Protein kemudian digumpalkan dengan penambahan kloroform:isoamil alkohol (24:1). DNA yang masih larut dalam pelarut organik ini digumpalkan dengan menggunakan campuran etanol dingin:NaCl 5M (10:1). Selanjutnya benang-benang DNA yang diperoleh dililit dengan kawat steril dan disimpan dalam etanol 96% pada suhu 2°C seperti yang terlihat pada gambar 4.

Selama proses ekstraksi DNA dari campuran protein ini juga sekaligus diinaktifkan enzim-enzim yang dapat mengganggu proses transformasi misalnya DNAase. Pencucian yang dilakukan berkali-kali dengan buffer SET dan pemakaian deterjen Sodium Lauril Sulfat bertujuan menginaktifkan enzim ini dengan cara mengkelat ion-ion bivalen yang diperlukan untuk aktivitasnya oleh senyawa pengkelat EDTA yang terdapat dalam buffer SET dan oleh SDS.



Gambar 4. DNA *Bacillus licheniformis*

3. Karakterisasi DNA

a. Karakterisasi DNA dengan spektrofotometer

Preparat DNA yang telah bebas dari makromolekul-makromolekul kontaminan dapat ditentukan konsentrasinya. Metoda yang paling umum digunakan untuk menentukan konsentrasi DNA adalah dengan menggunakan spektroskopi pada panjang gelombang ultraviolet. Basa-basa nitrogen pada untai ganda DNA, seperti halnya senyawa organik lainnya mempunyai absorbansi spektral yang tertentu. Basa-basa nitrogen ini memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 260 nm. Pada panjang gelombang ini DNA memiliki koefisien ekstingsi $E_{260}=20$, artinya DNA pada konsentrasi 1 mg/ml akan mempunyai absorbansi $(A_{260})=2$. Berdasarkan hal ini maka konsentrasi DNA dapat ditentukan. Adanya RNA, protein, deterjen, larutan-larutan organik dalam suatu larutan DNA akan mempengaruhi absorbansi pada panjang gelombang ini. Karena absorbansi maksimum untuk DNA dan protein adalah 260 nm dan 280 nm, maka perkiraan dari kemurnian suatu DNA yang diisolasi dapat diperoleh dengan cara menentukan rasio A_{260}/A_{280} . Rasio ini tergantung pada kompo-

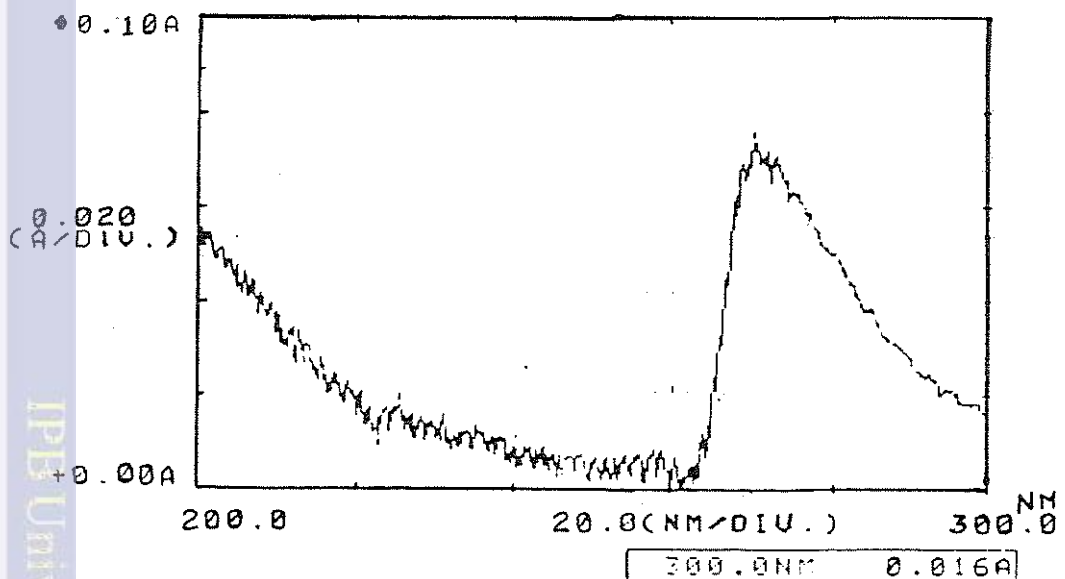
sisi basa-basa penyusun DNA juga bervariasi tergantung dari organisme (Rodriguez dan Tait, 1988). DNA murni memiliki rasio A_{260}/A_{280} sekitar 1.8. Apabila nilai yang diperoleh lebih kecil dapat dikatakan bahwa preparat DNA terkontaminasi oleh protein atau fenol. Dalam keadaan ini kuantifikasi DNA secara tepat tidak dapat dilakukan berdasarkan cara di atas (Suhartono, 1990).

Hasil pengujian dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 200 nm hingga 300 nm dari preparat DNA yang berhasil diisolasi dari percobaan ini menunjukkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 270.9 nm. Rasio dari A_{260}/A_{280} yang diperoleh adalah 0.1292. Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm adalah 0.007. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa preparat DNA yang diperoleh masih belum murni dan masih banyak terkontaminasi oleh protein, yang dibuktikan dari nisbah A_{260}/A_{280} kurang dari 1.8. Pengujian dengan spektrofotometer ini membuktikan bahwa preparat yang diisolasi memang merupakan DNA walaupun belum murni, hal ini terbukti dari adanya nilai absorbansi pada panjang

gelombang 260 nm dan nilai absorbansi maksimum pada panjang gelombang 270.9 nm yang mendekati nilai absorbansi maksimum untuk DNA murni yaitu 260 nm. Grafik hubungan antara panjang gelombang dengan absorbansi dari preparat DNA yang berhasil diisolasi dapat dilihat dari grafik 1, sedangkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm serta nisbah A_{260}/A_{280} terdapat pada tabel 3.

Tabel 3. Absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm serta rasio A_{260}/A_{280}

260 nm A1	280 nm A2	A1/A2
0.007	0.051	0.1292

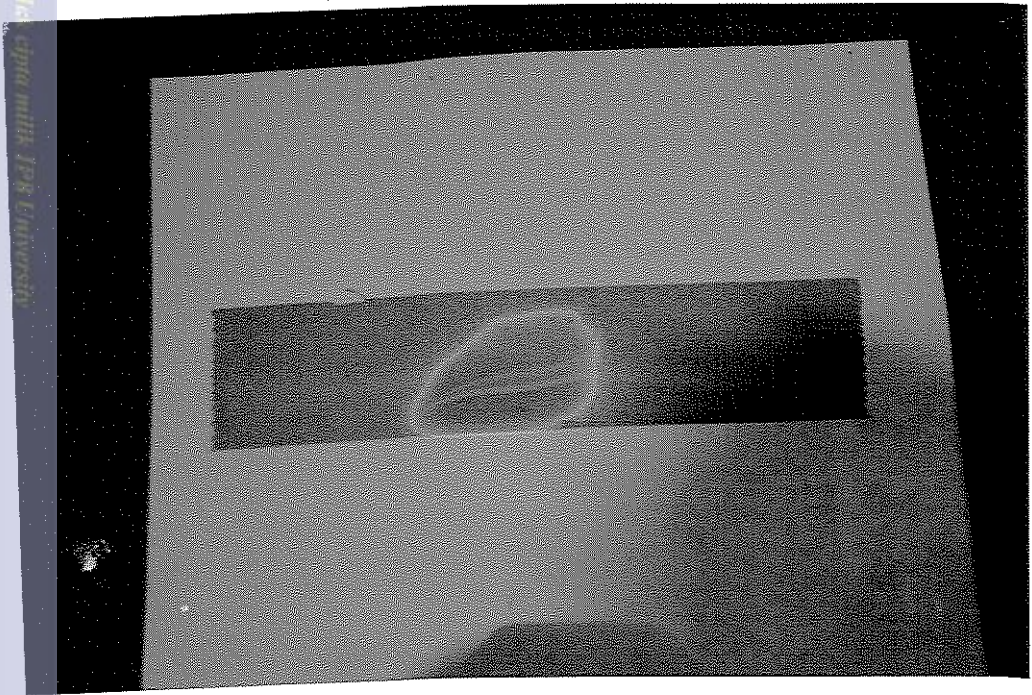


b. Karakterisasi DNA dengan Etidium Bromida

Karakterisasi DNA dengan Etidium Bromida merupakan metoda lain untuk kuantifikasi DNA, khususnya DNA yang mengandung berbagai kontaminan. Dengan metoda ini, jumlah asam nukleat dapat diduga berdasarkan fluoresensi yang dipancarkan oleh DNA yang tercampur dengan Etidium Bromida pada daerah sinar ultraviolet. Intensitas fluoresensi adalah sebanding dengan jumlah asam nukleat. Konsentrasi preparat DNA ditentukan dengan membandingkan fluoresensinya dengan fluoresensi dari satu seri larutan baku DNA yang telah diketahui konsentrasinya di bawah sinar ultraviolet (Suhartono, 1990).

Preparat DNA yang ada tidak ditentukan konsentrasinya pada percobaan ini karena tidak adanya larutan baku DNA. Pengujian ini dilakukan hanya untuk membuktikan bahwa preparat yang ada memang merupakan DNA walaupun tidak murni. Percobaan dilakukan dengan cara membandingkan fluoresensi campuran DNA dengan Etidium Bromida dan larutan Etidium Bromida. Hasilnya menunjukkan bahwa pada campuran DNA dengan Etidium Bromida terjadi fluoresensi sedangkan larutan Etidium Bromida tidak

berfluoresensi. Perbedaan dari campuran DNA dengan Etidium Bromida dengan larutan Etidium Bromida dapat dilihat pada gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Larutan Campuran DNA dengan Etidium Bromida

B. PENELITIAN UTAMA

1. Transformasi DNA

Proses transformasi DNA *Bacillus licheniformis* ke dalam sel *Escherichia coli* dilakukan dengan menggunakan metoda Gingold dan Kushner yang telah dimodifikasi. Prosedur transformasi adalah sesuai dengan yang dijelaskan dalam bab III.

