

KONSTRUKSI KASET *sacB* *Bacillus* sp. ASAL KUE TALAM UNTUK SISTEM SELEKSI NEGATIF PADA *Escherichia coli*

KANIA DEWI SHIYAM



PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Konstruksi Kaset *sacB Bacillus* sp. asal Kue Talam untuk Sistem Seleksi Negatif pada *Escherichia coli*” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2026

Kania Dewi Shiyam
G3501251026



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

KANIA DEWI SHIYAM. Konstruksi Kaset *sacB* *Bacillus* sp. asal Kue Talam untuk Sistem Seleksi Negatif pada *Escherichia coli*. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO dan ARIS TRI WAHYUDI.

Sistem seleksi negatif merupakan strategi penting dalam rekayasa genetika *Escherichia coli* untuk menyeleksi mutan tanpa meninggalkan marka resistensi antibiotik melalui eliminasi sel yang masih membawa gen target. Berbagai sistem seleksi negatif telah dikembangkan, salah satu yang paling banyak digunakan ialah memanfaatkan gen *sacB*, penyandi enzim levansukrase (EC 2.4.1.10). Enzim ini mengatalisis reaksi transfruktosilasi, yaitu menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa sekaligus mempolimerisasi residu fruktosa menjadi fruktan bertautan β -(2,6) yang disebut levan. Ketidadaan mekanisme sekresi levan ke lingkungan ekstraselluler pada *E. coli* sebagai bakteri Gram-negatif menyebabkan akumulasi polimer levan di ruang periplasma. Kondisi tersebut memicu gangguan tekanan osmotik hingga mengakibatkan sel lisis. Sistem seleksi negatif berbasis *sacB* umumnya terbatas menggunakan varian *sacB* dari *Bacillus subtilis* (473 aa), salah satunya dibawa oleh plasmid pMH1701. Analisis sekuens asam amino menunjukkan bahwa berbagai spesies *Bacillus* memiliki gen homolog *sacB* dengan variasi panjang sekuens, seperti *B. inaquosorum*, *B. spizizenii*, *B. mojavensis*, *B. halotolerans*, *B. vallismortis*, *B. stercoris*, dan *B. amyloliquefaciens* (473 aa), *B. megaterium* (333 aa), serta *B. licheniformis* (482 aa). Keragaman sekuens ini berpotensi menghasilkan tingkat letalitas yang berbeda pada *E. coli*. Meskipun eksplorasi *sacB* untuk overproduksi biopolimer levan telah banyak dilakukan, pemanfaatannya sebagai marka seleksi negatif masih belum banyak dieksplorasi. Penelitian ini bertujuan mengisolasi fragmen gen homolog *sacB* *Bacillus* sp. asal kue basah, mengonstruksi menjadi kaset *sacB* berbasis pUC19, serta mengevaluasi letalitasnya pada *E. coli* DH5 α di media yang mengandung sukrosa 5% dengan pMH1701 sebagai kontrol positif.

Rangkaian penelitian diawali dengan skrining berbagai sampel kue basah untuk mendapatkan lendir sebagai indikator fenotipe sintesis levan oleh levansukrase. Sampel kue basah yang menunjukkan fenotipe berlendir dilanjutkan ke tahap *enrichment* *Bacillus* sp. melalui pemanasan suhu 85°C selama 10 menit untuk menyeleksi endospora *Bacillus* sp., dikonfirmasi melalui pewarnaan endospora, dan diidentifikasi secara molekuler berdasarkan sekuensing gen 16S rRNA memiliki kedekatan tertinggi dengan *Bacillus stercoris* (identitas 99,78%) dan *Bacillus amyloliquefaciens* (identitas 100%). Fragmen *coding sequence* (CDS) gen *sacB* diamplifikasi dari kedua isolat, kemudian dikloning ke dalam pUC19 memanfaatkan situs pemotongan *Sma*I. Penggabungan CDS *sacB* dengan promotor *lac* dan situs pengikat ribosom bawaan pUC19 menghasilkan kaset *sacB* pKDS02 (*sacB* diduga *B. stercoris*) dan pKDS17 (*sacB* diduga *B. amyloliquefaciens*). Karakterisasi molekuler melalui sekuensing Sanger menganalisis orientasi serta variasi nukleotida dan asam amino kaset. Evaluasi letalitas dilakukan pada media Luria Agar (LA) yang mengandung Ampisilin, IPTG, dan sukrosa 5% melalui *spread assay* dan *spot assay* (pengenceran 10⁻⁴ hingga 10⁻⁶). Aktivitas fungsional kaset diuji secara kuantitatif melalui uji *dinitrosalicylic acid* (DNS) pada panjang



