

KARAKTERISASI FRAGMENT DNA GEN GLUKOAMILASE (GLU1) PRODUK PCR DENGAN ANALISIS RESTRIKSI

Sofijan Hadi

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA Unair

ABSTRACT

Characterization used restriction enzyme on the 1784 bp (base pairs) DNA fragmen of glucoamylase gene (GLU1) of *E. fibuligera* ITB. R. cc. 64 has been done. The restriction enzyme usage was Stu I, Eco RI, Eco RV, Bam HI and Sau 3A. The purpose of this research were: First was to know recognition site of 1784 bp DNA fragmen of glucoamylase gene (GLU1) by the restriction enzyme above. The second was to know homologyst the glucoamylase gene (GLU1) *E. fibuligera* ITB. R. cc. 64 and the glucoamylase gene (GLU1) *Saccharomycopsis fibuligera* HUT 7212 (pSf GLU1). The result of amplification glucoamylase gene (GLU1) indicated that 1784 bp DNA fragmen on GLU1 locus has succesfully isolated and gave the same size with the positive control pSfGLU1. Analysis of those DNA fragmen by StuI, Eco RV, Eco RI, Bam HI and Sau 3A indicated that 1784 bp of DNA fragmen from *E. fibuligera* ITB.R.cc.64. has the same result with 1784 bp of DNA fragmen from pSfGLU1. The result of the fragments after incubated by restriction enzymes are as follows: \pm 997 bp and 787 bp by Eco RI, 1000 bp and 1780 bp by Bam H) and 850 bp and 760 bp by Sau 3A. Digestion using Stu I and Eco RI was failed. To ensure that the DNA fragmen 1784 bp has characteristic as glucoamylase gene, it should be expressed into *S. cerevisiae* and/or should be determined the nucleotide sequence by DNA sequencing.

Key words: glucoamylase gene (GLU1), *E. fibuligera*, PCR product, recognition site

PENGANTAR

Endomycopsis fibuligera adalah salah satu jenis ragi yang menghasilkan enzim amilase yang terdiri atas; α -amilase, glukoamilase, dan maltase. *E. fibuligera* mempunyai kemampuan yang baik dalam menghasilkan enzim α -amilase maupun glukoamilase (Futatsugi, *et al.*, 1993). Baktir (1991) telah melakukan biokonversi pati sago menjadi sirup glukosa menggunakan enzim amilase dari *E. fibuligera* ITB R.cc.64 yang diamobilisasi dalam matriks gel poliakrilamid. Pemisahan dan karakterisasi amilase dari *E. fibuligera* menghasilkan empat komponen enzim amilase, tiga komponen memberikan aktivitas sakarifikasi dan satu komponen diduga memberikan aktivitas likuifaksi (Baktir *et al.*, 1997)

Enzim glukoamilase (α -1,4; 1,6-glucoan glucohydrolase) mengkatalisis pemutusan eksoamilolitik dari substrat amilum menghasilkan glukosa. Enzim α -amilase (α -1,4-glucoan-4-glucoanohydrolase) mengkatalisis pemutusan endoamilolitik ikatan α -1,4-glikosidik dari substrat amilum, menghasilkan oligosakarida pendek dan dekstrin (Shibuya, *et al.*, 1992). Peran glukoamilase lebih menentukan dalam mengubah amilum menjadi glukosa dibanding peran α -amilase karena glukoamilase langsung menghasilkan glukosa. Karena bekerja secara sinergis kedua enzim tersebut sangat bermanfaat dalam aplikasi industri roti dan etanol yang menggunakan bahan baku amilum. Fuji dan Kawamura (1985) melaporkan efek sinergis antara α -amilase (*liquefying amylase*) dan glukoamilase

(*saccharifying amylase*), sehingga kekuatan menghidrolisis amilum menjadi glukosa menjadi berlipat ganda.

Kajian molekuler terhadap gen penyandi enzim amilase dari *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 menarik dilakukan untuk kepentingan analisis struktur dan fungsi dari gen tersebut. Selain itu juga dalam rangka untuk penggandaan (kloning gen), ekspresi dan manipulasi gen alfa-amilase dan glukoamilase ke arah upaya produksi enzim dalam skala besar dan yang memiliki sifat-sifat unggul.