Rodriguez dan Tait (1988), menyatakan transformasi adalah suatu fenomena yang tidak terbatas hanya terjadi di laboratorium, akan tetapi juga terjadi secara alamiah. Dalam sistim transformasi yang terjadi secara alamiah ini, bakteri umumnya memasuki suatu tahap pertumbuhan yang disebut kompeten dimana dalam keadaan ini mereka sanggup menyerap DNA asing. Sel-sel yang kompeten dapat mengikat asam-asam nukleat dalam bentuk yang resisten terhadap serangan enzim-enzim nuklease. Setelah diserap, DNA mengalami suatu periode yang disebut fase "eclipse" dimana ia tetap tahan terhadap serangan enzim-enzim nuklease tetapi tidak mengekspresikan informasi-informasi genetiknya. Tahap ini adalah tahap dimana DNA asing diperkirakan mengalami rekombinasi dengan deret-deret homolog dari kromosom bakteri. Akan tetapi menurut Sudding (1990), serangan dari enzim-enzim

nuklease dalam batas-batas tertentu diperlukan untuk membuka untai DNA asing maupun sel inang yang kemudian akan berekombinasi

Usaha-usaha terdahulu untuk melakukan transformasi pada *Eschericia coli* tidak berhasil dilakukan. Berdasarkan pada kegagalan inilah maka dilakukan berbagai cara untuk mencoba menginduksi terjadinya transformasi khususnya pada *Eschericia coli*. Percobaan-percobaan yang kemudian dilakukan oleh Mandel dan Higa di dalam Primrose dan Old (1985), menunjukkan bahwa perlakuan dengan CaCl_2 sebelum penambahan DNA dapat menginduksi kompetensi sel *Eschericia coli* dan dengan demikian juga memungkinkan terjadinya transformasi. Percobaan ini melibatkan penggunaan larutan hipotonik CaCl_2 pada suhu 0°C yang menyebabkan pembengkakan sel atau terjadinya spheroplast. Sel *Eschericia coli* yang telah mengalami pembentukan spheroplast ini terbukti dapat menyerap DNA yang berasal dari bakteriofag. Pada keadaan setelah penggunaan larutan CaCl_2 menyebabkan DNA yang ditambahkan membentuk kompleks Calsium fosfat hidroksil dengan permukaan sel yang kompeten, yang tahan terhadap aktivitas DNA-ase. Kompleks yang terjadi ini kemudian dapat masuk ke dalam sel dengan adanya



kejutan panas atau "heat shock" pada suhu 42°C . Cohen et al. (1972) di dalam Primrose dan Old (1985) juga menunjukkan bahwa sel *Eschericia coli* yang diberi perlakuan dengan CaCl_2 juga efektif sebagai resipien untuk DNA plasmid. Banyak percobaan telah membuktikan bahwa hampir semua strain *Eschericia coli* dapat ditransformasi dengan plasmid DNA. Bukti bahwa DNA linear dapat ditransformasikan ke dalam sel *Eschericia coli* baru ditemukan kemudian melalui percobaan Hoekstra et al. (1980), akan tetapi dengan efisiensi yang sangat rendah (Primrose dan Old, 1985).

Hasil penelitian ini membuktikan kebenaran bahwa sel *Eschericia coli* yang telah diberi perlakuan dengan CaCl_2 dapat ditransformasi dengan DNA asing walaupun dengan efisiensi yang rendah. Sel *Eschericia coli* yang telah dipanen dalam percobaan ini diberi larutan CaCl_2 0.1 M pada suhu 0°C selama 20 menit, berfungsi untuk membentuk spheroplast dari sel *Eschericia coli* yang siap untuk menerima DNA asing yang telah dilarutkan dahulu dalam buffer TE (Tris-EDTA). Buffer TE ini berfungsi mempertinggi efisiensi transformasi karena adanya Tris juga dapat menekan aktivitas DNAase, yang kemungkinan terdapat dalam larutan, karena adanya senyawa EDTA yang dapat mengkelat ion-ion



bivalen yang diperlukan untuk aktivitas DNAase. Campuran sel *Eschericia coli* yang akan ditransformasi dengan DNA kemudian diberi kejutan panas pada suhu 40°C 2 menit. Dengan adanya kejutan panas ini diharapkan kompleks Calsium fosfat hidroksil-DNA dapat diserap ke dalam sel inang dan mengadakan rekombinasi dengan gen-gen sel inang ataupun membentuk DNA lingkar di dalam sel inang. Inkubasi yang dilakukan setelah tahap di atas pada medium Luria Broth dimaksudkan agar sel-sel yang tertransformasi melewati fase "eclipse" dan juga memberi kesempatan bagi sel untuk "revive" sehingga gen-gen yang berhasil masuk ke dalam sel yang tertransformasi dapat terekspresi sewaktu di"plating".

Berdasarkan hasil-hasil yang diperoleh dari penelitian ini dapat disimpulkan DNA dari *Bacillus licheniformis* dapat ditransformasikan ke dalam sel *Eschericia coli* dan terekspresi di dalam sel *Eschericia coli*. Pengujian-pengujian yang dilakukan memperkuat kesimpulan di atas karena sel-sel yang berhasil ditransformasi mempunyai sifat campuran dari kedua induknya.

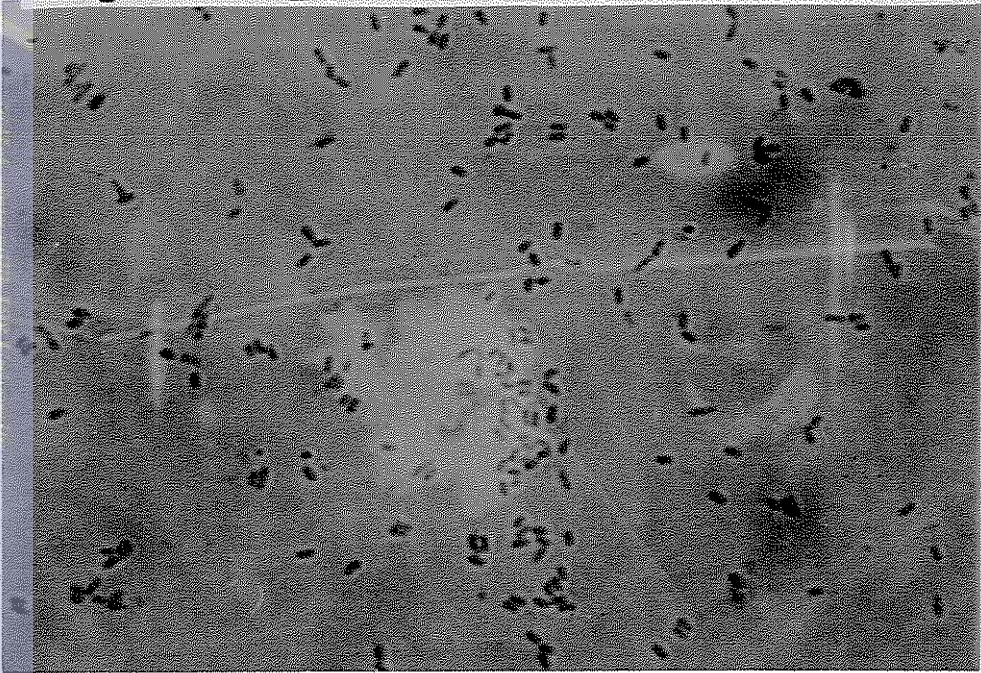
2. Seleksi Sel *Eschericia coli* Hasil Transformasi

Untuk menyeleksi sel yang berhasil ditransformasi, sel-sel yang telah mengalami proses transformasi dilakukan pengenceran kemudian ditumbuhkan dalam cawan petri yang berisi media Nutrient Agar + 1% kasein sebagai medium selektif. Pengenceran ini dilakukan supaya terbentuk koloni-koloni yang terpisah sehingga koloni yang menghasilkan protease ekstraselular dan membentuk areal bening pada media dapat diisolasi. Inkubasi selama 3 - 4 hari dari media NA + 1% kasein ini didapatkan lima koloni yang membentuk areal bening. Koloni-koloni ini diisolasi dan diuji sekali lagi terhadap aktivitas protease ekstraselularnya dalam media yang sama untuk memastikan bahwa memang koloni tersebut yang menghasilkan protease ekstraselular. Dari kelima koloni yang diuji aktivitas proteolitik untuk kedua kalinya ternyata hanya didapatkan dua koloni yang menunjukkan hasil positif. Kedua koloni ini selanjutnya masing-masing diberi nama Transforman J1 (TMJ 1) dan TMJ 2 serta dilakukan pengujian-pengujian lainnya. Pengujian-pengujian yang dilakukan meliputi pengamatan morfologi sel, uji kemampuan hidrolisa pati, uji proteolitik, uji