gelombang 540 nm untuk mengukur konsentrasi gula pereduksi (glukosa) hasil hidrolisis sukrosa oleh levansukrase.

Hasil karakterisasi molekuler menunjukkan kaset *sacB* pada pKDS02 memiliki orientasi *antisense* (berlawanan dengan promotor *lac*) dengan identitas 82,7% terhadap *sacB B. subtilis* 168 dan akumulasi mutasi pada 51 posisi asam amino. Kaset *sacB* pada pKDS17 tersusun dalam orientasi *sense* (searah dengan promotor *lac*) dengan identitas sekuens 99,3% terhadap *sacB B. subtilis* 168, serta memiliki tiga mutasi *nonsynonymous* (A29V, S204N, N472D). Uji letalitas pada media sukrosa 5% menunjukkan kaset pKDS02 menghasilkan letalitas 100% pada *spread assay*, namun berhasil meloloskan koloni (*escape colonies*) pada *spot assay* pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} . Sementara itu, kaset *sacB* pKDS17 menghasilkan letalitas total (100%) baik pada *spread assay* maupun *spot assay* setara dengan kontrol positif pMH1701. Uji kuantitatif DNS selaras dengan fenotipe letalitas yang teramati. Ekspresi kaset *sacB* pada pKDS02 menghasilkan konsentrasi gula pereduksi yang rendah ($0,19 \pm 0,01$ mg/mL). Hal ini dimungkinkan oleh fenomena interferensi transkripsi atau ekspresi basal dari promotor kriptik akibat orientasi *antisense*, yang diperparah oleh akumulasi 51 mutasi *missense* pada rantai asam aminonya sehingga produksi levan tidak mencapai ambang batas letalitas sel. Di sisi lain, ekspresi pKDS17 di bawah kendali promotor *lac* menghasilkan konsentrasi gula pereduksi sebesar $3,27 \pm 0,14$ mg/mL melampaui pKDS02 maupun kontrol positif pMH1701 ($0,74 \pm 0,06$ mg/mL) hingga empat kali lipat. Sementara itu, kontrol negatif pUC19 tanpa sisipan tidak memperlihatkan aktivitas hidrolisis sukrosa yang signifikan ($0,02 \pm 0,00$ mg/mL gula pereduksi), menegaskan bahwa seluruh aktivitas katalitik tersebut murni disebabkan oleh ekspresi kaset gen *sacB*.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kaset *sacB* pKDS02 tidak efektif digunakan sebagai marka seleksi negatif karena menghasilkan fenotipe *escape colonies* dan kadar gula pereduksi yang rendah. Akan tetapi, penelitian ini berhasil mengonstruksi kaset *sacB* diduga dari *B. amyloliquefaciens* (pKDS17) yang terbukti efektif sebagai marka seleksi negatif pada *E. coli* dengan tingkat letalitas mencapai 100% pada uji kualitatif dan menghasilkan kadar gula pereduksi yang tinggi. Keberhasilan pKDS17 menegaskan potensinya sebagai kaset seleksi negatif yang portabel untuk dikloning ke dalam sistem vektor ekspresi rekayasa genetika yang telah dibekali sekuens penghenti transkripsi (terminator).

Kata kunci: *Bacillus amyloliquefaciens*, levansukrase, pKDS17, pMH1701, sukrosa

SUMMARY

KANIA DEWI SHIYAM. Construction of *sacB* Cassette from *Bacillus* sp. Isolated from Kue Talam for Negative Selection System in *Escherichia coli*. Supervised by ANTONIUS SUWANTO, and ARIS TRI WAHYUDI.

