



DISERTASI

**KONSTRUKSI FUSI TRANSKRIPSI GEN KITINASE DARI
Aeromonas caviae DAN EKSPRESINYA PADA
*Pseudomonas fluorescens***

Oleh

AMARILA MALIK



**PROGRAM PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2000**

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

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

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



DISERTASI

KONSTRUKSI FUSI TRANSKRIPSI GEN KITINASE DARI
Aeromonas caviae DAN EKSPRESINYA PADA
Pseudomonas fluorescens

Oleh

AMARILA MALIK

PROGRAM PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2000

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural 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.

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



“...Allah meninggikan orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan, beberapa derajat ...” (Al Mujaadalah : 11)

To my parents,

To my beloved husband, Rusli, and our children, Rizka and Radhian

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 kritika 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.



ABSTRACT

Chitinase gene (*chi*) from *Aeromonas caviae* WS7b, which was cloned previously in pUC19 based plasmid vector, has been sequenced. Its completed nucleotide sequence was determined. The structural gene consists of 2.937 bp with an ORF encoding 865 amino acids. DNA sequence analysis indicated that the gene was cloned without its indigenous promoter. Comparison to other chitinase genes in database shows that the deduced amino acid sequence was nearly identical (97%) to *chiA* from *A. caviae* isolated from Israel. In this study, *chi* was cloned either under a strong constitutive promoter, i.e. PKm^R, as a transcriptional fusion, or under an inducible strong promoter, *Ptac*. To introduce the gene fusion/s into *Pseudomonas fluorescens*(Pf), the constructs were cloned into broad host range plasmid vectors such as pRK415, pBBR1MCS2, and pVSP61. Chitinolytic expression of PKm^R-*chi* fusion on chitin agar plate as clear zones could only be demonstrated in a recombinant plasmid based on pBBR1MCS2 replicon, designated as pAM340. pBBR1MCS2, which has higher copy number than the either pRK415 or pVSP61, was used as a vector for the construction of *Ptac-chi*, which was designated as pAM630. A PKm^R-*chi* fusion in a suicide vector, pUTmini-Tn5 Sp/Sm, has been constructed as well, and was designated as pAM520. Construction of pAM520 was performed to obtain the *chi* fusion clone that integrated into Pf chromosome, and that will be stably maintained as a single copy number. From the three transcriptional fusion recombinants, only *Escherichia coli* harboring pAM520 recombinant could not demonstrated chitinolytic activity. To mobilize the *chi* fusion recombinant into Pf, gene transfer was performed employing bacterial conjugation. Based on the time of incubation required to display transparent zone on chitin agar plate, the *chi* gene expression in Pf demonstrated much higher activity than when the same construct was present in *E. coli*. Chitinase activities were determined spectrophotometrically using colloidal chitin azure as a specific substrate. The results showed that the expression of *chi* fusion in *E. coli* was significantly

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



influenced by plasmid copy number as shown in *E. coli* (pWS506), which expressed intracellular chitinase activity (4.17 U/mg protein) several folds higher than that of medium copy plasmid in *E. coli* (pAM630) (1.05 U/mg protein). Pf5100 (pAM630) overnight culture accumulated chitinase in the intracellular fraction which is three folds higher (2.53 U/mg protein) than the control strain. There was no significant chitinase activity in the extracellular fraction of Pf5100 (pAM630). From these results, it could be concluded that the expression of *chi* was influenced by gene copy number of constructed gene, as well as the nature of bacterial host used in this study.

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



RINGKASAN

AMARILA MALIK. Konstruksi fusi transkripsi gen kitinase dari *Aeromonas caviae* dan ekspresinya pada *Pseudomonas fluorescens*. Di bawah bimbingan ANTONIUS SUWANTO sebagai ketua, dan berturut-turut BUDI TIAHJONO, MAGGY T. SUHARTONO, INDRAWATI GANDJAR dan EDI GUHARDJA sebagai anggota komisi.