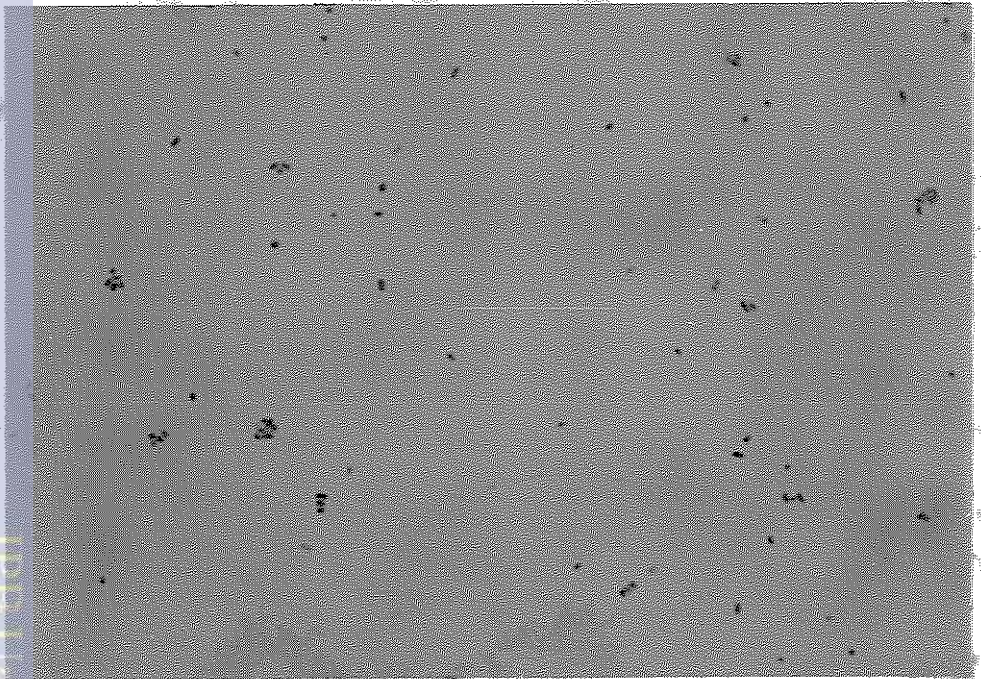
kemampuan hidrolisa gelatin, uji Voges Proskauer, uji metil merah dan uji aktivitas protease secara kuantitatif dengan metode Bergmeyer. Semua hasil-hasil pengujian ini dibandingkan dengan kedua sel induknya yaitu *Bacillus licheniformis* dan *Eschericia coli*.

3. Pengamatan Morfologi Sel

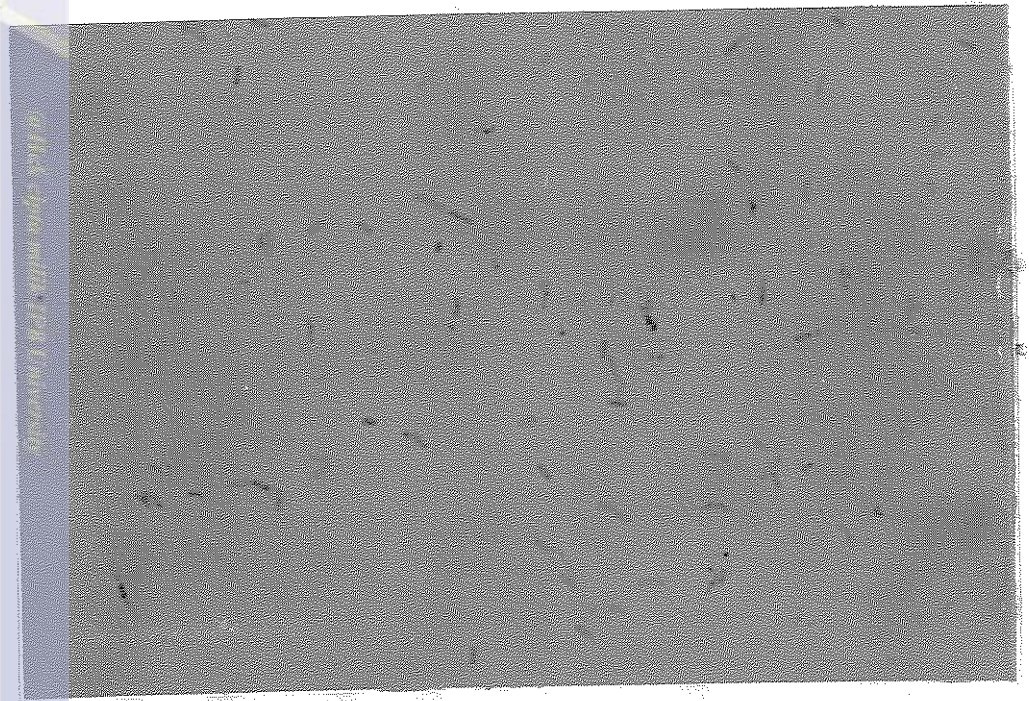
Melalui pengamatan di bawah mikroskop, terlihat bahwa Transforman J1 (TMJ 1) dan TMJ 2 mempunyai morfologi sel yang agak berbeda. Morfologi sel TMJ 1 mempunyai bentuk yang memanjang dan beberapa membentuk rantai yang terdiri dari beberapa sel. Sel TMJ 2 terdiri dari campuran sel yang mempunyai bentuk elips agak panjang dan sel yang bentuknya memanjang akan tetapi tidak bersambung membentuk rantai seperti sel TMJ 1. Ditinjau dari bentuk sel baik TMJ 1 maupun TMJ 2 mempunyai bentuk yang lebih menyerupai *Bacillus licheniformis* daripada *Eschericia coli*. Bentuk dari sel *Bacillus licheniformis*, *Eschericia coli*, TMJ 1 dan TMJ 2 dapat terlihat pada gambar 7, 8, 9 dan 10.



Gambar 7. Sel *Bacillus licheniformis* dengan pembesaran 1000 kali



Gambar 8. Sel *Escherichia coli* dengan pembesaran 1000 kali



Gambar 9. Sel hasil transformasi (TMJ 1) dengan pembesaran 1000 kali



Gambar 10. Sel TMJ 2 dengan pembesaran 1000 kali

Dari segi ukuran atau besarnya sel, baik sel TMJ 1 maupun TMJ 2 mempunyai ukuran yang lebih besar dibandingkan sel *Bacillus licheniformis* maupun *Eschericia coli*. Sel TMJ 1 berukuran lebih besar daripada TMJ 2. Jika dilihat secara seksama maka dapat dikatakan sel TMJ 1 mempunyai bentuk morfologi yang lebih menyerupai *Bacillus licheniformis* sedangkan sel TMJ 2 lebih menyerupai *Eschericia coli* bahkan beberapa sel daripada TMJ 2 mempunyai bentuk yang sama dengan *Eschericia coli*. Hal ini diduga pada kultur TMJ 2 sebagian masih merupakan sel *Eschericia coli* ataupun sebagian daripada sel hasil transformasi (TMJ 2) ini telah kembali ke sifat asal induknya. Akan tetapi secara keseluruhan kultur TMJ 2 ini didominasi oleh sel yang berbentuk batang.

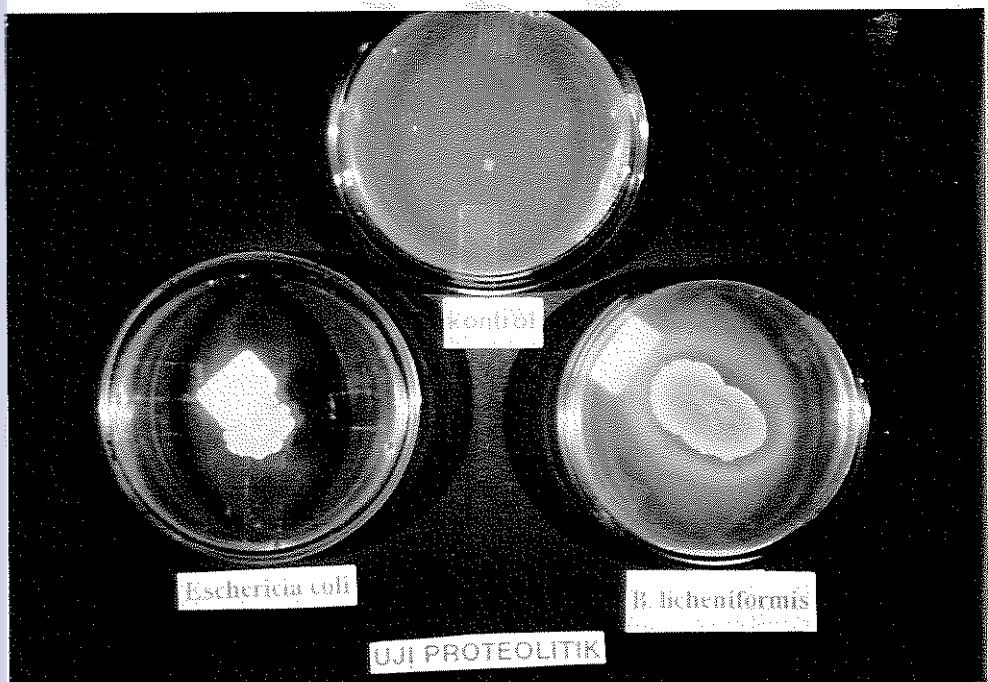
4. Uji Proteolitik

Dalam uji proteolitik dengan menggunakan cawan ini tidak digunakan media Nutrient Agar + 2% skim milk seperti biasa yang dilakukan untuk uji proteolitik akan tetapi sebagai pengganti skim milk digunakan 1% kasein. Hal ini adalah berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Uehara et al. (1974) dimana uji proteolitik dengan menggunakan media ini menghasilkan areal bening yang lebih