Negative selection systems are a crucial strategy in the genetic engineering of *Escherichia coli* to select mutants without leaving antibiotic resistance markers through the elimination of cells retaining the target gene. Various negative selection systems have been developed, with one of the most widely used relying on the *sacB* gene, which encodes the enzyme levansucrase (EC 2.4.1.10). This enzyme catalyzes a transfructosylation reaction, hydrolyzing sucrose into glucose and fructose while simultaneously polymerizing fructose residues into β -(2,6)-linked fructans known as levan. The absence of an extracellular levan secretion mechanism in *E. coli*, as a Gram-negative bacterium, leads to the accumulation of levan polymers within the periplasmic space. This accumulation induces osmotic pressure disruption, ultimately triggering cell lysis. However, *sacB*-based negative selection systems are generally limited to the use of the *sacB* variant from *Bacillus subtilis* (473 aa), such as the one carried by plasmid pMH1701. Amino acid sequence analysis indicates that various *Bacillus* species harbor homologous *sacB* genes with varying sequence lengths, such as *B. inaquosorum*, *B. spizizenii*, *B. mojavensis*, *B. halotolerans*, *B. vallismortis*, *B. stercoris*, and *B. amyloliquefaciens* (473 aa), *B. megaterium* (333 aa), and *B. licheniformis* (482 aa). This sequence diversity has the potential to yield differing levels of lethality in *E. coli*. Although the exploration of *sacB* for levan biopolymer overproduction has been widely reported, its application as a negative selection marker remains under-explored. This study aims to isolate the homologous *sacB* gene fragment from *Bacillus* sp. originating from *kue basah* (a traditional Indonesian cake), construct it into a pUC19-based *sacB* cassette, and evaluate its lethality in *E. coli* DH5 α on media containing 5% sucrose, using pMH1701 as a positive control.

The study commenced with the screening of various traditional cake samples to detect slime formation as a phenotypic indicator of levan synthesis by levansucrase. The *kue basah* sample exhibiting a slimy phenotype was subjected to *Bacillus* sp. enrichment via thermal treatment at 85°C for 10 minutes to select for *Bacillus* sp. endospores, confirmed through endospore staining, and molecularly identified via 16S rRNA gene sequencing. The isolate shared the highest sequence identity with *Bacillus stercoris* (99.78% identity) and *Bacillus amyloliquefaciens* (100% identity). Coding sequence (CDS) fragments of the *sacB* gene were amplified from both isolates and subsequently cloned into pUC19 utilizing the *Sma*I restriction site. The fusion of the *sacB* CDS with the *lac* promoter and native ribosome binding site of pUC19 yielded the *sacB* cassettes pKDS02 (putative *B. stercoris sacB*) and pKDS17 (putative *B. amyloliquefaciens sacB*). Molecular characterization via Sanger sequencing analyzed the cassette orientation as well as nucleotide and amino acid variations. Lethality evaluation was conducted on Luria Agar (LA) media containing ampicillin, IPTG, and 5% sucrose using spread assays and spot assays (10^{-4} to 10^{-6} dilutions). Functional activity of the cassettes was quantitatively assayed using the dinitrosalicylic acid (DNS) method at a wavelength



of 540 nm to measure the concentration of reducing sugars (glucose) resulting from sucrose hydrolysis by levansucrase.