Penelitian tentang gen kitinase dan pemanfaatannya telah banyak dilakukan. Gen kitinase berpotensi antara lain untuk mengkonstruksi agens biokontrol terhadap endapan patogen tanaman, selain untuk dimanfaatkan dalam studi regulasi dan ekspresi gen, serta proses degradasi kitin. Gen kitinase yang diisolasi dari *Aeromonas caviae* masih belum banyak dilaporkan jika dibandingkan dengan laporan tentang gen kitinase dari *Serratia marcescens*. Studi tentang kloning gen kitinase secara fusi transkripsi telah dilaporkan, namun sumber gen kitinase yang digunakan adalah gen kitinase dari *S. marcescens*. Di dalam penelitian ini gen kitinase (*chi*) dari *A. caviae* isolat WS7b yang diklon pada vektor berbasis pUC (pWS506) oleh peneliti sebelumnya, telah disekuens, dan sekuens nukleotida yang diperoleh dianalisis dengan membandingkan dengan kitinase yang telah ada di *database*.

Konstruksi fusi transkripsi gen *chi* di dalam penelitian ini menggunakan vektor berspektrum inang luas, yaitu pRK415, pBBR1MCS2, dan pVSP61. Ketiga vektor mempunyai karakter berbeda, yaitu dari jumlah kopi, penanda antibiotik, ukuran plasmid, situs endonuklease restriksi, dan kelompok inkompatibilitas. Promotor untuk ekspresi gen *chi* yang digunakan di dalam penelitian ini adalah promotor gen resistensi Kanamisin, PKm^R, yang bersifat konstitutif, yang diisolasi dari pC4K, dan promotor hibrid *trp-lac* (*P_{tac}*) yang merupakan promotor kuat bersifat terinduksi, namun dalam keadaan tidak terinduksi bersifat konstitutif. Konstruksi fusi *chi* diintroduksi ke *Pseudomonas fluorescens* (Pf) galur dan isolat biokontrol. Galur yang digunakan adalah B29, yaitu biokontrol bakteri patogen penyebab pustul pada tanaman kedelai, serta isolat Pf5024 dan Pf 5100, yaitu biokontrol penghasil biosurfaktan yang diisolasi dari tanaman brokoli.

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

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

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



Penelitian ini bertujuan untuk : (i) karakterisasi DNA gen *chi* dengan sekuensing, dan data sekuens yang diperoleh akan dibandingkan dengan kitinase-*kitinase* yang sudah ada di *database* untuk mempelajari kekerabatannya; (ii) mengkonstruksi gen *chi* sebagai fusi transkripsi di bawah promotor ekspresi yang konstitutif; (iii) mengintroduksi fusi transkripsi *chi* ke *P. fluorescens* (Pf) isolat-isolat biokontrol ; (iv) menganalisis ekspresi gen *chi* pada isolat-isolat Pf secara esei kualitatif dan esei kuantitatif.

Untuk mencapai tujuan tersebut telah dilakukan serangkaian percobaan sebagai berikut, yaitu (i) sekuensing DNA gen *chi* dengan strategi subkloning dan *primer walking*. Data sekuens yang diperoleh dianalisis dengan program *BLAST* dari European Bioinformatics Institute, dan sekuens asam amino turunan diperoleh dengan program *Swiss-Prot*. Perbandingan dengan kitinase-*kitinase* yang sudah ada dilakukan menggunakan program *Clustal-W*; (ii) konstruksi fusi transkripsi PKm^R-*chi* pada vektor-vektor plasmid berspektrum inang luas, analisis ekspresi kitinolitik rekombinan-rekombinan di klon *E. coli*, dan introduksi rekombinan kitinolitik (pAM300) ke isolat-isolat Pf; (iii) konstruksi fusi transkripsi PKm^R-*chi* pada vektor transposon mini, pUTmini-Tn5 Sp/Sm, menghasilkan pAM520, analisis ekspresi kitinolitik rekombinan di klon *E. coli*, dan introduksi pAM520 ke isolat-isolat Pf, serta analisis keberadaan gen *chi* dengan metode amplifikasi; (iv) konstruksi fusi transkripsi *Ptac-chi* pada vektor berspektrum inang luas pBBR1MCS2, menghasilkan pAM630, analisis ekspresi kitinolitik rekombinan di klon *E. coli*, dan introduksi pAM630 ke Pf5100; (v) esei aktivitas kitinase secara spektrofotometri menggunakan substrat spesifik Chitin Azure, serta mengukur konsentrasi protein total dari fraksi ekstraselular dan intraselular.