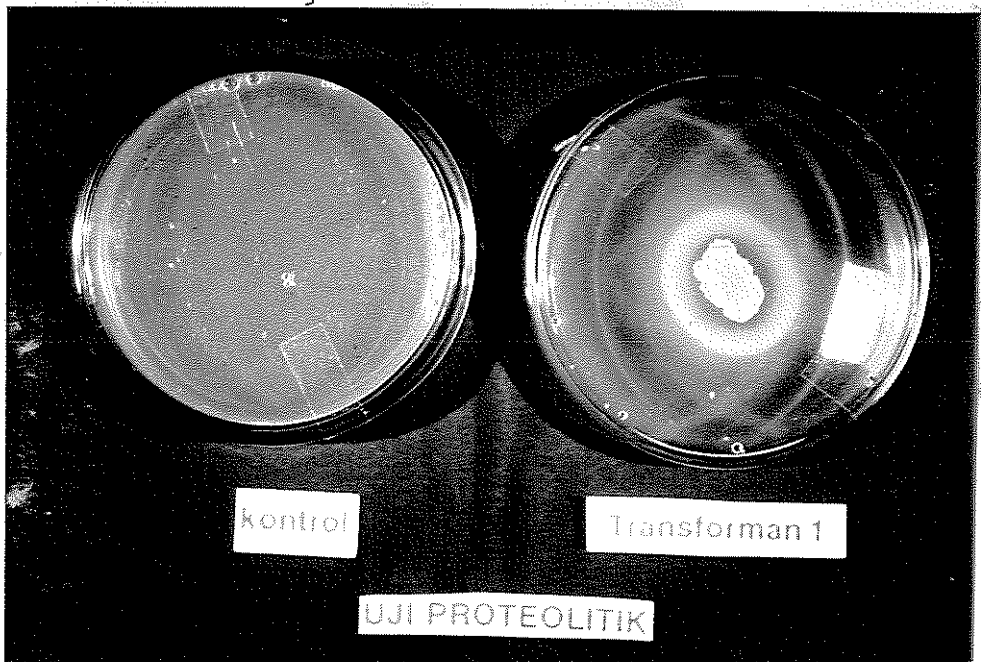
jelas dibandingkan dengan media NA + 2% skim milk. Walaupun dalam seleksi sel *Eshcericia coli* yang telah berhasil tertransformasi telah dilakukan uji proteolitik dengan menggunakan media Nutrient Agar + 1% kasein sebanyak dua kali. Uji proteolitik dengan menggunakan metoda yang sama tetap dilakukan dengan maksud agar didapatkan hasil yang benar-benar dapat dipercaya dengan melakukan cara "check and recheck", juga agar transforman yang ada dapat dibandingkan dengan kedua induknya. Dari hasil uji ini dibuktikan bahwa memang TMJ 1 dan TMJ 2 mempunyai sifat proteolitik. Sifat proteolitik ini hanya dimiliki oleh salah satu induknya yaitu *Bacillus licheniformis*. Berdasarkan luas areal bening yang terbentuk dapat dilihat bahwa areal bening yang dihasilkan oleh TMJ 1 lebih luas dibandingkan dengan TMJ 2 maupun induknya yaitu *Bacillus licheniformis*. Luas areal bening yang terbentuk biasanya mempunyai korelasi positif dengan aktivitas protease yang dihasilkan oleh suatu mikroba, akan tetapi menurut Aunstrup (1978), hal ini tidak selalu benar sehingga dalam percobaan ini dilakukan uji aktivitas protease secara kuantitatif. Hasil uji proteolitik dengan



menggunakan metode cawan dapat terlihat dari gambar 11, 12 dan 13 di bawah ini.



Gambar 11. Uji proteolitik *Bacillus licheniformis* dan *Escherichia coli* dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 12. Uji proteolitik TMJ 1 yang positif dibandingkan kontrol.

© Hak cipta milik IPB University

Halaman ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University. Untuk informasi lebih lanjut, silakan kunjungi website kami di www.ipb.ac.id.
1. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
2. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
3. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
4. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
5. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
6. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
7. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
8. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
9. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.
10. Dokumen ini adalah bagian dari dokumen yang dihasilkan oleh sistem manajemen dan produksi konten IPB University.



Gambar 13. Uji proteolitik TMJ 2 yang positif dibandingkan kontrol.

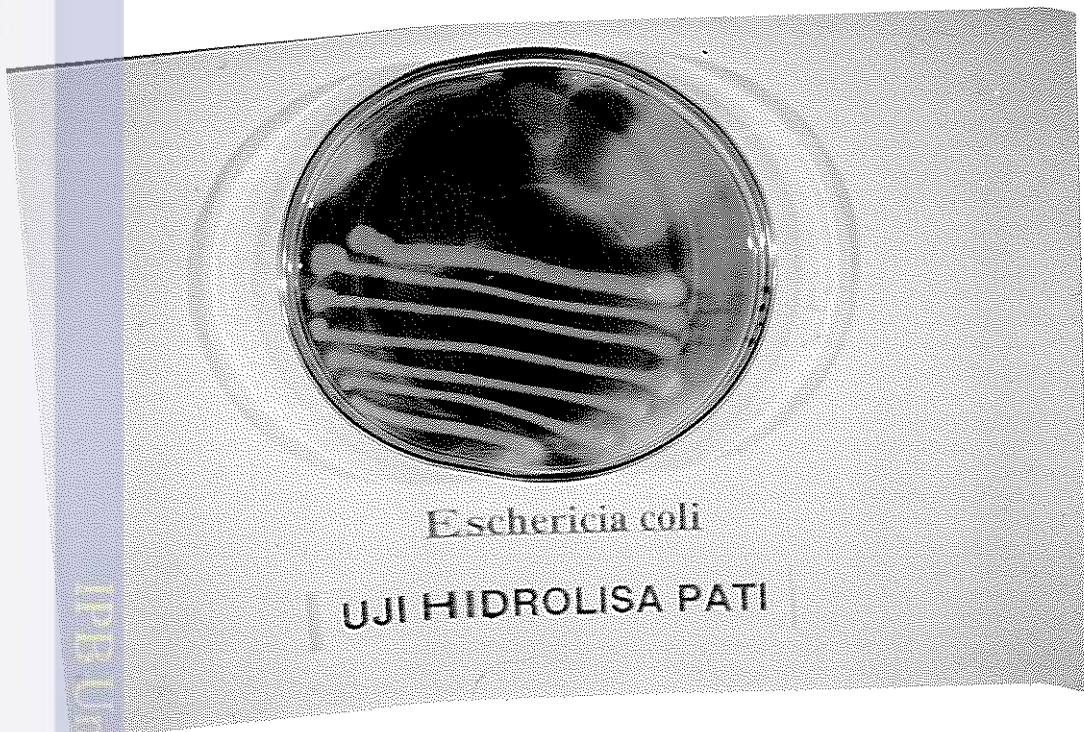
5. Uji Hidrolisa pati

Uji hidrolisa pati ini dilakukan dengan menggunakan media agar pati ("starch agar"). Uji ini menunjukkan bahwa sel hasil transformasi baik TMJ 1 maupun TMJ 2 mampu menghidrolisa pati pada suhu 35°C . Hal ini diketahui dari adanya daerah bening di sekitar koloni yang tumbuh pada media agar pati setelah digenangi dengan larutan gram Iodine.

Kemampuan sel hasil transformasi menghasilkan enzim amilase (enzim yang menghidrolisa pati), sekali lagi menunjukkan bahwa gen-gen yang terkandung dalam DNA *Bacillus licheniformis* terekspresi dalam sel inang yaitu *Eschericia coli*. Sebab sebelum transformasi, dari uji yang dilakukan terhadap kedua induknya didapatkan hanya *Bacillus licheniformis* yang mampu menghidrolisa pati sedangkan *Eschericia coli* sebagai sel inang tidak mampu menghidrolisa pati. Berdasarkan uji proteolitik dan uji hidrolisa pati ini diduga bahwa gen-gen yang menghasilkan enzim protease dan amilase dari DNA sel donor ini berdekatan atau secara kebetulan fragmen-fragmen DNA yang masuk merupakan fragmen DNA yang dapat mengekspresikan pembentukan enzim protease dan amilase. Hasil uji hidrolisa pati yang dilakukan terhadap *Bacillus licheniformis*, *Eschericia coli*, TMJ 1 dan TMJ 2 dapat terlihat dari gambar 14, 15, 16 dan 17.



Gambar 14. *Bacillus licheniformis* yang menghidrolisa pati.



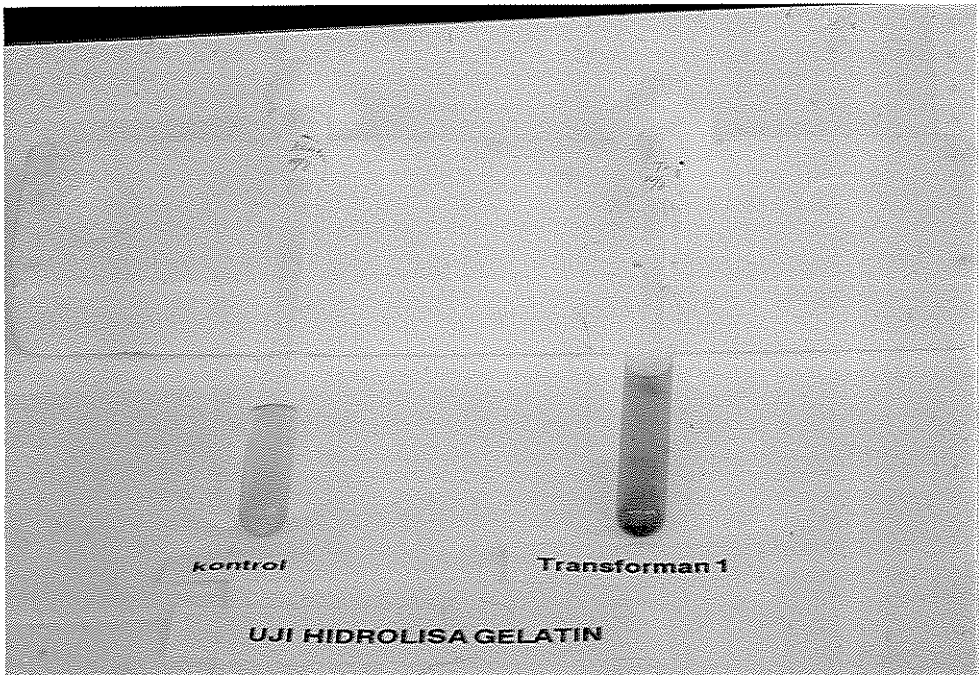
Gambar 15. *Escherichia coli* yang tidak menghidrolisa pati.