Studi mutasi gen α -amilase dan glukoamilase diperlukan dalam upaya meningkatkan kualitas protein enzim yang dihasilkan dengan sasaran meningkatkan kemampuan sisi aktif enzim tersebut. Upaya penyisipan gen pengkode α -amilase dan glukoamilase ke dalam *S. cerevisiae* akan dapat meningkatkan fungsi kerja ragi itu dalam mencerna substrat amilum menjadi etanol dalam satu tahap reaksi. Oleh karena itu dibutuhkan studi mendalam terhadap gen α -amilase dan glukoamilase supaya tujuan di atas terwujud.

Puspansing dkk. (1999) telah dapat melakukan penyisipan (*insersi*) gen α -amilase pada plasmid YCP50 dan ditransformasikan di *Saccharomyces cerevisiae*, dan juga dapat melakukan penggandaan fragmen gen α -amilase *E. fibuligera* ITB R.cc.64 melalui PCR yang kemudian disisipkan pada vektor pMOSBlue-T untuk digunakan sebagai pelacak (*probe*) gen α -amilase.

Analisis molekuler terhadap gen penyandi enzim glukoamilase dari *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 diawali oleh Hadi (2001) dengan mengamplifikasi fragmen DNA yang

mengandung gen glukoamilase dari mikroba tersebut melalui *PCR* dengan ukuran 1784 pb. Upaya konstruksi rekombinan terhadap gen glukoamilase diperlukan dalam upaya *mengekspresikan* dan juga untuk mendapatkan klon dari gen tersebut. Maka perlu dilakukan analisis *restriksi* terhadap fragmen DNA gen glukoamilase hasil *amplifikasi* tersebut untuk mengetahui urutan pengenalan beberapa *enzim restriksi* pada gen tersebut.

BAHAN DAN CARA KERJA

Biakan *E. fibuligera* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung. Plasmid *pSfGLUI* (plasmid *S. Fibuligera* lokus gen glukoamilase) diperoleh dari Dr. Ichiro Yamashita, *Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University*. Primer dirancang atas dasar urutan nukleotida gen glukoamilase *GLUI S. fibuligera* (Yamashita *et al.*, 1987). Perancangan pemicu dilakukan dengan bantuan program komputer.

Bahan kimia yang digunakan mempunyai kemurnian untuk standar biologi molekuler. Di antaranya adalah: enzim *restriksi* yaitu *Stu I*, *Eco RI*, *Eco RV*, *Bam HI* dan *Sau 3A*, Etanol, PCR kit, Etidium-bromid, aquabidest, Sukrosa, agarosa, buffer TE, Buffer TAE, dan $MgCl_2$.

Alat yang digunakan berupa beberapa alat gelas dan nongelas yang biasa dipakai di laboratorium Kimia Organik-Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Unair. Alat-alat tersebut antara lain: *shaker incubator*, *freezer*, *gel electrophoresis Bio-rad*, *fotometri uv Shimadzu*, *micro centrifuge*, *autoclave*, neraca analitik, *laminar air flow cabinet*, *PCR Thermal cycler Bio-rad*, *vortex*, komputer foto polaroid, dan mikropipet.

Amplifikasi Fragmen DNA Lokus Gen Glukoamilase (*GLUI*)

Amplifikasi DNA target pada lokus gen glukoamilase dilakukan terhadap cetakan DNA *E. fibuligera* ITB R.cc.64 dan dilakukan uji kontrol positif menggunakan gen glukoamilase yang disisipkan dalam plasmid *pSf GLUI*. Ditentukan terlebih dahulu kondisi optimum reaksi PCR yang meliputi: konsentrasi cetakan DNA, konsentrasi $MgCl_2$, suhu *annealing* dan suhu ekstensi. Selanjutnya digandakan dalam 35 siklus dengan alat PCR *Thermal Cycler Bio-rad*, USA

Sebagai pedoman, kondisi reaksi PCR dapat dilakukan sebagai berikut. Untuk 50 ml reaksi diperlukan:

