



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Enzim kitinase

Kitinase adalah enzim yang mempunyai kemampuan mendegradasi kitin, yaitu polisakarida yang dibangun oleh satuan *N*-asetilglukosamin dengan ikatan  $\beta(1-4)$ . Kitin (Gambar 2.1) merupakan biopolimer yang paling melimpah di alam karena merupakan komponen struktural dinding sel cendawan kecuali oomycetes, kerangka luar arthropod, kerangka luar molusca, cangkang luar crustaceae dan nematod (Monreal & Reese, 1969; Cabib, 1987). Produk kitinase umum diproduksi di berbagai organisme. Beberapa bakteri memproduksi kitinase untuk autolisis, morfogenetis, maupun nutrisi yaitu memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon (Gooday, 1990; Monreal & Reese, 1969; Roberts & Cabib, 1992; Watanabe *et al.*, 1990). Prokariot yang banyak dilaporkan memproduksi kitinase adalah bakteri *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Actinomycetes*, *Bacillus* dan *Clostridium* (Gooday, 1979; Jones *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1990; Brurberg *et al.*, 1995; Sitrit *et al.*, 1995; Svitil *et al.*, 1997). Mikroba-mikroba eukariot yang memiliki kemampuan memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dan energi adalah *Myxomycetes*, *Chytrid*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*, *Ascomycetes* dan *Basidiomycetes*, dengan memodifikasi konstituen struktur kitin (Ohtakara, 1961). Salah satu cendawan air tawar yang mempunyai kemampuan tersebut adalah *Karlingia asterocysta* yang bersifat kitofil obligat. Ditemukan pula amuba tanah yang memiliki kemampuan mendegradasi kitin (Gooday, 1990). Pada tumbuhan

Hak cipta Dilindungi Undang-Undang

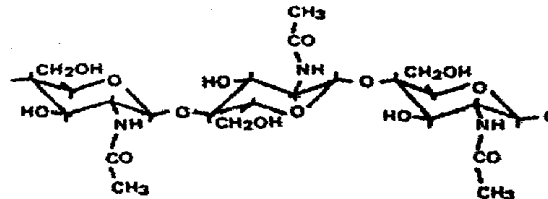
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber;

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

tinggi juga dilaporkan produksi enzim penghidrolisis kitin tersebut (Powning & Zykiewicz, 1965; Abeles *et al.*, 1970; Pegg & Vassey, 1973; Boller *et al.*, 1983).

Di alam terdapat beberapa bentuk kitin, yang terutama ditemukan adalah bentuk  $\alpha$ -kitin, berupa rantai yang terancang sebagai antiparalel, misalnya pada seliks hydrozoa, kulit telur nematoda, dan radulae moluska. Bentuk kitin yang lain adalah  $\beta$ -kitin, terancang sebagai rantai yang paralel, umumnya terdapat pada gangkang moluska, dan  $\gamma$ -kitin yang merupakan jenis kitin yang terdiri dari campuran antara kedua jenis kitin ( $\alpha$  dan  $\beta$ ) yang disebut di atas (Svitil *et al.*, 1997; Gooday 1990).



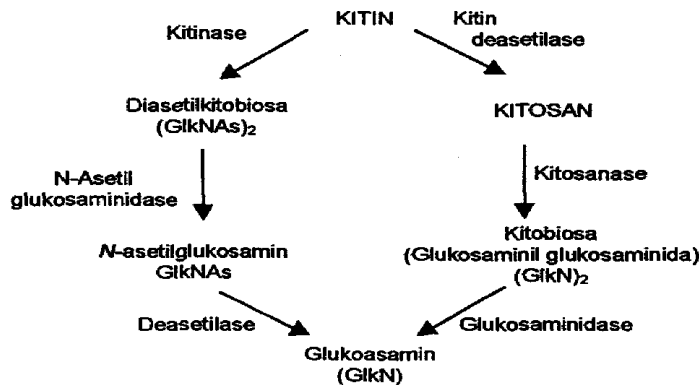
Gambar 2.1. Struktur molekul kitin.

Proses degradasi kitin dapat melalui dua lintasan (Gambar 2.2). Lintasan pertama adalah hidrolisis ikatan  $\beta(1-4)$  yang disebut proses kitinolitik. Enzim yang berperan dalam proses tersebut adalah enzim kitinase. Proses kitinolitik melibatkan dua jenis enzim kitinase, yaitu eksokitinase dan endokitinase. Eksokitinase memotong unit diasetilkitobiosa nonreduksi pada ujung rantai polimer, sedangkan endokitinase memotong ikatan glikosida rantai kitin secara acak menghasilkan



diasetilkitobiosa sebagai hasil utama dan triasetilkitotriosa, yang lambat laun akan terdegradasi menjadi disakarida dan monosakarida. Bentuk di- dan mono- akan diangkut ke dalam sel mikroorganisme dan berfungsi sebagai sumber karbon dan nitrogen. Di dalam sel, metabolisme *N*-asetilglukosamin dapat melalui fosforilasi *N*-asetilglukosamin-6-fosfat, ataupun melalui deasetilasi menjadi glukosamin, melalui deaminasi, dan selanjutnya melalui hidrolisis menjadi glukosa oleh glukosaminidase (Gooday, 1990).

Lintasan alternatif degradasi kitin adalah lintasan yang melibatkan deasetilasi kitin menjadi kitosan. Proses ini penting untuk lingkungan yang memiliki kandungan kitosan pada sedimen perairan. Enzim kitosanase dapat menghidrolisis ikatan glikosida  $\beta(1-4)$  pada kitosan menghasilkan kitobiosa, kemudian kitobiosa dihidrolisis oleh  $\beta$ -*N*-asetilglukosaminidase menjadi *N*-asetilglukosamin (Gooday, 1990).



Gambar 2.2 Lintasan degradasi kitin

1. Ditaring 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.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## B. Gen kitinase bakteri yang telah dilaporkan

Kitinase bakteri, yaitu kitinase yang dihasilkan oleh bakteri, mempunyai mekanisme aktivitas antifungi yang berbeda dari kitinase tanaman. Kitinase bakteri berperan penting dalam menjaga keseimbangan ekologis dengan mendegradasi dan mengubah kitin menjadi bentuk biologis yang bermanfaat, disamping memanfaatkan kitin sebagai sumber nutrisi (Roberts & Selitrennikoff, 1988). Berdasarkan sekuens DNA, Ohno *et al.* (1996) menyebutkan bahwa gen-gen kitinase dapat dikelompokkan menjadi dua famili, yaitu famili 18 dan 19. Kitinase bakteri sesungguhnya berada dalam satu kelompok famili 18 bersama kitinase dari cendawan, virus, hewan dan kelas III dan V kitinase tumbuhan. Kitinase yang termasuk famili 19 adalah kelas I, II dan IV kitinase tumbuhan. Namun, Saito *et al.* (1999) melaporkan kini telah ada kitinase bakteri yang dapat dikelompokkan ke dalam famili 19.