6. Uji Hidrolisa Gelatin

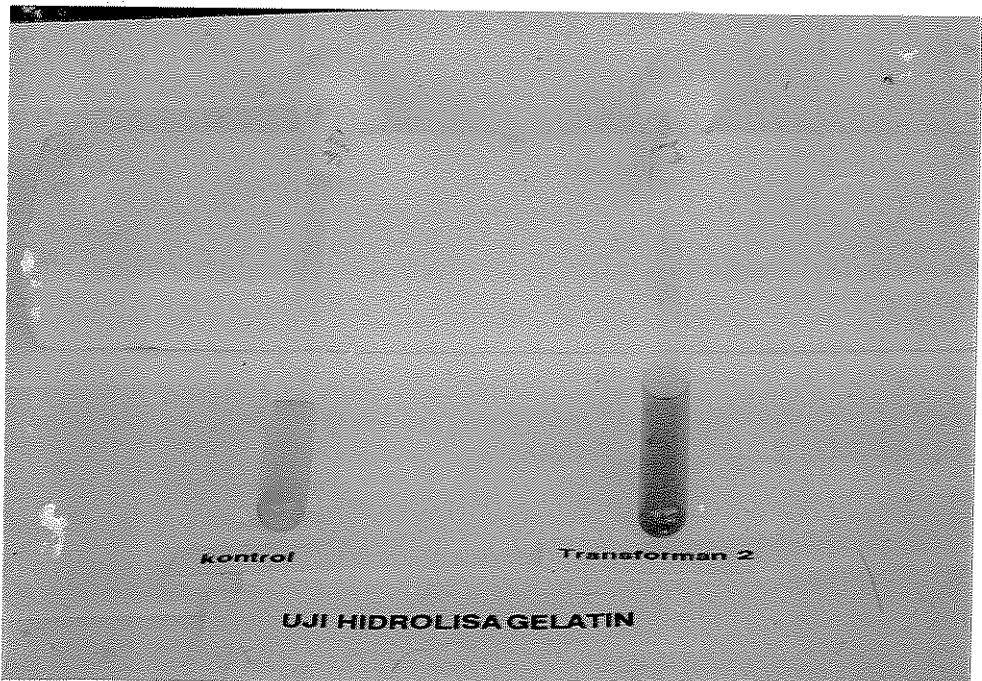
Hidrolisa gelatin juga merupakan salah satu cara yang banyak digunakan untuk menguji adanya enzim proteolitik selain daripada hidrolisa kasein seperti yang diterangkan sebelumnya. Akan tetapi enzim proteolitik yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme adalah spesifik dan mempunyai tipe degradasi protein yang berbeda-beda. Dengan demikian pola degradasi asam amino yang spesifik ini dapat juga digunakan untuk karakterisasi mikroorganisme (Kiss, 1984).

Uji hidrolisa gelatin yang dilakukan menunjukkan bahwa sel hasil transformasi yaitu TMJ 1 dan TMJ 2 dapat menghidrolisa gelatin, sedangkan dari kedua induknya hanya *Bacillus licheniformis* yang dapat menghidrolisa gelatin. Hal ini ditandai dengan tetap mencairnya media gelatin yang telah diinokulasikan dengan *Bacillus licheniformis* dan sel hasil transformasi, walaupun ditempatkan dalam es selama beberapa jam. Pengujian ini memperkuat hasil uji proteolitik bahwa sel hasil transformasi menghasilkan enzim proteolitik.

Dari pengujian ini juga dapat disimpulkan bahwa enzim proteolitik yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* dapat menghidrolisa kasein



Gambar 19. Sel TMJ 1 yang menghidrolisa gelatin dibandingkan dengan kontrol



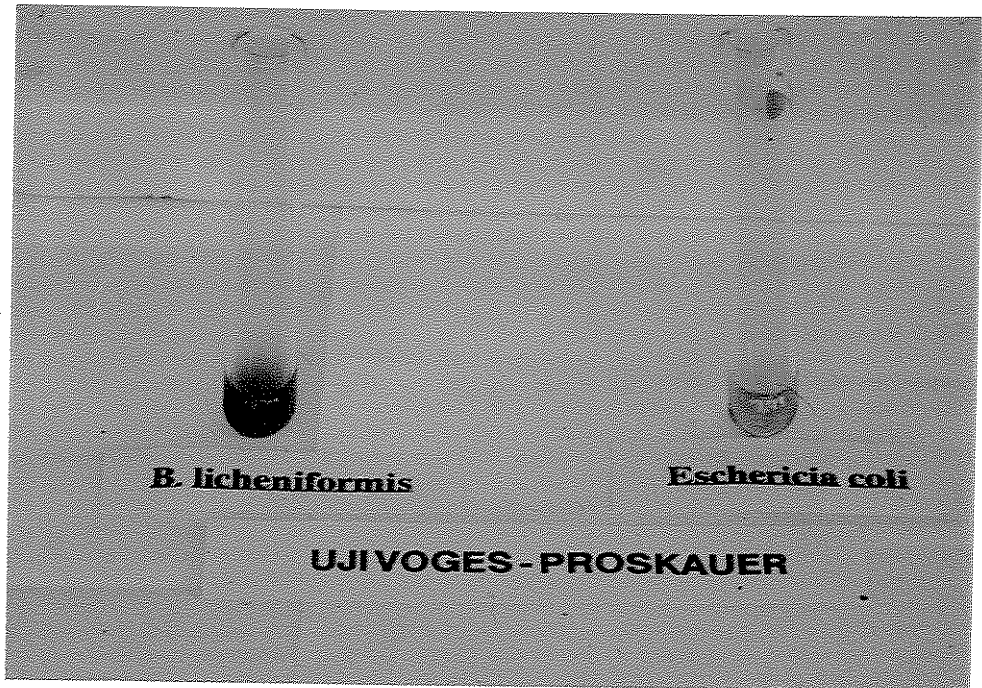
Gambar 20. Sel TMJ 2 yang menghidrolisa gelatin dibandingkan dengan kontrol

7. Uji Voges Proskauer

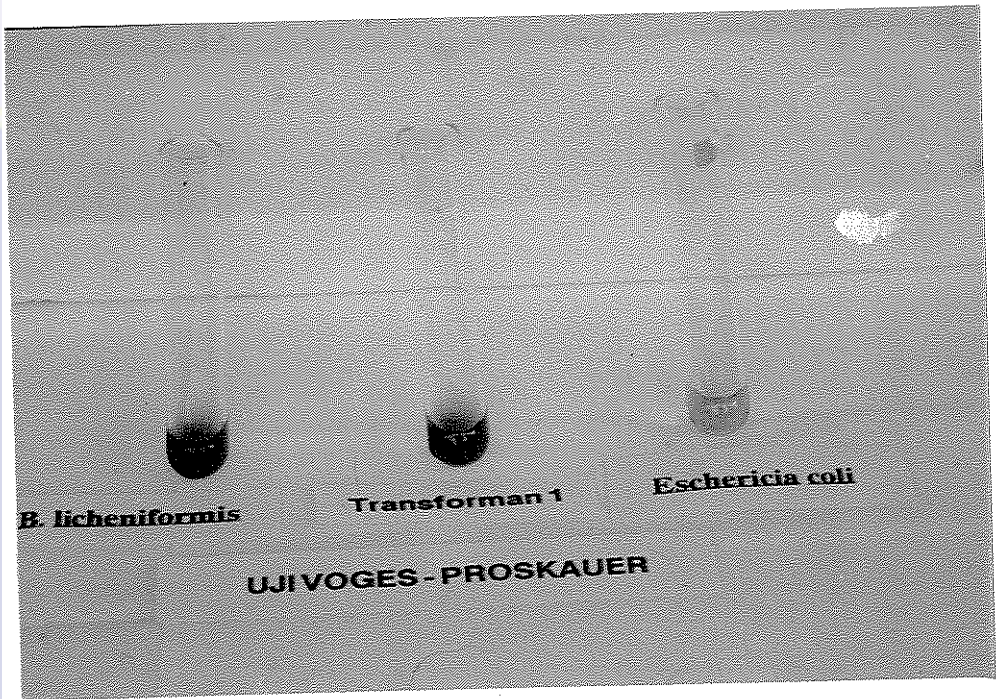
Uji ini didasarkan atas pembentukan asetilmetilkarbinol (asetoin), suatu hasil samping dari metabolisme karbohidrat. Pembentukan asetoin ini adalah spesifik dihasilkan oleh metabolisme *Bacillus licheniformis* tetapi tidak dihasilkan oleh *Eschericia coli*. Asetilmetilkarbinol dengan adanya KOH dan udara akan teroksidasi menjadi diasetil. Diasetil ini kemudian akan membentuk warna merah dengan adanya alfa naftol dan asam amino di dalam medium MR-VP (Jenie dan Fardiaz, 1989).