Dari hasil sekuensing diperoleh sekuens nukleotida gen *chi* sepanjang 2.937 pasang basa yang menyandikan 865 asam amino turunan yang menunjukkan kemiripan sekuens DNA sangat tinggi (98%) dan kemiripan sekeuns asam amino turunan 97% dengan *chiA* dari *A. caviae* asal Israel. Fragmen DNA *chi* mengandung satu kerangka baca terbuka yang mempunyai sekuens mirip sekuens *Shine-Dalgarno*



AGGA terletak 9 nukleotida mendahului kodon inisiasi transkripsi ATG. Pada ujung karboksil terdapat tiga buah sekuens ulangan terbalik yang potensial membentuk struktur *hairpin-loop* sebagai terminasi transkripsi yang didahului oleh kodon terminasi translasi TGA.

E. coli yang membawa konstruksi fusi transkripsi PKm^R-*chi* di pRK415 (pAM230) dan pVSP61 (pAM430) tidak menunjukkan ekspresi kitinolitik medium agar-agar kitin yang diamati sampai 7 hari inkubasi, sedangkan fusi di pBBR1MCS2 (pAM300 dan pAM340) dapat mendegradasi kitin, namun tidak sekuat di inang asalnya. Dari faktor jumlah kopi gen, pBBR1MCS2 mempunyai jumlah kopi lebih tinggi daripada pRK415 dan pVSP61. Introduksi pAM340 ke Pf B29 tidak berhasil memperoleh ekskonjugan yang kitinolitik. Introduksi pAM340 ke Pf 5100 berhasil memperoleh ekskonjugan yang menunjukkan ekspresi kitinolitik yang cukup kuat berupa zona bening setelah diinkubasi selama 9 hari. Hasil analisis amplifikasi menunjukkan Pf B29 tidak membawa gen *chi*, sedangkan Pf 5100 membawa gen *chi*.

E. coli yang membawa fusi transkripsi PKm^R-*chi* di pUTmini-Tn5 Sp/Sm (pAM520) tidak menunjukkan ekspresi kitinolitik sampai 10 hari inkubasi. Introduksi pAM520 ke Pf B29, Pf 5024 dan Pf 5100 dianalisis dengan amplifikasi gen *chi* menunjukkan bahwa gen *chi* tidak ada di dalam Pf B29, namun terbukti ada di dalam Pf 5024 dan 5100. Ekspresi gen *chi* di Pf 5024 dan 5100 tidak terlihat sampai 10 hari inkubasi pada medium agar-agar kitin.

E. coli yang membawa konstruksi fusi transkripsi *Ptac-chi* di pBBR1MCS2, yaitu pAM630, menunjukkan ekspresi kitinolitik setelah diinkubasi selama 11 hari, namun zona bening yang dihasilkan lemah. Introduksi pAM630 ke Pf 5100 berhasil memperoleh ekskonjugan kitinolitik yang cukup kuat dari munculnya zona bening setelah diinkubasi selama 7 hari.

Hasil esei aktivitas kitinase menunjukkan bahwa ekspresi fusi *chi* di *E. coli* dipengaruhi oleh jumlah kopi plasmid sebagaimana yang ditunjukkan oleh *E. coli* pembawa pWS506, yang merupakan plasmid berjumlah kopi tinggi, yang

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



mengekspresikan kitinase intraselular empat kali lipat lebih tinggi (4.17 U/mg protein) dari *E. coli* pembawa pAM630 yang merupakan plasmid berjumlah kopi medium (1.05 U/mg protein). Kitinase terakumulasi pada fraksi intraselular dari kultur semalam Pf5100 (pAM630) yang menunjukkan aktivitas tiga kali lipat (2.53 U/mg protein) dari aktivitas pada fraksi ekstraselular (0.93 U/mg protein). Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa ekspresi gen *chi* dipengaruhi oleh jumlah kopi gen serta sifat bakteri inang atau isolat yang digunakan pada penelitian ini.