Berbagai gen kitinase bakteri telah diklon dan dikarakterisasi bersama dengan produk translasinya dari bakteri aerob maupun anaerob. Kitinase dari *Serratia marcescens* telah banyak diteliti, serta gen-gen kitinasenya telah diklon dan disekuens.

Gen yang menyandikan kitinase utama dari *Serratia marcescens*, yaitu chitinase A (*chiA*) telah diklon oleh Downing & Thomson (2000) di bawah kendali promotor *tac*, baik disisipkan di suatu plasmid berspektrum inang luas, maupun di suatu vektor integrasi dan diintroduksi ke *P. fluorescens*. Galur Pf yang membawa *tac-chiA* baik di plasmid maupun terintegrasi di dalam kromosom merupakan agens biokontrol

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.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

yang efektif terhadap cendawan patogen tanaman *Rhizoctonia solani*. Struktur tiga dimensi enzim kitinase *chiA* dari *S. marcescens* galur QMB1466 telah dikarakterisasi dan dilaporkan oleh Brurberg *et al.* (1996), serta perbandingan sekuens-sekuens *chitinase* A dan B telah dilakukan beserta lokalisasi selularnya di klon *E. coli*. Suatu sistem transposon Tn7 yang membawa gen *chiA* telah dikonstruksi oleh Koby *et al.* (1994) dalam bentuk fusi operon di bawah promotor *lac*. Konstruksi ini telah diintroduksi ke dalam *Pseudomonas fluorescens* dan terintegrasi dengan stabil, serta mengekspresikan enzim kitinase yang aktif. Galur biokontrol tersebut telah diuji pula kemampuan melindungi kecambah biji kapas terhadap *Rhizoctonia solani*. Sebelumnya Sundheim *et al.* (1988) telah berhasil mengkloning dua macam kitinase dari *Serratia marcescens*, kemudian mengintroduksi salah satu gen kitinase tersebut ke *Pseudomonas fluorescens*. Aktivitas kitinase dapat diekspresi di *P. fluorescens*, dan galur tersebut dapat menghambat pertumbuhan tabung kecambah dari *Fusarium oxysporum* f.sp. *redolens*, serta menurunkan serangan penyakit pada lobak yang disebabkan oleh cendawan tersebut.

*Enterobacter agglomerans* juga merupakan bakteri sumber gen kitinase bakteri yang berpotensi. Chernin *et al.* (1997) telah mengkloning dan mengkarakterisasi sekuens gen penyandi endokitinase *chiA* dari *E. agglomerans*. Sekuens lengkap gen *chiA* telah dilaporkan, dan dari sekuens asam amino turunannya diperoleh informasi adanya suatu kerangka baca terbuka (*open reading frame* = ORF) yang menyandikan 562 asam amino dari suatu protein prekursor dengan berat molekul 61 kDa dengan suatu perkiraan sekuens pemimpin (*leader peptide*) pada ujung





karboksil. Chernin *et al.* (1995) telah berhasil mendeteksi empat macam enzim kitinase, yaitu dua macam *N*-asetil- $\beta$ -D-glukosaminidase dengan berat molekul 89 kDa dan 67 kDa, satu endokitinase dengan berat molekul 59 kDa, serta suatu kitobiosidase dengan berat molekul 50 kDa. Kuantifikasi enzim-enzim kitinase tersebut dilakukan menggunakan substrat kromogenik analog p-nitrofenil disakarida, trisakarida dan tetrasakarida turunan N-asetilglukosamin.

Suatu isolat kitinolitik dari *Aeromonas caviae* yang diisolasi dari akar tanaman buncis yang sehat yang tumbuh di tanah yang mengandung *Sclerotium rolfsii* dilaporkan bahwa secara artifisial dapat mengendalikan *Rhizoctonia solani* dan *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* di kapas dan *S. rolfsii* di buncis di dalam kondisi rumah kaca. Inbar & Chet (1991) telah mengkarakterisasi produk kitinase yang dihasilkan. Ekspresi gen kitinase dari *A. caviae* di *E.coli* telah dianalisis oleh Sitrit *et al.* (1995) dan menunjukkan produk kitinase yang aktif. Sekuens nukleotida gen tersebut telah dikarakterisasi, dan dilaporkan mempunyai kemiripan tinggi dengan gen *chiA* dari *S. marcescens*. Produk kitinase dari suatu isolat *Aeromonas* sp telah dikarakterisasi oleh Ueda *et al.* (1992) dan Ueda *et al.* (1998), dan dilaporkan ada delapan macam kitinase. Salah satu gen kitinase tersebut telah diklon dan dikarakterisasi sekuens nukleotidanya.

*Bacillus* sp adalah kelompok bakteri yang termasuk berpotensi memproduksi kitinase. Dari suatu isolat *Bacillus circulans* telah berhasil diidentifikasi dan dikarakterisasi produk kitinase dan sekuens nukleotida sembilan macam kitinase

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.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Bogor Agricultural University



(Watanabe *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1994; Alam *et al.*, 1995; Alam *et al.*, 1996)

Suatu penelitian enzim kitinase bakteri pada *Vibrio harveyi* (Svitil *et al.*, 1997) menunjukkan bahwa keragaman jenis enzim kitinolitik yang dihasilkan oleh setiap mikroorganisme disebabkan perbedaan jenis substrat kitin yang didegradasi, dan jenis turunan kitin. Enzim-enzim kitinase yang dihasilkan menunjukkan perbedaan berdasarkan pola restriksi DNA, data imunologi, dan aktivitas enzim.

*Streptomyces* adalah bakteri tanah bersifat saprofit yang merupakan salah satu penghasil kitinase utama di dalam lingkungan tanah. Telah banyak gen-gen kitinase yang diklon dari kelompok ini, yang sumbernya berasal dari *S. plicatus* (Robbins *et al.*, 1992), *S. lividans* (Fujii & Miyashita, 1992; Miyashita & Fujii, 1992), *S. griseus* (Ohno *et al.*, 1996), dan *S. coelicolor* (Saito *et al.*, 1999).