Hasil pengujian ini menunjukkan dari kedua sel hasil transformasi yang didapat TMJ 1 dan TMJ 2, sel TMJ 1 menunjukkan hasil uji yang positif. Hal ini ditandai dengan terbentuknya warna merah pada medium yang telah diinkubasi setelah penambahan alfa naftol dan KOH dan didiamkan selama 30 menit. Sel TMJ 2 sebaliknya memberikan hasil pengujian negatif. Warna merah yang terbentuk pada medium yang diinokulasi dengan sel TMJ 1 kurang begitu merah jika dibandingkan dengan medium yang diinokulasi dengan *Bacillus licheniformis*. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh produksi asetilmetilkarbinol yang lebih rendah

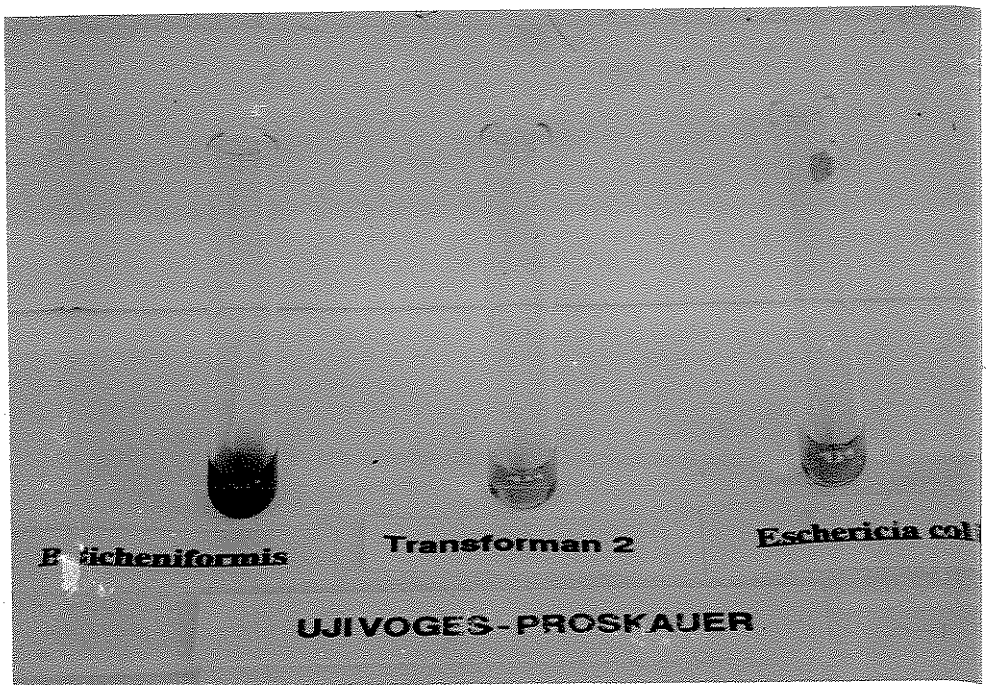
pada TMJ 1 dibandingkan dengan *Bacillus licheniformis*. Hasil uji Voges Proskauer yang dilakukan terhadap sel hasil transformasi, *Eschericia coli* dan *Bacillus licheniformis* dapat terlihat pada gambar 21, 22 dan 23. Uji Voges Proskauer ini juga menunjukkan bahwa dalam sel hasil transformasi, khususnya TMJ 2 masih terekspresi gen-gen yang terkandung dalam DNA sel inang walaupun dalam banyak hal telah terjadi perubahan sifat dari sel ini dibandingkan sel inangnya seperti yang ditunjukkan dalam uji-uji sebelumnya. Asumsi ini memperkuat asumsi yang sama yang didapatkan oleh Sudding (1990) dalam penelitiannya.



Gambar 21. Perbandingan hasil uji VP yang positif pada *B. licheniformis* dengan uji negatif pada *Eschericia coli*



Gambar 22. Uji Voges Proskauer positif pada TMJ 1 dibandingkan dengan kedua induknya



Gambar 23. Uji Voges Proskauer negatif pada TMJ 2 dibandingkan dengan kedua induknya

8. Uji Metil Merah

Eschericia coli dalam media MR-VP akan menghasilkan asam yang cukup banyak sehingga dapat menurunkan pH medium yang mengandung 0.5% glukosa sehingga mencapai pH 5.0 atau kurang (Jenie dan Fardiaz, 1990). Sedangkan *Bacillus licheniformis* hanya dapat menurunkan pH medium antara 5.0 - 6.5 (Buchanan dan Gibbons, 1974). Karena pH medium yang cukup rendah yaitu 5.0 atau kurang dapat menyebabkan indikator metil merah yang diteteskan ke dalam medium menjadi berwarna merah dan uji dinyatakan positif, sedangkan jika pH medium 6.0 atau lebih maka indikator yang ditambahkan akan berubah menjadi berwarna kuning dan uji dinyatakan negatif. Dalam percobaan ini sebagai pengganti indikator metil merah digunakan kertas pH untuk mengukur pH medium. Jika pH yang terukur lebih kecil atau sama dengan 5.0, dianggap uji positif demikian pula sebaliknya. Hasil pengujian metil merah yang dilakukan terhadap sel hasil transformasi dan *Bacillus licheniformis* serta *Eschericia coli* adalah sebagai berikut:



Tabel 4. Uji metil merah terhadap sel hasil transformasi, *Bacillus licheniformis* dan *Eschericia coli*

Mikroba	pH medium	Hasil uji
<i>Bacillus licheniformis</i>	6.2	-
<i>Eschericia coli</i>	<4.6	+
TMJ 1	6.0	-
TMJ 2	<4.6	+

Dari uji metil merah ini terlihat bahwa sel hasil transformasi, menunjukkan hasil uji yang sama dengan hasil uji Voges Proskauer, yaitu TMJ 1 menghasilkan uji negatif sedangkan TMJ 2 positif. Pengujian ini juga memperkuat perkiraan yang dinyatakan sebelumnya bahwa sebagian gen-gen yang berasal dari DNA sel inang masih terekspresi pada sel hasil transformasi.

9. Uji Aktivitas Protease dengan Metoda Bergmeyer

Pengujian ini dilakukan untuk membandingkan bagaimana aktivitas protease ekstraselular yang dihasilkan oleh sel hasil transformasi dibandingkan dengan kedua induknya. Penentuan aktivitas protease ini dilakukan dengan menggunakan media Nutrient Broth. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C

selama 20 jam. Hasil pengujian yang didapatkan adalah sebagai berikut:

Tabel 5. Pengujian aktivitas protease pada media Nutrien Broth. Inkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C

Mikroba	No	Sampel (A)	Blanko (A)	Std (A)
<i>B. licheniformis</i>	I	0.130	0.110	0.476
	II	0.120		
<i>E. coli</i>	I	0.093	0.134	0.748
	II	0.122		
TMJ 1	I	0.272	0.102	0.675
	II	0.120		
TMJ 2	I	0.150	0.111	0.772
	II	0.117		

Berdasarkan hasil di atas, didapatkan aktivitas protease rata-rata untuk setiap mikroba adalah sebagai berikut :

Bacillus licheniformis : 0.025 unit/ml

Eschericia coli : negatif

TMJ 1 : 0.098 unit/ml

TMJ 2 : 0.020 unit/ml

Pengujian aktivitas protease menunjukkan aktivitas protease yang tertinggi dihasilkan oleh sel hasil transformasi, TMJ 1 disusul oleh *Bacillus licheniformis* dan TMJ 2. Aktivitas protease TMJ 1 jauh melebihi induknya yaitu *Bacillus*

licheniformis, sedangkan aktivitas protease yang dihasilkan sel TMJ 2 relatif tidak jauh berbeda dengan protease yang dihasilkan *Bacillus licheniformis*. Hal ini mungkin disebabkan karena media yang dipakai untuk menghasilkan enzim protease yaitu Nutrient Broth dan faktor-faktor lain yang mempengaruhi fermentasi seperti lama fermentasi, suhu dan lain-lain lebih cocok untuk TMJ 1 dibandingkan dengan *Bacillus licheniformis*.

10. Integrasi DNA Donor Dengan DNA Sel Inang

Watson di dalam Sudding (1990) menjelaskan bahwa DNA donor yang masuk ke dalam suatu sel, akan berintegrasi dengan DNA sel inang yang bersangkutan. Integrasi ini menyebabkan perubahan genetika dari sel inang. Umumnya integrasi DNA donor dengan DNA kromosom sel inang terjadi secara pindah silang antara pasangan-pasangan basa yang homolog dari DNA donor dengan DNA sel inang.

Mekanisme integrasi antara DNA sel donor dengan DNA sel inang belum sepenuhnya diketahui. Menurut Brock (1974), DNA yang masuk ke dalam sel akan terurai menjadi untai tunggal. Untai tunggal yang terbentuk ini akan berintegrasi dengan DNA sel inang pada pasangan-pasangan basa yang

homolog sambil menyisipkan untai bebas lainnya, dengan demikian akan terbentuk suatu hibrida DNA. Pada saat replikasi, akan terbentuk dua tipe untai DNA dari hibrida DNA. Satu untai berasal dari induknya sedangkan untai yang lain merupakan hasil rekombinasi. Dari untai DNA hasil rekombinasi inilah kemudian akan terbentuk sel hasil transformasi.

Karena umumnya *Eschericia coli* mempunyai plasmid (Fardiaz, 1988), maka nasib DNA yang masuk ke dalam sel *Eschericia coli* mempunyai beberapa kemungkinan antara lain (Sudding, 1990):

1. Jika DNA donor tidak berhasil masuk ke dalam inti sel, kemungkinan DNA donor tersebut berintegrasi dengan DNA plasmid dari sel inang yang mempunyai rangkaian basa-basa yang homolog.
2. DNA donor yang masuk tidak berintegrasi dengan DNA inang. Dalam hal ini fragmen-fragmen DNA ini akan membentuk DNA sel lingk- kar di dalam sel inang dan bereplikasi sen- diri.
3. Kemungkinan ketiga adalah DNA donor berhasil masuk ke dalam inti sel dan berintegrasi

dengan DNA kromosom sel inang yang mempunyai rangkaian-rangkaian basa yang homolog.