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



**KONSTRUKSI FUSI TRANSKRIPSI GEN KITINASE DARI
Aeromonas caviae DAN EKSPRESINYA PADA
*Pseudomonas fluorescens***

Oleh

Amarila Malik
95575

Disertasi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
DOKTOR

pada Program Studi Biologi Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

**PROGRAM PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2000**

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

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



JUDUL DISERTASI : KONSTRUKSI FUSI TRANSKRIPSI GEN KITINASE DARI *Aeromonas caviae* DAN EKSPRESINYA PADA *Pseudomonas fluorescens*

NAMA MAHASISWA : AMARILA MALIK

NOMOR MAHASISWA: 95575

PROGRAM STUDI : BIOLOGI

MENYETUJUI :

1. Komisi Pembimbing

Dr. Ir. Antonius Suwanto, M Sc.
Ketua

Dr. Ir. Budi Tjahjono, M Agr.
Anggota

Prof. Dr. Ir. Maggy T. Suhartono
Anggota

Prof. Dr. Indrawati Gandjar
Anggota

Prof. Dr. Edi Guhardja
Anggota

2. Ketua Program Studi Biologi

Dr. Ir. Dedi Setiadi, MS

3. Direktur Program Pasca Sarjana

Sri Prada Manuwoto, MSc



Tanggal Lulus : 19 Agustus 2000

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



RIWAYAT HIDUP

Penulis adalah anak kedua dari empat bersaudara putra-putri dari ayah Amir dan ibu Martha Amir, dilahirkan di Jakarta pada tanggal 3 Oktober 1964. Telah menikah dan mempunyai seorang putri Rizka Maulida dan seorang putra Radhian Amandito dari suami yang bernama Yusuf Yunus.

Penulis lulus pendidikan Sekolah Dasar (SD) di SD Adik Irma Suryani, Jakarta, bulan Desember tahun 1976, lulus pendidikan Sekolah Menengah tingkat Pertama (SMP) di SMP Negeri I, Jakarta bulan Juni tahun 1980, dan lulus pendidikan Sekolah Menengah tingkat Atas (SMA) di SMA Negeri 4, Jakarta bulan Juni tahun 1983. Pada tahun yang sama melanjutkan pendidikan ke Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Indonesia (UI) melalui Proyek Perintis I. Lulus sarjana Farmasi pada bulan September tahun 1988, melanjutkan ke pendidikan Profesi Program Apoteker di Jurusan yang sama hingga lulus bulan Desember 1989. Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang S2 pada tahun akademik 1991/1992 hingga lulus bulan Oktober tahun 1993 di Program Studi Farmasi Pascasarjana Institut Teknologi Bandung dengan sponsor dari Tim Manajemen Program Doktor (TMPD), Direktorat Pendidikan Tinggi (Dikti). Pada tahun akademik 1995/1996 penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang S3 di Program Studi Biologi Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor dengan sponsor dari Beasiswa Unggulan (URGE) dari Bank Dunia melalui Dikti. Sejak bulan Maret 1990 hingga sekarang menjadi staf pengajar di Jurusan Farmasi FMIPA UI.



UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan atas segala rahmat dan hidayah dari Allah SWT atas selesainya pelaksanaan penelitian dan penulisan disertasi ini, dan semoga membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, khususnya di bidang Biologi.

Dalam melaksanakan penelitian dan penulisan disertasi penulis telah mendapat bantuan dari berbagai pihak, baik berupa saran, kritik, dana, maupun bantuan moril dan doa. Pada kesempatan ini perkenankan penulis mengucapkan terima kasih yang tulus dan sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan.

Kepada. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc., sebagai ketua komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan, saran dan arahan mulai dari pemilihan mata ajaran, penyusunan usulan penelitian, pelaksanaan penelitian sampai penulisan disertasi. Penghargaan yang tinggi penulis haturkan atas dorongan beliau yang memotivasi penulis untuk mengembangkan kemampuan bersikap mandiri, tekun, dan percaya diri dalam meneliti. Tidak lupa rasa terima kasih yang besar atas kesempatan yang diperoleh untuk melakukan sebagian pekerjaan penelitian ini di Scottish Agricultural College, The University of Edinburgh, dari Higher Education LINK Project, berjudul "Sustainable crop protection to improve food production: transferring technology from research to practice" dari DFID, The British Council, dimana beliau adalah salah seorang koordinator.