Enzim kitinase yang terdapat pada tumbuhan tidak satupun yang menunjukkan homologi dengan enzim kitinase yang dihasilkan mikroba, sebagaimana diutarakan oleh Oppenheim & Chet (1992). Roberts & Selitrennikoff (1988) membandingkan aktivitas antifungi kitinase tumbuhan dari biji gandum terhadap kitinase bakteri dari *Serratia marcescens*, *Streptomyces griseus* dan *Pseudomonas stutzeri*. Uji dilakukan berdasarkan penghambatan pemanjangan hifa cendawan uji *Trichoderma reesei* dan *Phycomyces blakesleeianus*. Disebutkan bahwa perbedaan aktivitas antifungi kedua jenis kitinase berkaitan dengan perbedaan mekanisme dari dua kelas enzim kitinase. Kitinase tumbuhan merupakan endokitinase, sedangkan kitinase bakteri adalah eksokitinase.

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.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



### C. *Pseudomonas fluorescens*.

*Pseudomonas fluorescens* termasuk dalam genus *Pseudomonas* pada kelompok Pseudomonad. Kelompok ini merupakan kelompok kemoorganotrofik aerob yang tidak menunjukkan metabolisme fermentatif, respirasi bersifat obligat, mempunyai kemampuan denitrifikasi, berupa Gram negatif, bersel tunggal, berbentuk batang lurus atau bengkok, berukuran  $0.5 - 1.0 \mu\text{m} \times 1.5 - 4.0 \mu\text{m}$ , dengan flagella polar, tunggal ataupun majemuk. Bakteri-bakteri Pseudomonad hanya membutuhkan nutrisi yang sederhana untuk pertumbuhannya, serta hidup pada kisaran pH netral dan suhu mesofilik (Madigan *et al.*, 1997). Namun, beberapa bakteri kelompok ini dapat pula dijumpai bertahan hidup pada kondisi suhu, pH, dan faktor-faktor fisik dan kimia yang ekstrim (Lindow, 1992). Secara filogenetis anggota kelompok ini tersebar di dalam kelompok bakteri ungu di dalam kingdom Bakteri. Spesies-spesies genus *Pseudomonas* dapat dibedakan berdasarkan berbagai karakter fisiologis dan genetiknya. Berdasarkan analisis 16S rRNA, *P. fluorescens* dikelompokkan ke dalam bakteri ungu kelompok gamma, bersama *P. aeruginosa*, *P. putida*, dan *P. syringae* yang disebut subkelompok Fluoresens. Persen (%) mol GC DNA bakteri subkelompok ini berkisar antara 58 sampai 67 %, dimana *P. fluorescens* mempunyai % mol GC 59-61. Berdasarkan fisiologinya, *P. fluorescens* dibedakan berdasarkan adanya flagella polar yang majemuk, dan berdasarkan ketidakmampuannya menghasilkan *pyocyanin*, serta ketidakmampuannya tumbuh sampai suhu  $43^{\circ}\text{C}$  sebagaimana *P. aeruginosa* (Madigan *et al.*, 1997).

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.

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



Spesies-spesies *Pseudomonas* yang berfluoresens adalah kelompok bakteri yang berperan penting dalam melindungi tumbuhan dari serangan mikroorganisme patogen. Bakteri-bakteri tersebut menghasilkan sejumlah besar faktor antagonis terhadap patogen, berupa siderofor yang berwarna kuning kehijauan dan berfluoresens yang merupakan ciri khasnya. Produk sekunder lainnya yang juga berperan penting dalam kemampuan bakteri-bakteri ini sebagai biokontrol terhadap patogen adalah kemampuannya menghasilkan hidrogen sianida dan mensintesis antibiotik-antibiotik, seperti *phenazines* dan *phloroglucionol* (Lindow, 1992). Berdasarkan hal tersebut, selain kemampuannya tumbuh pada kondisi nutrisi yang minim, maka bakteri kelompok ini mampu mengkolonisasi tempat hidup yang berfluktuasi seperti di tumbuhan, baik di lingkungan akar maupun di permukaan daun, dan berkompetisi dengan mikroorganisme lainnya.

#### D. Teknologi DNA rekombinan

Teknologi DNA rekombinan, sering pula disebut kloning gen ataupun kloning molekuler, adalah sejumlah eksperimen tertentu yang bertujuan mentransfer informasi genetik (DNA) dari satu organisme ke organisme lain.

Eksperimen DNA rekombinan secara umum meliputi, (i) pengestraksian DNA dari organisme donor, baik itu DNA klon, DNA sisipan, DNA target, maupun DNA asing; (ii) pemotongan secara enzimatik, dan penyambungan ke DNA vektor untuk membentuk molekul DNA rekombinasi baru; (iii) transfer hasil konstruksi vektor kloning-DNA sisipan ke dalam suatu sel inang, dan pemeliharaan di dalam sel tersebut; (iv) introduksi DNA ke dalam sel inang bakteri disebut transformasi;

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 artikel atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumbar dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



dan (v) identifikasi sel-sel inang yang menangkap dan membawa konstruksi DNA sel tertransform, transforman), dan seleksi dari yang bukan transforman (Glick & Pasternak, 1994).

Pada dasarnya DNA diekstraksi dari sel berdasarkan prinsip sebagai berikut, (i) penghancuran dinding sel, baik secara mekanis maupun enzimatik, sebagai contoh penggunaan lisozim; (ii) pelisisan sel, dapat dilakukan dengan penambahan deterjen seperti SDS (sodium dodecyl sulphate); (iii) pembersihan debris sel, dilakukan dengan sentrifugasi, serta memisahkan protein dari lisat dengan ekstraksi menggunakan pelarut organik fenol bersama dengan kloroform dan isoamil alkohol; (iv) pengendapan DNA dari lisat jernih dengan menambahkan etanol dan garam natrium atau dapat pula dengan sentrifugasi gradien menggunakan Cesium klorida ( $CsCl_2$ ) yang dapat memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom (Old & Primrose, 1985).

Pada kloning molekular, DNA sisipan atau DNA target, serta DNA vektor harus dipotong menjadi fragmen linier, untuk saling disambungkan. Pemotongan DNA merupakan kerja dari suatu enzim yang diproduksi oleh beberapa bakteri, yang disebut endonuklease restriksi tipe II atau disebut pula enzim restiksi. Enzim ini bersifat spesifik mengenali sekuens pasangan basa dalam bekerja memotong DNA utas ganda, sehingga menghasilkan DNA dengan potongan yang unik. Enzim ini bekerja memotong DNA dengan mengenali sekuens spesifik yang pendek secara palindrom, biasanya 4 sampai 8 sekuens pasangan basa, dengan demikian memotong kedua utas DNA dari kedua sisi utas, sehingga hasil potongan tidak dapat direparasi

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.