11. Ekspresi Genetika *Bacillus licheniformis* dalam sel *Eschericia coli*

Ekspressi gen-gen sel donor ke dalam sel inang yang ditransformasi, dapat dipelajari dari sifat-sifat sel hasil transformasi (Sudding, 1990)

Hasil-hasil pengujian yang dilakukan terhadap sel hasil transformasi, *Bacillus licheniformis* dan *Eschericia coli* dapat terlihat pada tabel 6 di bawah:

Tabel 6. Perbandingan sel hasil transformasi dengan kedua induknya

No.	Aspek pengujian	Mikroorganisme			
		<i>Bl</i>	<i>Ec</i>	TMJ 1	TMJ 2
1.	Hidrolisa pati	+	-	+	+
2.	Hidrolisa gelatin	+	-	+	+
3.	Hidrolisa kasein	+	-	+	+
4.	Voges Proskauer	+	-	+	-
5.	Metil merah	-	+	-	+

Keterangan: *Bl* = *B. licheniformis*
Ec = *Eschericia coli*

Hasil-hasil yang diperoleh seperti yang ditunjukkan tabel 6 di atas merupakan bukti-bukti bahwa gen-gen yang terdapat dalam DNA sel donor yaitu *Bacillus licheniformis* terekspresi dalam sel inang yang telah mengalami transformasi. Selain DNA sel donor, juga dibuktikan bahwa DNA sel inang sendiri masih terekspresi dalam sel hasil transformasi seperti yang ditunjukkan oleh sel TMJ 2.

Hasil penelitian ini menunjukkan persamaan dengan beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya antara lain oleh Salim (1988) dari ITB yang melakukan transfer DNA *Streptomyces sp* ke dalam protoplas *E. coli*. Hasil penelitiannya menunjukkan sel hasil transformasi menunjukkan adanya persamaan sifat dengan kedua induknya. Penelitian oleh Sudding (1990) juga dari ITB yaitu Transfer DNA *B. subtilis* ke Dalam Sel *S. cerevisiae*. Hasil penelitiannya dapat diringkas sebagai berikut :

Tabel 7. Perbandingan sel hasil transformasi dengan kedua induknya (Sudding, 1990)

No.	Aspek yang diuji	Sc	Bs	Tr [*]
1.	Kemampuan tumbuh dalam media NBA	-	+	+
2.	Hidrolisa pati	-	+	+
3.	Hidrolisa gelatin	-	+	+
4.	Fermentasi glukosa jadi alkohol	+	-	+
5.	Fermentasi pati jadi alkohol	-	-	+
6.	Menghasilkan antibiotik	-	+	+
7.	Morfologi sel	bulat	batang	batang

* Sc = *Saccharomyces cerevisiae*

Bs = *Bacillus subtilis*

Tr = Transforman

Menurut Lewin di dalam Sudding (1990), syarat disintesisnya suatu enzim adalah gen-gen strukturalnya harus utuh. Dengan positifnya pengujian-pengujian di atas menunjukkan bahwa gen-gen struktural yang bertanggung jawab untuk mensintesa enzim-enzim yang bersangkutan, ter-transfer secara utuh dalam sel hasil transformasi.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta, Merek Dagang, dan Paten

1. Dilindungi undang-undang sebagai karya intelektual yang merupakan hasil dari proses kreatif dan intelektual manusia.
2. Tidak dapat ditiru atau dipertahankan secara fisik atau digital tanpa izin dari IPB University.
3. Tidak dapat diperjualbelikan atau diwariskan.
4. Tidak dapat digunakan untuk tujuan komersial tanpa izin dari IPB University.
5. Tidak dapat digunakan untuk tujuan politik, agama, atau rasial.
6. Tidak dapat digunakan untuk tujuan yang melanggar hukum.

V. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil percobaan yang telah dilakukan maka dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Tehnik transformasi DNA dengan metoda pembentukan speroplas oleh $CaCl_2$ dapat diterapkan terhadap bakteri dari spesies yang berbeda dimana *Bacillus licheniformis* digunakan sebagai donor DNA dan *Escherichia coli* sebagai sel inang.
2. Dinding sel bakteri gram positif, khususnya *B. licheniformis* yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri gram negatif karena mengandung lapisan peptidoglikan yang tebal yang terdiri dari N-Asetil Muramat dan N-Asetil Glukosamin dapat dilisis dengan menggunakan Sodium Dodecyl Sulfat 25% dan sonikator frekuensi 100 kHz tanpa pemakaian lisozym.
3. Karakterisasi DNA yang terekstrak dari *Bacillus licheniformis* dalam percobaan ini menghasilkan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 270.9 nm dan menunjukkan bahwa DNA yang berhasil diisolasi masih belum murni berdasarkan nilai perbandingan A_{260}/A_{280} 0.1292, jauh di bawah nilai perbandingan A_{260}/A_{280} DNA murni yaitu 1.8 .
4. Dengan tehnik transformasi ini dapat dihasilkan sel hasil transformasi yang mampu mengekspresikan sifat-sifat genetika dari kedua induknya.

5. Sel hasil transformasi selain mengekspresikan sifat dari kedua induknya juga menunjukkan perbedaan dalam morfologi dan ukuran sel dibandingkan dengan kedua induknya
6. Gen-gen struktural dari sel donor yang menghasilkan enzim-enzim proteolitik, amilase tertransfer secara utuh ke dalam sel inang.
7. Gen-gen dari sel donor yang menunjukkan sifat dapat menghasilkan asetil metil karbinol tertransfer ke dalam TMJ 1 akan tetapi tidak pada TMJ 2. Demikian juga dengan sifat sel inang yang dapat menurunkan pH medium yang mengandung glukosa 0.5% juga hanya terdapat pada salah satu sel hasil transformasi, TMJ 2. Hal ini menunjukkan bahwa sel hasil transformasi mengandung gen-gen dari sel inang maupun sel donor.

VI. SARAN

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk menjajaki kemungkinan keberhasilan transformasi DNA dari *Bacillus licheniformis* yang dapat memproduksi enzim proteolitik ke dalam sel lainnya sehingga sel tersebut juga dapat memproduksi enzim proteolitik. Dalam penelitian ini masih terdapat banyak hal yang belum sempat dilakukan karena keterbatasan waktu. Untuk itu perlu penelitian lanjutan mengenai:

- a. Penyempurnaan cara ekstraksi dan pemurnian DNA untuk mendapatkan DNA yang lebih murni.
- b. Kondisi-kondisi yang terbaik dalam melakukan transformasi dan faktor-faktor yang berpengaruh terhadap efisiensi transformasi.

Hal lain yang memerlukan penelitian lanjutan adalah sifat-sifat sel hasil transformasi sehingga dapat diperoleh data yang lengkap dari sel hasil transformasi ini. Dengan mengetahui sifat-sifat sel hasil transformasi ini secara lengkap diharapkan dapat terungkap lebih banyak rahasia mengenai transformasi DNA juga kemungkinan pemanfaatannya secara ekonomis mengingat aktivitas protease yang dihasilkan oleh sel hasil transformasi ini cukup tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

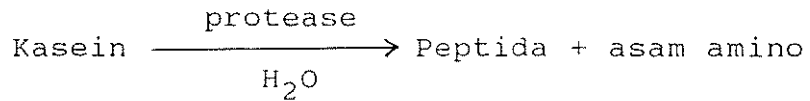
- Aunstrup, K. 1978. Production, Isolation and Economic of Extracelullar Enzymes. Di dalam L.B. Wingard, E.K. Katsir, L. Goldstein (eds.) Applied Biochemistry and Bioengineering. Vol II. Academic Press. New York.
- Bergmans, H.E.N, I.M. van Die, W.P.M. Hoekstra. 1981. Transformation in *Eschericia coli*: Stages in Process. Journal of Bacteriology 146:564-570
- Bergmeyer, H.U. dan M.G. Grassl. 1983. Methods of Enzymatic Analysis vol: II. Verlag Chemie. Weinheim.
- Bisset, K.A. 1963. Bacteria. E & S Livingstone, Ltd. Edinburgh and London.
- Brock, T.D. 1974. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Buchanan, R.E. dan N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology eight edition. The Williams & Williams Company. Baltimore.
- Clark, J.M. dan Switzer, R.L. 1977. Experimental Biochemistry. Second Edition. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- Clifton, C.E. 1958. Introduction to The Bacteria. Kogakusha Co., Ltd. Tokyo.
- Darnel, J., et al. 1986. Molecular Cell Biology. Scientific American Books, Inc. New York.
- DeBusk, A.G. 1980. Molecular Genetics. The Macmillan Company. New York.
- DeRobertis, E.D.P., et al. 1975. Cell Biology. W.B. Saunders Company. London.
- Dubnau, D.A. 1985. The Molecular Biology of The Bacilli vol II. Academic Press, Inc. New York.
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi - IPB. Bogor

- Fogarty, W.M. dan C.T. Kelly. 1979. Developments in Microbial Extracelullair Enzymes. Di dalam A. Wiseman (ed.). Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology vol III. John Willey & Sons. New York.
- Gardner, E.J. dan D.P. Snustad. 1984. Principle of Genetic, 7th edition. John Willey & Sons, Inc. New York.
- Gordon, R.E. 1972. The Genus of Bacillus. Di dalam A.I. Lanskin dan H.A. Lechevalier (eds.). The Handbook of Microbiology. CRC Press. New Jersey.
- Hanlon, G.W. dan N.A. Hodges. 1981. Bacitracin and Protease Production in Relation to Sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. Journal of Bacteriology. 147:427-431
- Jenie, B.S.L. dan Fardiaz, S. 1989. Uji Sanitasi dalam Industri Pangan. PAU Pangan dan Gizi - IPB. Bogor
- Kaplan, S. dan C.S. Fornari. 1982. Genetic Transformation of *Rhodopseudomonas sphaeroides* by Plasmid DNA. Journal of Bacteriology. 152: 89-97
- Kiss, I (ed.). 1984. Testing Methods in Food Microbiology. Elsevier. Amsterdam.
- Levy, J., J.J.R. Campbell, T.H. Blackburn. 1973. Introductory Microbiology. John Willey & Sons Ltd. New York.
- Malik, V.S. 1981. Recombinant DNA Technology. Di dalam D. Perlman dan A.I. Laskin (eds.). Advances in Applied Microbiology vol. 27. Academic Press. New York.
- Primrose, S.B. dan R.W. Old. 1985. Principles of Gene Manipulation. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Rodriguez, R.L. dan C. Tait. 1988. Recombinant DNA Techniques An Introduction. The Benyamin/Cumming Publishing Co., Inc. London.
- Salim, M. 1988. Transformasi DNA *Streptomyces sp* Ke Dalam Protoplas *E. coli*. Fakultas Pasca Sarjana ITB.
- Singleton, P. dan D. Sainsbury. 1978. Dictionary of Microbiology. John Willey & Sons Ltd. New York.