Molecular characterization revealed that the *sacB* cassette in pKDS02 was in an antisense orientation (opposite to the *lac* promoter), exhibiting 82.7% sequence identity to *B. subtilis* 168 *sacB* and accumulating mutations at 51 amino acid positions. Conversely, the *sacB* cassette in pKDS17 was assembled in a sense orientation (co-directional with the *lac* promoter), sharing 99.3% sequence identity with *B. subtilis* 168 *sacB* and carrying three nonsynonymous mutations (A29V, S204N, and N472D). The lethality assay on 5% sucrose media demonstrated that pKDS02 conferred 100% lethality in the spread assay, yet allowed escape colonies to emerge in the spot assay at 10^{-4} and 10^{-5} dilutions. Meanwhile, the pKDS17 *sacB* cassette resulted in complete lethality (100%) in both spread and spot assays, matching the performance of the positive control pMH1701. Quantitative DNS assays aligned with the observed lethal phenotypes. Expression of the *sacB* cassette in pKDS02 produced a low concentration of reducing sugars (0.19 ± 0.01 mg/mL). This is likely attributable to transcriptional interference or basal expression driven by a cryptic promoter due to the antisense orientation, compounded by the accumulation of 51 missense mutations across its amino acid chain, which prevented levan production from reaching the threshold required for cell death. On the other hand, pKDS17 expression under the control of the *lac* promoter yielded a reducing sugar concentration of 3.27 ± 0.14 mg/mL, exceeding both pKDS02 and the positive control pMH1701 (0.74 ± 0.06 mg/mL) by up to fourfold. Meanwhile, the insertless negative control pUC19 showed no significant sucrose hydrolysis activity (0.02 ± 0.00 mg/mL reducing sugars), confirming that all catalytic activity was driven purely by the expression of the *sacB* gene cassette.

This study demonstrates that the pKDS02 *sacB* cassette is ineffective for use as a negative selection marker due to the occurrence of escape colonies and low reducing sugar production. However, this study successfully constructed a *sacB* cassette derived from putative *B. amyloliquefaciens* (pKDS17), which proved highly effective as a negative selection marker in *E. coli*, achieving 100% lethality in qualitative assays and generating high levels of reducing sugars. The robust performance of pKDS17 highlights its potential as a portable negative selection cassette for cloning into genetic engineering expression vectors equipped with transcription terminators.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, levansucrase, pKDS17, pMH1701, sucrose



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2026¹
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

KONSTRUKSI KASET *sacB* *Bacillus* sp. ASAL KUE TALAM UNTUK SISTEM SELEKSI NEGATIF PADA *Escherichia coli*

KANIA DEWI SHIYAM

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Mikrobiologi

**PROGRAM STUDI MIKROBIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tim Penguji pada Ujian Tesis:
1 Yogiara, S.Si., M.Si., Ph.D

Perpustakaan IPB University



Judul Tesis : Konstruksi Kaset *sacB Bacillus* sp. asal Kue Talam untuk Sistem Seleksi Negatif pada *Escherichia coli*
Nama : Kania Dewi Shiyam
NIM : G3501251026

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc.

Pembimbing 2:

Prof. Dr. Aris Tri Wahyudi, M.Si.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Prof. Dr. Anja Meryandini, M.S.

NIP 196203271987032001

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam:

Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si.

NIP 197807232007011001

Tanggal Ujian:
7 Agustus 2026

Tanggal Lulus:



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak November 2025 sampai Juni 2026 ini ialah rekayasa genetika, dengan judul “Konstruksi Kaset *sacB* *Bacillus* sp. asal Kue Talam untuk Sistem Seleksi Negatif pada *Escherichia coli*”.

Penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc. dan Prof. Dr. Aris Tri Wahyudi, M.Si. selaku dosen komisi pembimbing yang telah memberikan banyak saran, arahan, serta motivasi selama penelitian hingga penyusunan karya ilmiah ini. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S. selaku Dosen Moderator Kolokium, Dr. Yopi Novita, S.Pi., M.Si. selaku Dosen Moderator Seminar, Yogiara, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Dosen Penguji Luar Komisi, Prof. Dr. Dra. Triadiati, M.Si. selaku Dosen Perwakilan Prodi pada Ujian Tesis, serta seluruh dosen dan tendik di Departemen Biologi dan Program Studi Mikrobiologi yang telah membantu proses penyempurnaan karya ilmiah ini. Dukungan finansial dan kesempatan luar biasa dari IPB University melalui beasiswa *fast-track* SINERGI 2024 juga sangat disyukuri karena telah membekali penulis dengan banyak wawasan baru selama menjalani program sarjana dan magister.