2. Dilarang mengumbar dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak Cipta Milik IPB Institut Pertanian Bogor Bogor Agricultural University

oleh enzim pereparasi sel inang. Hasil pemotongan DNA dapat berupa molekul berujung mencuat atau lengket yaitu berujung 5'-fosfat dan berujung 3'-OH, serta berujung tumpul, yaitu kedua utas terpotong pada situs yang sama. Fragmen DNA yang diperoleh saling disambungkan dengan bantuan enzim ligase DNA. Enzim ini bekerja menyambungkan setiap bagian terputus di dalam molekul DNA yang mempunyai ujung 5'-fosfat dengan 3'-OH. Di dalam sel, enzim ini mempunyai tugas sebagai perangkat reparasi bersama dengan polimerase DNA I dalam proses replikasi DNA (Madigan *et al.*, 1997; Glick & Pasternak, 1994).

Untuk membawa sisipan DNA yang disambungkan diperlukan suatu vektor kloning. Vektor kloning adalah molekul DNA yang telah terkarakterisasi dengan baik, yang memungkinkan introduksi molekul DNA rekombinan ke sel inang yang sesuai, serta memungkinkan bertahan secara stabil di sel inang. Hal-hal yang merupakan fungsi dasar suatu vektor adalah, (i) replikon; terdiri dari suatu *origin of replication* dan gen-gen lain yang memungkinkan molekul ini untuk bereplikasi sebagai elemen ekstrakromosomal, tidak tergantung dari pengendalian kromosomal; (ii) memiliki penanda seleksi, biasanya merupakan gen-gen penyandi resistensi terhadap senyawa toksik, seperti antibiotik, atau gen-gen yang merupakan komplemen dari sifat auksotrofi bakteri inang; dan (iii) tersedianya situs-situs endonuklease restriksi unik sebagai situs kloning sisipan DNA (Bagdasarian & Bagdasarian, 1994; Madigan *et al.*, 1997).

Banyak vektor yang dilengkapi dengan kemanfaatan lain untuk memfasilitasi skrining molekul rekombinan, seperti memungkinkan pengendalian

Hak cipta Dilindungi Undang-undang

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.

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

Bogor Agricultural University

ekspresi klon gen, introduksi ke berbagai inang bakteri, atau seleksi fungsi spesifik, misalnya promotor atau terminator. Vektor yang umum digunakan adalah plasmid, bakteriofaga  $\lambda$ , phagemid, dan cosmid (Bagdasarian & Bagdasarian, 1994).

Plasmid perlu mempunyai sifat-sifat yang menjadikannya suatu vektor kloning berkualitas tinggi, selain sifat-sifat vektor yang telah disebutkan di atas, antara lain, (i) berukuran kecil, sehingga molekul DNA mudah diisolasi dan dimanipulasi. Efisiensi transfer DNA asing ke dalam *E. coli* menurun secara nyata dengan bertambahnya ukuran plasmid di atas 15 kilopasang basa. Selain itu, (ii) berbentuk sirkular, sehingga molekul DNA stabil selama proses isolasi secara kimiawi; dan (iii) jumlah kopi berganda, sehingga dapat berada dalam sel dalam jumlah banyak, dan memungkinkan amplifikasi molekul DNA (Madigan *et al.*, 1997; Pellick & Pasternak, 1994).

Berdasarkan hal tersebut, biasanya plasmid untuk vektor kloning merupakan molekul DNA hasil rekayasa genetika. Plasmid sebagai vektor kloning dengan sistem inang *E. coli* dan kerabatnya telah banyak dikembangkan dan digunakan. Namun, ada beberapa keterbatasan dalam penggunaan sistem inang *E. coli*, yaitu (i) kebanyakan plasmid vektor yang digunakan, yang berukuran kecil dan berjumlah kopi tinggi seperti disebutkan di atas, berspektrum inang sempit, sehingga tidak mampu ditransfer ke dan bereplikasi di inang spesies lain; (ii) sinyal transkripsi dan translasi spesies lain tidak dikenali dengan baik oleh inang *E. coli*, sehingga ekspresi gen-gen heterologus di *E. coli* lemah; (iii) sulit mempelajari fungsi gen-gen dengan lintasan metabolik dan pengaturan yang tidak terdapat di *E. coli*, seperti degradasi

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 artikel atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang  
Bogor Agricultural University

hidrokarbon, deklorinasi, fiksasi nitrogen; dan (iv) kemungkinan toksisitas dari produk-produk gen-gen heterologus terhadap sel *E. coli* (Bagdasarian & Bagdasarian, 1994).

Plasmid dengan replikon berspektrum inang luas seperti replikon dari turunan IncP1 dan IncQ sangat berguna untuk mengkonstruksi suatu plasmid rekombinan serta menganalisis ekspresi gen yang terkonstruksi di dalam vektor plasmid ke dalam inang selain *E. coli* dan kerabatnya, namun umumnya berukuran relatif besar dan berjumlah kopi rendah. Sebagai contoh, pRK415 (Keen *et al.*, 1988) merupakan turunan plasmid RK2 dari kelompok inkompatibilitas P-1 yang sangat mirip dengan RP1, RP4 dan R68 (Ditta *et al.*, 1985). Plasmid pRK415 memiliki *oriT*, *oriV*, sebagian fungsi transfer (*trf*) dan DNA penyandi resistensi terhadap tetrasiklin.

DNA murni yang sudah saling tersambungkan antara vektor dan sisipan, kemudian di transfer ke sel inang melalui proses yang disebut transformasi. Karakteristik yang ideal untuk suatu inang kloning gen adalah (i) pertumbuhan cepat dan baik, mampu tumbuh pada medium murah; (ii) tidak berbahaya dan nonpatogenik; (iii) mampu menangkap/mengambil molekul DNA, dan stabil dalam kultur; (iv) memiliki enzim yang sesuai untuk replikasi vektor rekombinan; (v) mempunyai informasi genetik yang selengkap mungkin; dan (vi) mempunyai genotipe spesifik untuk efektifitas hasil kloning, sebagai contoh jika vektor membawa gen  $\beta$ -galaktosidase, maka inang termutasi di gen yang sama (Madigan *et al.*, 1997).

Hak cipta Dilindungi Undang-undang

Hak cipta milik IPB Institut Pertanian Bogor Bogor Agricultural University

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.

2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Mutasi-mutasi tertentu terhadap galur-galur sel inang telah dilakukan untuk memenuhi kriteria tersebut di atas, dan untuk meningkatkan efisiensi stabilitas plasmid rekombinan setelah tertransformasi serta membantu analisis galur yang tertransformasi. Untuk memastikan plasmid rekombinan tetap berada dalam bentuk aslinya, sel inang dimutasi menjadi negatif rekombinasi (RecA), untuk menghindari terjadinya rekombinasi dengan genom inang. Selain itu sel inang dimutasi tidak memiliki gen-gen untuk enzim-enzim endonuklease restriksi (Glick & Pasternak, 1994).