- Stanier, R.Y., M. Doudoroff, E.A. Adelberg. 1963. *Microbial World*. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Stent, G.S. 1978. *Molecular Genetics*. W.H. Freeman and Co. San Francisco.
- Sudding. 1990. *Transfer DNA Bacillus subtilis Ke Dalam Sel Saccharomyces cerevisiae*. Tesis S2. ITB. Bandung.
- Suhartono, M.T. 1990. *Metode Di Dalam Biologi Molekuler*. PAU Bioteknologi - IPB. Bogor.
- Tanooka, H. 1973. *Transformation of Germinated Spores of Bacillus subtilis on Agar Plates*. *Journal of Bacteriology* 114:445-447.
- Uehara, H., Yoneda, Y., Yamane, K., Maruo B. 1974. *Regulation of Neutral Protease Productivity in Bacillus subtilis: Transformation of High Protease Productivity*. *Journal of Bacteriology* 119:82-91.
- Volk, W.A. dan M.F. Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Diterjemahkan oleh Markam. Erlangga. Jakarta.
- Ward, O.P. 1983. *Proteinases*. Di dalam W.M. Fogarty (ed.). *Microbial and Enzyme Biotechnology*. Applies Science Publisher. New York.
- Wirahadikusumah, M. 1983. *Biokimia*. ITB. Bandung.
- Young, M. dan Mandelstam. 1980. *Early Events during Bacterial Endospore Formation*. *Advances in Microbial Physiology* 20:103-162.

Lampiran 1. Metoda analisis enzim protease (Bergmeyer dan Grassl, 1983)

A. PRINSIP



Laju pembentukan peptida dan asam amino dari reaksi di atas dapat dijadikan tolok ukur aktivitas katalitis dari enzim protease. Asam-asam amino yang sudah terbentuk harus dipisahkan dari substrat yang tersisa. Cara yang paling umum digunakan adalah menggunakan trikloroasetat (TCA) atau asam perklorat. Asam-asam amino yang telah terisolasi dapat diukur absorbansinya pada 280 nm atau diwarnai dahulu dengan pereaksi Folin Ciocalteau's agar dapat dilakukan pembacaan pada daerah sinar tampak

Prinsip ini dapat diaplikasikan pada hampir semua jenis protease. Kondisi optimal untuk protease-protease tertentu dapat dilakukan dengan mengatur kondisi fisik dan kimia selama analisis. Metode yang telah diuraikan seperti pada bab III terutama ditujukan untuk protease yang banyak dihasilkan *Bacillus sp*

B. PEREAKSI

Bahan-bahan yang digunakan untuk pereaksi harus bebas dari enzim protease dan inhibitornya. Bahan-bahan yang digunakan ialah :

(1) Asam klorida (1 M)

Encerkan 9.8 ml HCl pekat (minimal 32%) menjadi 72 ml.

(2) Buffer borat pH 8.0

Larutan A: 12.4 g asam borat dalam 1 liter H₂O

Larutan B: 19.05 g boraks dalam 1 liter H₂O

Campurkan 50 ml larutan A dengan 4.9 ml larutan B dan encerkan sampai 200 ml.

(3) NaOH (1 M)

Larutkan 4 g NaOH dalam 100 ml H₂O

(4) Larutan buffer-kasein 2% (w/v)

Suspensikan 1 g kasein dengan kira-kira 5 ml H₂O dalam gelas piala 100 ml. Tambahkan NaOH 1M dan 30 ml H₂O serta aduk hingga semua kasein larut. Tambahkan 5 ml buffer borat dan tepatkan pH-nya menjadi 8.0 dengan HCL. Tepatkan volumenya menjadi 50 ml.

(5) Larutan Tirosin standar (5 mmol/L)

Larutkan 45.3 mg Tirosin dalam 50 ml H₂O

(6) HCl (0.05 M)

Larutkan 1 ml HCl (1) dengan 19 ml H₂O

(7) Asam trikloroasetat (0.1 M)

Larutkan 16.3 g TCA dalam 1 liter H₂O

(8) CaCl₂ (12 mmol/L)

Larutkan 66.5964 mg CaCl₂ dalam 50 ml H₂O

(9) CaCl₂ (2 mmol/L)

Tambahkan 30 ml H₂O ke dalam 6 ml larutan CaCl₂

(8)

(10) Na₂CO₃ (0.4 M)

Larutkan 42.397 g Na₂CO₃ dalam 1 liter H₂O

(11) Folin Ciocalteau's

Larutkan 40 ml larutan Folin dengan 80 ml H₂O

(12) Larutan enzim

Tambahkan 0.2 ml larutan (8) terhadap 1 ml enzim yang akan dianalisa

STABILISASI PEREAKSI :

- (a) Larutan buffer-kasein harus disiapkan tiap hari
- (b) Buffer dan tirosin standar harus disimpan pada suhu 4°C dan stabil selama 2 minggu
- (c) Pereaksi lainnya dapat disimpan pada suhu kamar

Lampiran 2. Media-media dan bahan-bahan kimia yang digunakan untuk isolasi DNA.

(1) Nutrient Agar

Digunakan Nutrient Agar dalam bentuk yang telah jadi dengan merek DIFCO.

(2) Nutrient Broth

Digunakan dalam bentuk media yang telah jadi dengan merek DIFCO.

(3) Buffer SET

Terdiri dari 20% sukrosa, 50 mM Tris-HCl pH 7.6 dan 50 mM EDTA.

Larutkan 3.025 g Tris(hidroksi metil) amino metan dalam 375 ml akuades, titrasi dengan HCl 4 N hingga pH 7.6. Masukkan 100 g sukrosa dan 0.1935 g EDTA. Setelah bahan-bahan larut sempurna, tambahkan akuades hingga volumenya 500 ml.

(4) Sodium Dodecyl Sulfat 25 %

Larutkan 25 g SDS dalam akuades hingga volumenya 100 ml.

(5) Kloroform : isoamil alkohol (24:1)

Kloroform pekat 480 ml dimasukkan ke dalam labu takar 500 ml dan ditepatkan volumenya dengan isoamil alkohol pekat.

(6) NaClO_4 (5 M)

Larutkan 0.6125 g NaClO_4 ke dalam 50 ml akuades, kemudian tepatkan volumenya menjadi 100 ml.

(7) NaCl (5 M)

Larutkan 292.5 g NaCl ke dalam 1 liter H₂O

(8) Etanol 70 %

Etanol 96% sebanyak 729.17 ml ditepatkan volumenya menjadi 1 liter dengan H₂O.

(9) Etanol dingin : NaCl 5 M (10 : 1)

Etanol 70% (8) sebanyak 100 ml ditambahkan dengan 10 ml NaCl 5 M (7) dan diaduk hingga merata.

(10) Buffer TEN

Terdiri dari 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA dan 10 mM NaCl.

Larutkan 0.607 g Tris dalam 450 ml akuades, titrasi dengan HCl 4 N hingga pH 7.6. Masukkan 0.1861 g EDTA dan 0.2925 g NaCl. Setelah bahan-bahan larut sempurna tambahkan akuades hingga 500 ml.

Lampiran 3. Media-media dan bahan-bahan kimia untuk Transformasi DNA

(1) CaCl_2 (0.1 M)

Larutkan 1.47 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 100 ml H_2O

(2) Buffer TE

Terdiri dari 10 mM Tris-HCl pH 8.0 dan 1 mM EDTA

Larutkan 0.607 g Tris dalam 450 ml akuades, titrasi dengan HCl 4 N hingga pH 8.0 kemudian larutkan 0.1861 g EDTA dan tepatkan volumenya hingga 500 ml.

(3) Luria Broth

Terdiri dari :	Ekstrak khamir	0.5 %
	NaCl	1 %
	Tripton	1 %

Lampiran 4. Media-media dan bahan-bahan kimia yang digunakan untuk uji sifat sel hasil transformasi dan kedua induknya

(1) Nutrient Agar + 1 % kasein

Larutkan 1 % Casein nach Hammerstein ke dalam larutan Nutrient Agar

(2) Starch Agar

Terdiri dari :	Tryptone	10 g
	Ekstrak khamir	10 g
	K_2HPO_4	5 g
	Soluble starch	3 g
	Agar	15 g
	Akuades	1 liter

(3) Larutan Gram's Iodine

Larutkan 1 g Iodium dan 2 g KI ke dalam akuades 300 ml.

(4) KOH 40 % (w/v)

Larutkan 40 g KOH ke dalam 100 ml H_2O

(5) Larutan 0.5% (w/v) alfa-naftol dalam alkohol absolut

Larutkan 0.5 g alfa naftol dalam alkohol 95%

(6) MR - VP medium

Terdiri dari :	Polipepton	7.0 g
	Glukosa	5.0 g
	K_2HPO_4	5.0 g
	Akuades	1.0 liter
	pH	6.9

(7) Nutrient Gelatin

Terdiri dari :	Ekstrak daging	0.3 g
	Pepton	0.5 g
	Gelatin	12.0 g
	Agar	1.0 g
	Akuades	100.0 ml