Rasa terima kasih yang mendalam penulis persembahkan kepada keluarga terkasih, yaitu Prof. Dr. Roni Ridwan, S.Pt., M.Si., Tika Sundari, S.Pt., M. Aqil Arrasyid, Aisha Dewi Humaira, Siti Aminah, dan Rohayati Fatimah, serta keluarga besar Sumedang dan Cianjur yang senantiasa memberikan dukungan, doa, bimbingan, dan menjadi ruang diskusi hangat hingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan pascasarjana ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada rekan-rekan SINERGI 2024, Fatmila Amirah Radwa dan Annisa Fitria, atas bantuan, perhatian, semangat, dan kebersamaan sebagai kawan berdiskusi selama masa studi. Apresiasi dan terima kasih turut disampaikan kepada kakak-kakak serta teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia (Kak Ramdhan, Kak Bani, Kak Mustava, Kak Prima, Kak Ilham, Kak Nauval, Kak Rahman, Kak Yutri, Kak Lala, Kak Nurhasanah, Najla, Hawa, dan Laili) atas kebersamaan dan dukungannya selama kegiatan di laboratorium. Tidak lupa, penulis mengapresiasi seluruh laboran serta anggota dari Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, Laboratorium BIORIN, dan Laboratorium Mikrobiologi, serta rekan-rekan mahasiswa Mikrobiologi Angkatan 2024 dan Biologi Angkatan 58 atas diskusi, bantuan, dan indahnya kebersamaan selama menjalani studi dan penelitian ini.

Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan serta memberikan kontribusi nyata bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2026

Kania Dewi Shiyam

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	3
1.5 Kebaruan	3
1.6 Hipotesis	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Rekayasa Genetika <i>Escherichia coli</i>	4
2.2 Sistem Seleksi pada <i>Escherichia coli</i>	5
2.3 Gen <i>sacB</i> dan Enzim Levansukrase	7
2.4 Keragaman Gen Homolog <i>sacB</i> pada spesies <i>Bacillus</i>	9
2.5 Vektor Kloning pUC19 dan Regulasi Ekspresi Plasmid	10
2.6 Identifikasi Molekuler dan Uji Letalitas	12
III METODE	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Alur Penelitian	13
3.3 Alat dan Bahan	14
3.4 Prosedur Kerja	14
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Hasil	21
4.2 Pembahasan	37
V SIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Simpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	50
RIWAYAT HIDUP	53



DAFTAR TABEL

1	Perbedaan mekanisme toksisitas dan keterbatasan pada berbagai marka seleksi negatif	7
2	Daftar sekuens gen <i>sacB</i> dari berbagai spesies <i>Bacillus</i> yang digunakan sebagai acuan desain primer	16
3	Hasil <i>Total Plate Count</i> (TPC) isolat bakteri dari lendir sampel nagasari, talam ungu, dan talam lumer (pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6})	22
4	Konsentrasi dan kemurnian ekstraksi DNA genom isolat N3, N4, TU1, TU3, dan TU4	24
5	Hasil analisis BLAST-N 16S rRNA isolat N3, N4, TU1, TU3, dan TU4	25
6	Karakteristik termodinamika primer <i>sacB</i> spesifik dan degenerat	27
7	Substitusi residu asam amino kaset <i>sacB</i> pKDS02 terhadap sekuens <i>sacB</i> <i>Bacillus subtilis</i> 168	33