Inang yang sering digunakan dalam kloning gen adalah *E. coli*, disamping bakteri Gram-positif *Bacillus subtilis*, dan juga *Saccharomyces cerevisiae* untuk ekspresi gen-gen eukariot. Beberapa galur *E. coli* sebagai inang proses transformasi telah didominasi eksonuklease-eksonukleasenya, serta ada pula yang dimutasi kemampuan restriksinya (*hsdR*) sehingga DNA rekombinan yang akan ditransformasi dapat terhindar dari restriksi oleh enzim restriksi yang dihasilkan oleh inang. Ada galur *E. coli* yang dimutasi pada bagian *lacZ* tertentu, misalnya *lacZAM15* pada galur DH5 $\alpha$ , untuk dimanfaatkan sebagai penseleksi transforman. Jika galur ini ditransformasi oleh plasmid yang membawa daerah regulator operon *lac*, yaitu gen penyandi  $\beta$ -galaktosidase, dan suatu segmen pendek DNA penyandi ujung amino terminal *lacZ*, maka peptida hasil ekspresi bagian amino terminal *lacZ* yang disandikan plasmid tersebut berkombinasi dengan produk  $\beta$ -galaktosidase tidak lengkap yang dihasilkan galur *lacZAM15*, menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase yang fungsional. Peristiwa penggabungan potongan protein LacZ sehingga menjadi LacZ

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Hak cipta dimiliki oleh Institut Pertanian Bogor Bogor Agricultural University

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.

2. Dilarang mengurniakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

fungsional ini disebut komplementasi- $\alpha$ .  $\beta$ -Galaktosidase fungsional ini dapat diinduksi oleh isopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranosida (IPTG). Fenotipe ini dapat diamati sebagai warna biru yang dihasilkan dari reaksi dengan substrat kromogenik 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal<sup>R</sup>) yang ditambahkan ke dalam medium. Suatu *multiple cloning region* atau disebut pula *multiple cloning sites* (MCS), yaitu suatu daerah sempit sebagai situs penyisipan suatu fragmen DNA, telah dirancang tepat di bagian hilir *lacZ* di beberapa plasmid vektor kloning. Jika DNA klon pada daerah tersebut, maka aktivitas fungsional *lacZ* di plasmid terganggu, sehingga tidak menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase yang fungsional, dengan demikian substrat tidak bereaksi menghasilkan warna biru. Hal ini dimanfaatkan untuk membedakan sel transforman antara yang membawa plasmid rekombinan dengan yang membawa plasmid vektor tanpa DNA sisipan pada proses seleksi dengan prinsip seleksi koloni biru putih (Provence & Curtiss III, 1994).

Seleksi transforman yang membawa klon gen yang benar adalah tahap yang penting. Seleksi antara inang yang merupakan transforman dengan yang bukan transforman dapat memanfaatkan penginaktifan gen penanda pada vektor plasmid, dapat pula dengan seleksi koloni biru-putih. Untuk vektor asal virus, dapat dilakukan dengan mengamati *plaque* yang terbentuk. Namun, untuk membedakan antara transforman yang tidak membawa klon gen dengan yang membawa klon gen yang benar dapat dilakukan dengan melihat ekspresi klon gen di dalam sel inang. Oleh karena itu aktivitas protein produk klon gen harus dapat diekspresikan (Madigan *et al.*, 1997). Jika ekspresi tidak dapat diamati secara fisiologis atau biokimia, maka dapat

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.

2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

digunakan metode antigen antibodi. Jika tidak ada antibodi yang sesuai untuk produk gen, maka digunakan *probe* asam nukleat. Dengan cara hibridisasi DNA menggunakan *probe* yang sesuai, akan dapat ditemukan transforman mana yang membawa klon gen (Madigan *et al.*, 1997).

Pada kloning gen, dapat pula dimanfaatkan suatu transposon sebagai vektor karena kemampuannya menyisip dan berintegrasi ke kromosom, sehingga dapat digunakan sebagai pembawa gen yang akan diintroduksi ke suatu kromosom bakteri, selain itu juga berguna pada keperluan ekspresi klon gen dalam jumlah kopi tunggal (Madigan *et al.*, 1997, de Bruijn & Rossbach, 1994). Transposon adalah suatu elemen loncat yang mampu berpindah dan menyisip dari suatu molekul DNA ke molekul DNA lain. Transposon membawa elemen IS dengan orientasi searah maupun berlawanan pada kedua ujung elemen, membawa gen penyandi enzim transposase yang terlibat pada proses transposisi, dan membawa suatu gen resistensi antibiotik, atau resistensi logam berat, atau gen penentu patogenesis. de Lorenzo *et al.*, 1990, dan Herrero *et al.*, 1990, telah mengkonstruksi transposon berukuran mini yang dirancang dengan berbagai penanda, baik resistensi terhadap antibiotik, maupun penanda lain seperti resistensi terhadap herbisida, sebagai alternatif vektor kloning. Pada penelitian ini yang digunakan adalah transposon mini berupa plasmid pUTmini-Tn5Sp/Sm. Namun, untuk inang kloning gen plasmid ini diperlukan suatu galur *E. coli* yang membawa gen *pir* yang menghasilkan protein  $\pi$ , yaitu protein yang dibutuhkan pada inisiasi proses replikasi plasmid-plasmid pUTmini tersebut, karena *pir* plasmid-plasmid tersebut berasal dari plasmid R6K yang hanya berfungsi

Hak cipta Dilindungi Undang-undang

Hak cipta Dilindungi Undang-undang  
Hak cipta dilindungi undang-undang  
Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip, sebagian atau seluruhnya 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.

2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.





bila ada protein tersebut. Galur *E. coli* yang dimodifikasi menghasilkan protein tersebut adalah S17-1  $\lambda$ pir, yaitu *E. coli* K-12 yang dilisogeni oleh  $\lambda$ pir. Selain itu plasmid-plasmid tersebut juga membawa *oriT* (*origin of transfer*) dari plasmid RP4, sehingga dapat dilakukan transfer plasmid secara konjugasi

### 2. Regulasi ekspresi gen dan fusi transkripsi

Regulasi gen menjadikan suatu bakteri mampu merespon secara cepat untuk berubah di dalam lingkungannya tanpa membuang energi untuk mengekspresikan gen-gen yang produknya tidak penting digunakan pada keadaan aktif, serta untuk menghindari akumulasi produk-produk yang toksis (Dale, 1994; Watson *et al.*, 1994).