Kepada Dr. Ir. Budi Tjahjono, M.Agr., sebagai anggota komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan saran, serta kesempatan bergabung dalam kelompok peneliti Hibah Tim (URGE) Project Grant 029/HPPP/II/URGE/1996 "Construction of Biocontrol for Bacterial Disease in Plants: Genome Analysis, Pathogenesis, and Molecular Ecology of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*", sehingga mendapat bantuan dana yang berharga untuk dapat melaksanakan dan menyelesaikan penelitian ini. Kepada Prof. Dr. Ir. Maggy T. Suhartono, sebagai

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



anggota komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan saran, serta kesempatan melakukan sebagian pekerjaan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, Pusat Antar Universitas-Bioteknologi, IPB yang beliau kepalai. Kepada Prof. Dr. Indrawati Gandjar, sebagai anggota komisi pembimbing atas bimbingan dan saran, serta dukungan moril yang kuat sebagai intelektual dan Guru Besar FMIPA, Universitas Indonesia, tempat penulis bekerja sebagai staf pengajar. Kepada Prof. Dr. Edi Guhardja, sebagai anggota komisi pembimbing atas bimbingan dan saran, serta kearifan dalam memberikan pandangan dan masukan yang berguna bagi kesempurnaan suatu disertasi.

Kepada Dr. Endang Purwantini, staf pengajar FMIPA Institut Teknologi Bandung, dan Dr. Anja Meryandini, staf pengajar FMIPA Institut Pertanian Bogor, sebagai penguji luar komisi, atas saran dan kritik yang menjadi masukan yang bermanfaat agar disertasi ini menjadi lebih sempurna lagi.

Kepada Direktur Program Pascasarjana dan Ketua Program Studi Biologi, Institut Pertanian Bogor, beserta staf yang telah memberikan kesempatan untuk pendidikan S3 dengan Beasiswa Unggulan URGE (*University Research for Graduate Education*) Batch III tahun 1996/1997. Kepada Rektor Universitas Indonesia, Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, dan Ketua Jurusan Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk pendidikan S3 di Institut Pertanian Bogor.

Kepada Direktur SEAMEO BIOTROP (*South East Asia Regional Centre for Tropical Biology*) Prof. Dr. Sitanala Arsyad yang telah memberikan kesempatan dan mengizinkan melakukan penelitian di Laboratorium *Molecular Biology*. Kepada para peneliti dan staf/karyawan SEAMEO BIOTROP atas kesempatan menggunakan fasilitas, terutama kepada Prof. Dr. Irene M. Umboh sebagai kepala Divisi *Biotechnology and Tree Breeding* (BTB), beserta staf dan teknisi yang dengan penuh kesabaran dan pengertian dalam suasana kekeluargaan dan persahabatan yang tulus memberikan dukungan bagi kelancaran pekerjaan penelitian ini tidak akan dapat dilupakan.



Kepada Dr. Rob Harling, koordinator Higher Education LINK Project berjudul “*Sustainable crop protection to improve food production: transferring technology from research to practice*” dari DFID, The British Council, atas bimbingan, saran, dan arahan yang diberikan selama melakukan sebagian penelitian ini di Scottish Agricultural College, University of Edinburgh, Scotland, UK.

Kepada rekan-rekan mahasiswa, para staf dan karyawan Pascasarjana IPB, para teknisi PAU-Bioteknologi IPB dan Laboratorium *Molecular Biology* SEAMEO BIOTOP, yang selama ini telah membantu dan bekerjasama dengan baik.

Kepada yang tercinta keluarga penulis, ibu, ayah, suami, anak-anakku, nenek, kakak-adik-adik, dan ibu mertua, yang selalu memberikan dukungan moril dan kekuatan do’a, serta toleransi yang tak terhingga berupa rasa pengertian dan sangat memaafkan sejak awal hingga selesainya pendidikan S3 ini.

Kepada semua pihak yang belum disebutkan, penulis ucapkan banyak terima kasih.

Atas segala bantuan dan amal baiknya, penulis mendo’akan mudah-mudahan diberikan imbalan yang setimpal oleh Allah SWT. Amiin.



KATA PENGANTAR

Berkat rahmat Allah SWT, penelitian dan penulisan disertasi yang berjudul "Konstruksi fusi transkripsi gen kitinase dari *Aeromonas caviae* dan ekspresinya pada *Pseudomonas fluorescens*" dapat diselesaikan. Dalam penelitian ini dilakukan konstruksi penyisipan gen *chi* di bawah promotor konstitutif dan terinduksi, dan dikloning pada vektor berspektrum inang luas dan vektor transposon, sehingga ekspresi gen *chi* akan dikendalikan secara konstitutif di inang *Pseudomonas fluorescens* isolat lokal biokontrol. Melalui penelitian dan penulisan ini penulis ingin menyampaikan informasi tentang karakteristik gen *chi* dari *A. caviae* asal Indonesia, serta kemungkinan pemanfaatannya sebagai sumber gen *chi* yang berpotensi dalam mengkonstruksi biokontrol cendawan patogen tanaman.