DAFTAR GAMBAR

1	Peta genom <i>Escherichia coli</i> DH5 α beserta situs mutasinya	5
2	Mekanisme <i>markerless gene deletion</i> menggunakan dual seleksi	6
3	Mekanisme toksisitas gen <i>sacB</i> pada <i>Escherichia coli</i>	8
4	Peta konstruksi plasmid pMH1701 yang diturunkan dari plasmid pJQ17 melalui pemotongan daerah “ <i>cut out</i> ” (Hynes <i>et al.</i> 1989)	9
5	Varian homolog gen <i>sacB</i> pada <i>Bacillus</i> sp.	10
6	Peta plasmid pUC19	11
7	Alur penelitian	13
8	Sampel kue basah dadar gulung, nagasari, dan bugis (dari kiri ke kanan) didominasi oleh pertumbuhan kapang (persegi) dengan hanya sedikit lendir pada sampel nagasari (lingkaran)	21
9	Sampel kue basah lapis, bugis, nagasari, talam ungu, dan, talam lumer (dari kiri ke kanan) menghasilkan pertumbuhan kapang (persegi) dan lendir (lingkaran)	22
10	Morfologi makroskopis 12 isolat hasil purifikasi dari sampel kue basah nagasari, talam ungu, dan talam lumer (atas ke bawah)	23
11	Morfologi mikroskopis 12 isolat hasil purifikasi dari sampel kue basah nagasari, talam ungu, dan talam lumer (atas ke bawah) melalui pewarnaan endospora	23
12	Visual elektroforesis PCR gen 16S rRNA (~1500 bp) pada isolat N3, N4, TU1, TU3, dan TU4	25
13	Konstruksi pohon filogeni dengan metode Neighbor-Joining (NJ) model <i>p-distance bootstrap</i> 1000 pada isolat N3, TU3 dan TU4	26
14	Visual elektroforesis PCR <i>VeriFlex</i> dengan rentang suhu 46°C–51°C menggunakan primer <i>sacB</i> degenerat pada pada isolat N3, TU3, dan TU4	27
15	Visual elektroforesis PCR <i>VeriFlex</i> dengan rentang suhu 46°C–51°C menggunakan primer <i>sacB</i> spesifik (~1422 bp) pada pada isolat TU3	28

16	Visual elektroforesis PCR <i>VeriFlex</i> dengan rentang suhu 46°C–51°C menggunakan primer <i>sacB</i> spesifik (~1422 bp) pada pada isolat TU4	28
17	Visual elektroforesis PCR <i>VeriFlex</i> dengan rentang suhu 46°C–51°C menggunakan primer <i>sacB</i> spesifik pada pada isolat N3	29
18	Hasil analisis seleksi biru-putih transformasi <i>E. coli</i> DH5α pada media LA + Amp + X-Gal + IPTG	30
19	Uji fungsional awal koloni putih hasil transformasi kaset <i>sacB</i> pada <i>E. coli</i> DH5α dari isolat TU3 dan TU4 di media sukrosa 10% menunjukkan letalitas (persegi) dibandingkan dengan pertumbuhan normal pada media kontrol tanpa sukrosa (lingkaran)	30
20	Visual elektroforesis PCR M13 (~1500 bp) pada kaset <i>sacB</i> pKDS02 dan pKDS17	31
21	Peta pKDS02 menunjukkan insersi fragmen <i>sacB</i> berlawanan (<i>antisense</i>) dengan promotor <i>lac</i> dan memiliki variasi nukleotida terhadap <i>sacB</i> <i>Bacillus subtilis</i> 168 (garis <i>barcode</i> dengan lingkaran)	32
22	Hasil prediksi sinyal peptida kaset <i>sacB</i> pKDS02 menggunakan SignalP 5.0 menunjukkan 29 asam amino awal sebagai sekuens sinyal	32
23	Peta pKDS17 menunjukkan insersi fragmen <i>sacB</i> searah (<i>sense</i>) dengan promotor <i>lac</i> dan memiliki variasi nukleotida terhadap <i>sacB</i> <i>Bacillus subtilis</i> 168 (garis <i>barcode</i> dengan lingkaran)	34
24	Hasil prediksi sinyal peptida kaset <i>sacB</i> pKDS17 menggunakan SignalP 5.0 menunjukkan 27 asam amino sebagai sekuens sinyal	34
25	Hasil uji letalitas sel <i>E. coli</i> DH5α yang membawa pKDS02, pKDS17, dan pMH1701 menggunakan metode sebar (<i>spread assay</i>) pada media bersukrosa 5% dan media kontrol tanpa sukrosa	35
26	Hasil uji letalitas sel <i>E. coli</i> DH5α yang membawa pKDS02, pKDS17, dan pMH1701 menggunakan metode penetesan (<i>spot assay</i>) pada media bersukrosa 5%	35
27	Kadar gula pereduksi (mg/mL) yang dihasilkan oleh sel <i>E. coli</i> DH5α yang membawa pKDS02, pKDS17, pMH1701, dan pUC19 melalui metode <i>dinitrosalicylic acid</i> (DNS)	36

DAFTAR LAMPIRAN

1	Sekuens <i>sacB</i> pKDS02	51
2	Sekuens <i>sacB</i> pKDS17	52