Pengendalian regulasi sintesis suatu produk gen dapat dicapai pada dua tingkat, yaitu regulasi pada tingkat sintesis produk gen yang spesifik, dan pada tingkat pengendalian aktivitasnya. Alur informasi mulai dari struktur suatu gen sampai dengan aktivitas suatu enzim sebagai produk akhir merupakan suatu rangkaian faktor-faktor yang dapat mempengaruhi regulasi sintesis dan aktivitas suatu enzim (Gambar 2.3), yaitu, (i) jumlah kopi gen, secara umum jika terdapat beberapa kopi gen, maka tingkat produk akan tinggi; (ii) efisiensi proses transkripsi gen, faktor utama pada tingkat ini adalah inisiasi transkripsi oleh polimerase RNA, disamping mekanisme-mekanisme lain yang terlibat di dalam produksi mRNA; (iii) stabilitas mRNA, jumlah mRNA adalah kombinasi efek laju produksi dan lamanya waktu setiap molekul berada dalam keadaan aktif di dalam sel, kebanyakan mRNA bakteri

Her 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.

2. Dilarang meminumikan dan memperbanyak sebgian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



berumur sangat singkat, ketidakstabilan mRNA bakteri menjadi kunci bagi bakteri untuk mudah berubah secara cepat sebagai respon terhadap lingkungan; (iv) efisiensi proses translasi mRNA menjadi protein, disini terlibat faktor efisiensi inisiasi translasi, dan juga faktor laju kerja ribosom di sepanjang rantai mRNA; (v) stabilitas produk protein, sebagaimana mRNA, jumlah protein mencerminkan laju produksi dan laju stabilitas, protein yang berperan pada struktur selular akan lebih stabil daripada protein pengirim sinyal untuk mengaktifkan (*switching on*) kejadian selular yang bersifat sementara; dan (vi) efek pasca translasi, proses ini melibatkan berbagai kejadian seperti pelipatan protein yang mengkonversi rantai polipeptida menjadi suatu konformasi protein yang aktif secara biologis, dan pula modifikasi kovalen yang mempengaruhi aktivitas protein (Dale, 1994).

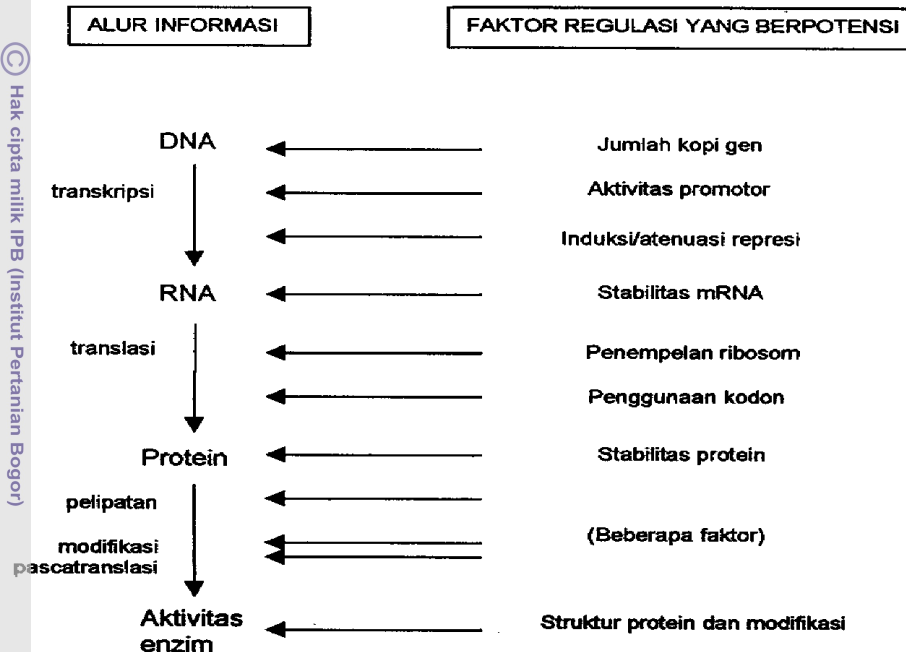
Umumnya pengendalian ekspresi gen pada bakteri adalah dengan cara meregulasi jumlah mRNA yang diproduksi, dan pengaruh utama pada proses tersebut adalah sifat promotor gen tersebut. Daerah promotor, yaitu suatu sekuens DNA yang terletak di bagian hulu atau ujung 5' suatu gen, merupakan sekuens DNA spesifik tempat polimerase RNA menempel untuk melakukan inisiasi proses transkripsi. Daerah promotor pada bakteri dikenal dengan daerah -35 dan -10 dihitung dari sekuens awal transkripsi yang disebut +1. Daerah -35 dan -10 mempunyai sekuens konsensus bagi *E. coli*, yaitu berturut-turut TTGACA dan TATAAT. Sekuens daerah promotor pada organisme lain dapat sangat berbeda, sehingga hal ini menjadi kendala dalam ekspresi gen-gen heterologus di *E. coli*.

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.

2. Dilarang meminumikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Selain sekuens, jarak antara kedua daerah promotor mempengaruhi efisiensi promotor (Dale, 1994, Watson *et al.*, 1994).



Gambar 2.3. Alur informasi dan faktor-faktor regulasi ekspresi gen (Dale, 1994).

Untuk tingkat ekspresi yang sangat tinggi, dibutuhkan tingkat produksi mRNA yang tinggi pula. Hal ini memerlukan suatu sistem yang direkayasa yang membawa promotor kuat pada vektor plasmid berjumlah kopi tinggi. Yang dimaksudkan promotor kuat adalah promotor dengan sekuens DNA mendekati sekuens konsensus. Sedangkan untuk ekspresi suatu gen dalam jumlah kopi tunggal pada





keperluan riset tertentu, maka digunakan vektor integrasi yang akan mengintegrasikan klon gen ke kromosom inang (Madigan *et al.*, 1997).

Ekspresi suatu gen dapat bersifat regulatif maupun bersifat konstitutif, tergantung elemen daerah promotor. Ekspresi gen-gen yang sangat teregulasi sebenarnya berada dalam keadaan ekspresi konstitutif, yaitu berada dalam level basal, walaupun tidak ada kendali lingkungan, atau penginduksi (Glick & Pasternak, 1994).

Untuk mempelajari karakter suatu gen, yaitu analisis pengendalian regulasi gen, adalah sulit. Untuk dapat membantu analisis tersebut, dapat dilakukan dengan cara menfusikan gen (Gambar 2.4), baik dengan promotor ekspresi, maupun dengan suatu gen pelapor. Suatu fusi gen disebut fusi transkripsi jika sinyal translasi, yaitu daerah penempelan ribosom (*ribosom binding site* = rbs, atau sekuens *Shine-Dalgarno*) masih berasal dari gen tersebut. Sedangkan jika kendali translasi berasal dari promotor ekspresi, dengan tetap mempertahankan kerangka baca gen dari satu sekuens S-D, maka disebut fusi translasi (Dale, 1994).