Berdasarkan konstruksi fusi transkripsi yang dihasilkan di dalam penelitian ini maka ekspresi kitinase di biokontrol akan bersifat konstitutif tanpa induksi, yang sangat sesuai untuk diimplikasikan sebagai biokontrol pencegah serangan cendawan patogen alternatif. Dengan demikian, penggunaan fungisida kimia yang selama ini telah terbukti dapat memberikan dampak buruk pada lingkungan, dan membahayakan makhluk hidup serta mikroorganisme non target lainnya, dapat dihindari.

Penulis mengharapkan adanya sumbang saran dan kritikan dari pembaca sekalian untuk menjadikan hasil penelitian disertasi tentang konstruksi fusi transkripsi gen *chi* di biokontrol *P. fluorescens* ini berpotensi untuk dikembangkan dalam pencegahan cendawan patogen alternatif fungisida kimia.

Bogor, Agustus 2000

Penulis

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 artikel 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.



DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xix
PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	6
C. Tahap Pengerjaan	6
D. Manfaat Penelitian	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Enzim Kitinase	8
B. Gen Kitinase bakteri yang telah dilaporkan	11
C. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
D. Teknologi DNA rekombinan	16
E. Regulasi ekspresi gen dan fusi transkripsi	24
F. Transfer gen pada Bakteri	28
G. Sekuensing DNA	32
III. BAHAN DAN METODE	34
A. Tempat Penelitian	34
B. Bahan	34
C. Prosedur Umum dan Peralatan	42
D. Metode	44
E. Sekuensing DNA gen kitinase	53
F. Konstruksi gen <i>chi</i> di bawah promotor gen Km^R dan introduksi ke <i>P. fluorescens</i>	59

- 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 mengumumikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



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

F. 1. Penyisipan gen penanda resistensi antibiotik	59
F. 2. Penyisipan gen Km ^R pada plasmid vektor berspektrum inang luas ...	59
F. 3. Pembuatan fragmen gen <i>chi</i> berujung tumpul dengan teknik <i>fill-in</i> ...	61
F. 4. Penyisipan fragmen tumpul gen <i>chi</i> pada vektor perantara	62
F. 5. Penyisipan gen <i>chi</i> di bawah PKm ^R	62
F. 6. Penyisipan gen penyandi Gm ^R sebagai penanda seleksi	63
F. 7. Introduksi konstruksi fusi transkripsi PKm ^R - <i>chi</i> pada vektor berspektrum inang luas ke Pf	63
G. Rekonstruksi fusi transkripsi PKm ^R - <i>chi</i> menggunakan vektor integrasi dan introduksi ke <i>P. fluorescens</i>	64
1. Konstruksi sisipan fragmen gen <i>chi</i> dengan penanda Gm ^R	64
2. Penyisipan fragmen <i>chi</i> -Gm ^R di bawah PKm ^R pada pUC4K	66
3. Penyisipan fragmen fusi PKm ^R - <i>chi</i> -Gm ^R pada vektor perantara pUC18 <i>NotI</i>	66
4. Konstruksi fusi PKm ^R - <i>chi</i> -Gm ^R pada vektor integrasi pUTmini	67
5. Introduksi konstruksi fusi PKm ^R - <i>chi</i> pada pUTmini ke Pf	67
H. Konstruksi Fusi Transkripsi gen <i>chi</i> di bawah <i>Ptac</i> dan introduksi ke Pf ..	67
H. 1. Pengambilan <i>Ptac</i> dari pKK223-3 dan penyisipan pada vektor plasmid	68
H. 2. Fusi transkripsi fragmen gen <i>chi</i> -Gm ^R di bawah kontrol <i>Ptac</i>	68
H. 3. Introduksi konstruksi fusi <i>Ptac</i> - <i>chi</i> ke Pf	69
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	71
A. Sekuens DNA gen kitinase	71
B. Konstruksi gen <i>chi</i> di bawah PKm ^R dan introduksi ke Pf	80
C. Rekonstruksi fusi transkripsi PKm ^R - <i>chi</i> menggunakan vektor transposon dan introduksi ke Pf	92
D. Konstruksi fusi transkripsi gen <i>chi</i> di bawah <i>Ptac</i> dan introduksi ke Pf	97



E. Esei enzimatik kitinase dengan substrat spesifik	104
V. KESIMPULAN DAN SARAN	117
DAFTAR PUSTAKA	120

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

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



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Struktur kitin	9
2. Lintasan degradasi kitin	10
3. Alur informasi dan fakto-faktor regulasi ekspresi gen	26
4. Fusi gen terhadap suatu gen penyandi	28
1. Strategi sekuensing gen <i>chi</i> dengan subkloning dan <i>primer walking</i>	55
2. Skema konstruksi fusi transkripsi PKm ^R - <i>chi</i> pada vektor berspektrum inang luas	60
3. Plasmid p34S-Gm	63
3.4. Skema konstruksi fusi transkripsi PKm ^R - <i>chi</i> -Gm ^R pada vektor integrasi pU6 mini-Tn5 Sp/Sm	65
3.5. Skema konstruksi fusi transkripsi <i>Ptac-chi</i> -Gm ^R pada vektor berspektrum inang luas	70
4.1. Sekuens nukleotida fragmen 2.9 kb gen <i>chi</i> beserta sekuens asam amino turunan	75
4.2. Perbandingan sekuens asam amino turunan dari kitinase-kitinase yang berkerabat dekat	77
4.3. Analisa perbandingan ujung karboksil gen <i>chi</i> WS7b	80
4.4. Penyisipan gen Tp ^R di bagian hilir gen <i>chi</i> pada pWS506	81
4.5. Vektor-vektor berspektrum inang luas yang digunakan	83
4.6. Penyisipan fragmen <i>chi</i> -Tp ^R pada plasmid pAS385	84
4.7. Verifikasi orientasi pAM201 dengan enzim restriksi pada gel agaros	86
4.8. Fragmen <i>chi</i> -Tp ^R disisipkan di vektor-vektor pembawa gen Km ^R	87
4.9. Verifikasi orientasi rekombinan fusi transkripsi pAM330	88
4.10. Peta restriksi plasmid pAM330	89
4.11. Ekspresi kitinolitik gen <i>chi</i> pada klon <i>E. coli</i> dan <i>P. fluorescens</i> 5100 pembawa pAM340	91
4.12. Peta restriksi plasmid pembawa sisipan fragmen <i>chi</i> -Gm ^R , pAM202	93
4.13. Peta restriksi pAM500 (A)	94

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



4.14	Verifikasi rekombinan pAM500, pAM503 dan pAM520	95
4.15	Esei aktivitas kitinolitik <i>E. coli</i> (pAM500)	96
4.16	Analisis keberadaan gen <i>chi</i> dengan teknik amplifikasi	97
4.17	Konstruksi <i>Ptac</i> pada pBBR1MCS2 dalam dua orientasi	99
4.18	Hasil elektroforesis pengambilan fragmen <i>Ptac</i> dari pKK223-3 dan verifikasi pAM601 dan pAM630	101
4.19	Peta plasmid rekombinan pAM630	102
4.20	Esei aktivitas kitinolitik bakteri pembawa fusi transkripsi <i>Ptac-chi</i>	103
4.21	Kurva pengukuran waktu inkubasi optimum dan kurva standar	106
4.22	Aktivitas kitinase <i>A. caviae</i> WS7b pada dua suhu inkubasi	107
4.23	Esei kuantitatif aktivitas kitinase gen <i>chi</i> di <i>E. coli</i> dan <i>P. fluorescens</i> terhadap substrat Chitin Azure	109

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 mengumumikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Galur bakteri yang digunakan	36
3.2 Plasmid yang digunakan	37
4.1 Ukuran fragmen DNA hasil verifikasi pAM201	86
4.2 Ukuran fragmen DNA hasil verifikasi pAM330	88
4.3 Ukuran fragmen DNA hasil verifikasi pAM500, pAM503 dan pAM520	94
4.4 Ukuran fragmen DNA hasil verifikasi pAM601 dan pAM630	102
4.5 Ekspresi kitinolitik gen <i>chi</i> pada reombinan plasmid	105
4.6 Aktivitas kitinase hasil ekspresi gen <i>chi</i> di <i>E. coli</i> dan <i>P. fluorescens</i> ...	108

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