Di dalam memilih perangkat ekspresi, tidak ada satupun vektor, atau sistem promotor-represor yang dapat memberikan tingkat ekspresi optimum di semua bakteri bahkan di kelompok Gram-negatif sekalipun. Namun, beruntung bahwa berbagai pendekatan dan strategi yang telah dikembangkan untuk *E. coli* dapat berlaku juga pada berbagai mikroorganisme lain, seperti halnya konstruksi beberapa promotor yang dapat digunakan untuk ekspresi gen di bakteri, yaitu promotor *lac*, promotor *tac*, yaitu promotor hibrid antara promotor *trp* (triptofan) dan daerah

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

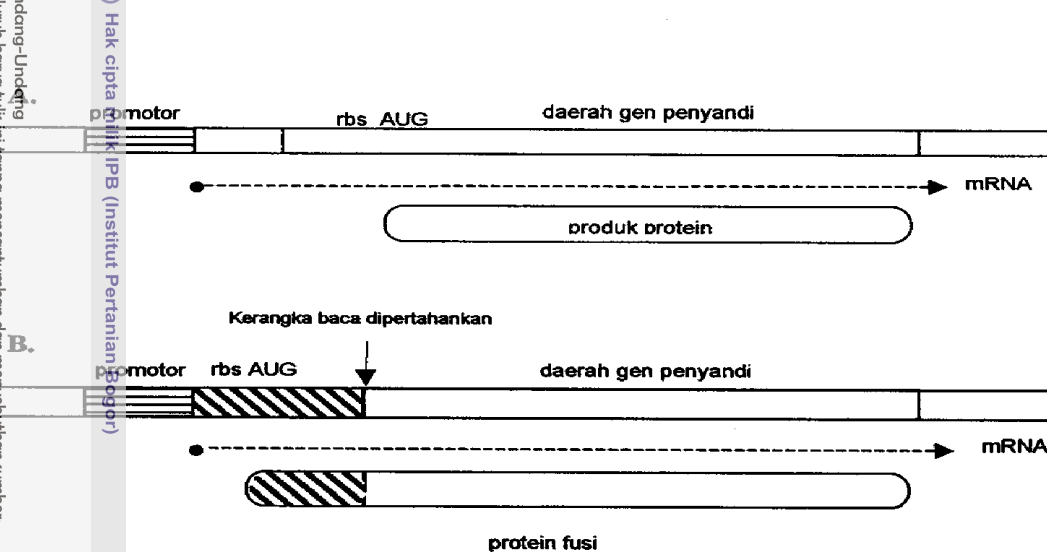
Bogor Agricultural University

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.

2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

regulator *lac*, promotor Nm (dari gen resistensi terhadap Neomisin), dan promotor rbs1 (dari gen protein ribosomal S1 *Rhizobium meliloti*) (Glick & Pasternak, 1994). Di dalam penelitian ini, gen kitinase difusikan di bawah PKm<sup>R</sup> (promotor gen penyandi resistensi Kanamisin, yang sama dengan promotor Nm), dan *P<sub>tac</sub>*, untuk mempelajari ekspresinya pada *E. coli* dan *P. fluorescens*.



Gambar 2.4. Fusi gen penyandi protein. A, fusi transkripsi, B, fusi translasi (Dale, 1994).

### F. Transfer gen pada bakteri

Sudah diketahui bahwa bakteri dapat melakukan pertukaran informasi genetik, baik di alam maupun dalam kondisi artifisial di laboratorium. Ada tiga

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 artikel atau tinjauan suatu masalah.  
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.  
 2. Dilarang mengumbar dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



macam mekanisme dasar terjadinya transfer gen pada bakteri. Transformasi, yaitu sel bakteri menangkap molekul DNA bebas dari lingkungan sekitar; konjugasi, yaitu transfer DNA langsung dari satu sel ke sel lain melibatkan kontak sel dengan sel; dan, transduksi, yaitu transfer gen yang diperantarai oleh virus bakteri (bakteriofaga) (Dale, 1994). Tidak semua spesies bakteri mempunyai ketiga kemampuan tersebut untuk mentransfer DNA. *Escherichia coli* sudah terkenal penggunaannya di dalam teknik molekular karena relatif mudah ditangani di dalam laboratorium. *E.coli* juga memiliki kemampuan untuk melakukan ketiga metode transfer gen tersebut.

Transformasi genetik adalah proses inkorporasi molekul DNA bebas ke dalam sel resipien dan menyebabkan perubahan genetik. Sejumlah prokariot ditemukan bersifat dapat tertransformasi secara alami, disebut sebagai kompeten secara alami, sebagian lagi harus diinduksi menjadi kompeten secara artifisial dengan beberapa faktor, antara lain medium pertumbuhan, suhu, dan faktor lain, seperti ion-ion tertentu. Proses transformasi lainnya dapat dilakukan dengan cara elektroporasi, yaitu terbentuknya pori-pori kecil pada membran sel akibat terpaparnya sel pada medan listrik berpulsa, sehingga DNA yang terdapat di sekitar dapat memasuki sel (Madigan *et al.*, 1997).

Di dalam penelitian ini transformasi dilakukan sebagai kegiatan rutin pada proses konstruksi DNA rekombinan menggunakan *E.coli* sebagai inang. Induksi kompetensi sel *E. coli* dilakukan menggunakan ion  $Ca^{++}$  (kalsium) konsentrasi tinggi dalam kondisi dingin, kemudian diberi kejutan panas ( $42^{\circ}C$ ). Pada proses ini diasumsikan bahwa dinding sel bakteri rusak pada daerah-daerah tertentu, sehingga

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.

dengan kondisi tersebut molekul DNA yang berada di sekitar sel dimungkinkan untuk masuk ke bagian dalam sel bakteri. Maksimum frekuensi transformasi metode ini adalah sekitar 1 sel tertransformasi berbanding 1.000, atau  $10^{-3}$  sel, dan efisiensi transformasinya adalah  $10^7$  sampai  $10^8$  koloni sel tertransformasi per mikrogram DNA plasmid utuh (Glick & Pasternak, 1994).

**Konjugasi** bakteri dalam mengintroduksi DNA plasmid ke dalam berbagai bakteri telah banyak dimanfaatkan karena kontribusinya yang nyata. Walaupun introduksi DNA plasmid dapat dilakukan dengan elektrotransformasi, namun sejauh ini metode konjugasi bakteri banyak dimanfaatkan karena merupakan metode paling efisien dan umum. Prinsip konjugasi bakteri adalah transfer DNA plasmid dari satu sel ke sel lain yang saling kontak. Di dalam konjugasi bakteri terjadi proses replikasi, yaitu suatu sel akan mentransfer kopi plasmidnya ke sel inang baru, dan kedua sel pada tahap akhir masing-masing akan membawa plasmid tersebut. Plasmid yang dapat ditransfer dari satu sel ke sel lain secara konjugatif disebut plasmid konjugatif, yaitu mempunyai gen *tra* yang mengendalikan sintesis pili dari sel donor ke sel resipien. Pili diperlukan untuk mengadakan kontak sel ke sel antara donor dan resipien yang efektif pada saat mentransfer DNA. Disamping itu diperlukan pula adanya lokus *bom* (*basis of mobility*), yaitu lokus yang mengandung situs dimulainya transfer DNA, disebut situs transfer origin (*oriT*), (Provence & Curtiss III, 1999). Galur yang mempunyai lokus *bom* disebut *mob*<sup>+</sup>.

Tidak semua plasmid untuk kloning memiliki *tra* dan *bom*. Umumnya hanya memiliki lokus *bom*, sehingga tidak dapat mensintesis pili. Namun, jika plasmid



nonkonjugatif ini berada di dalam sel bersama dengan plasmid konjugatif, maka fungsi *tra* milik plasmid konjugatif dapat berperan secara *in trans*, sehingga dapat memperlancar transfer plasmid yang hanya mempunyai *bom*. Di dalam penelitian ini konjugasi bakteri dilakukan secara rutin dari *E. coli* pembawa plasmid rekombinan ke resipien *Pseudomonas fluorescens* dengan cara konjugasi diparental (*diparental mating*) (Simon *et al.*, 1983), atau cara konjugasi triparental (*triparental mating*) (Ditta *et al.*, 1980). Plasmid-plasmid vektor yang digunakan di dalam penelitian ini bersifat nonkonjugatif karena tidak memiliki gen *tra*, sehingga membutuhkan peranan plasmid konjugatif pRK2013, atau menggunakan inang transformasi *E. coli* S17-1 yang bersifat Hfr (Ditta *et al.*, 1980; Figurski & Helinski, 1979).

Sejumlah penelitian melaporkan transfer gen kitinase ke dalam *Pseudomonas* sp secara konjugasi bakteri. Koby *et al.* (1994), melaporkan telah mengintroduksi gen kitinase asal *S. marcescens* (*chiA*) ke *P. fluorescens* menggunakan mini transposon turunan Tn7 sebagai perantara integrasi gen kitinase ke kromosom *P. fluorescens* secara konjugasi triparental. Sundheim *et al.* (1988), mengintroduksi gen kitinase hasil klon dari *S. marcescens* secara konjugasi tiga tetua ke *Pseudomonas* spp yang berfluoresens.

Transduksi adalah transfer gen lainnya yang terjadi pada mikroorganisme adalah yaitu introduksi DNA dari satu sel ke sel lain dengan perantara virus bakteri. Di dalam penelitian ini teknik transfer gen secara transduksi tidak dilakukan. Pada prinsipnya transduksi melibatkan pemaketan DNA ke dalam kepala faga yang





kosong. Partikel pentransduksi ini mampu menginfeksi sel resipien, sehingga segmen DNA yang tertransduksi diinjeksikan ke dalam sel inang baru (Dale, 1994).

### G. Sekuensing DNA

Penentuan sekuens suatu DNA adalah salah satu aspek terpenting dari biologi molekuler modern. Perkembangan dunia sains, khususnya biologi molekuler terpacu dengan adanya teknik sekuensing DNA. Dengan memahami sekuens nukleotida, maka dapat diperoleh informasi yang definitif tentang suatu molekul DNA. Fungsi suatu gen dapat diketahui dengan mendeduksi sekuens nukleotida yang diperoleh, kemudian membandingkannya dengan data sekuens yang sudah diketahui fungsinya.

Ada dua prinsip sekuensing DNA, yaitu (i) berdasarkan reaksi kimiawi yang dikembangkan oleh Maxam dan Gilbert; dan (ii) berdasarkan enzimatik yang dikembangkan oleh Sanger, menggunakan metode *dideoxynucleotide* (Glick & Pasternak, 1994). Namun yang lebih banyak dikembangkan sekarang ini adalah metode *dideoxynucleotide* yang dilabel dengan senyawa berfluorescens (Griffin & Griffin, 1993). Prinsip *dideoxynucleotide* adalah sintesis berbagai ukuran panjang utas DNA yang komplemen dengan utas cetaknya oleh suatu polimerase DNA.

Strategi sekuensing DNA tergantung tujuan dan ketersediaan fragmen DNA. Untuk sekuensing suatu molekul DNA plasmid dalam hal penentuan orientasi, ataupun untuk mengetahui struktur plasmid tersebut, atau untuk menentukan sekuens suatu mutasi, dapat dilakukan subkloning fragmen restriksi ke dalam suatu vektor M13, kemudian disekuens menggunakan primer universal M13. Untuk suatu



molekul DNA yang panjang, diperlukan perencanaan yang melibatkan bermacam strategi, yaitu (i) pendekatan secara *shotgun*, yaitu suatu pendekatan acak melibatkan subkloning fragmen-fragmen acak dari DNA target ke dalam suatu vektor yang sesuai, seperti M13; (ii) strategi sekuensing terarah; yaitu melibatkan konstruksi satu **met deletion** tersarang (*nested deletion*) suatu fragmen DNA menggunakan nuklease yang menghasilkan potongan-potongan berukuran 200-300 pasangan basa. Fragmen-fragmen yang diperoleh diklon ke suatu vektor yang mempunyai situs primer universal dan (iii) teknik *Gene-walking* atau *Primer-walking*. Teknik ini dapat langsung diterapkan ke klon DNA plasmid dan pula hanya pada suatu utas tunggal M13 yang akan disekuens. Strategi ini melibatkan sekuensing menggunakan primer universal *forward* dan *reverse*. Informasi sekuens yang diperoleh dari sekuensing dengan primer universal tersebut digunakan untuk mendesain primer oligonukleotida sintesis baru, sehingga didapat sekuens sekitar 400 basa berikutnya, dan seterusnya digunakan untuk mendesain primer berikutnya (Griffin & Griffin, 1993; Glick & Pasternak, 1994). Namun, kendala dalam penyediaan primer-primer oligonukleotida tersebut antara lain adalah pertimbangan biaya untuk mensintesis.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan tidak memerlukan perijinan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

2. Dilarang meminumikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.