Cetakan DNA	0,25–0,5 mg
Buffer PCR 10× ($MgCl_2$ free)	5 ml (0,1–1,5 mM)
DNTP 2,5 mM (<i>each</i>)	4 ml (10 mM)
Primer masing-masing	2,5 ml (25 pmol)
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,5 U/ml
$MgCl_2$	3 ml (1,5–3 mM)
Aqua bidestilata sampai	50 ml

Karakterisasi Fragmen DNA lokus *GLUI E. fibuligera* ITB R.cc.64

Analisis fragmen 1784 pb DNA lokus *GLUI E. fibuligera* ITB R.cc.64 dilakukan dengan pemotongan sempurna fragmen DNA tersebut dengan kelima *enzim restriksi* *Stu I*, *Eco RV*, *Eco RI*, *Stu I* dan *Sau 3A*. Ke dalam masing masing tabung 1,5 ml di tambahkan 20 ml campuran reaksi yang mengandung sekitar 500 ng DNA hasil *PCR*, 2–3 unit *enzim restriksi* (*Amersham*), 2 ml buffer enzim 10x sesuai dengan enzim yang digunakan, dan akuabides steril. Campuran reaksi *diinkubasi* pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya enzim diinaktivasi dengan pemanasan pada suhu 70 °C selama 15 menit. Analisis yang sama juga dilakukan terhadap fragmen DNA lokus *GLUI* dari pSf *GLUI* sebagai pembanding.

Sebanyak 10 ml hasil pemotongan fragmen-fragmen DNA tersebut di atas, masing-masing dicampur 4 ml *loading buffer* kemudian dimasukkan dalam sumur-sumur gel agarosa 2% untuk dilakukan proses elektroforesis gel.

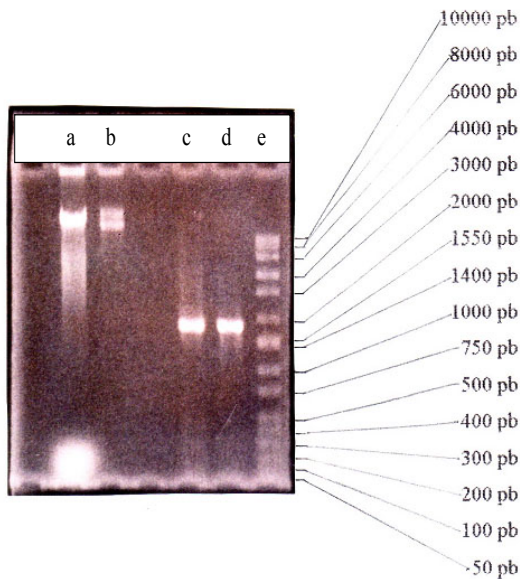
Analisis Data Dan Penafsiran Hasil Penelitian

Analisis dan penafsiran hasil penelitian didasarkan pada hasil *PCR* dan hasil pemotongan dengan *enzim restriksi* yang telah diaplikasikan pada *elektroforesis gel*, divisualisasi dengan UV *transluminator* pada I_{320} -*etidium bromide*, didokumentasi dengan foto *polaroid* dan diperkirakan ukuran *amplikonnya* dengan pita DNA standar khusus untuk *PCR*.

HASIL

Elektroforesis gel agarosa dari fragmen DNA lokus *GLUI* 1784 pb pb *E. fibuligera* ITB R.cc.64 produk PCR dan karakterisasi dengan enzim *restriksi* seperti terlihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Amplifikasi fragmen DNA lokus *GLUI* 1784 pb *E. fibuligera* ITB R.cc.64



Gambar 1. Hasil elektroforesis gel agarosa 2% a. DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB R cc.64 hasil isolasi; b. DNA plasmid *psfGLU1* (kontrol positif); c. Fragmen DNA hasil PCR *E. fibuligera* ITB.R.cc.64; d. Fragmen DNA hasil PCR *pSfGLU1*; e. *Direct Load Wide Range DNA Marker* (Katalog. 7058, Sigma)

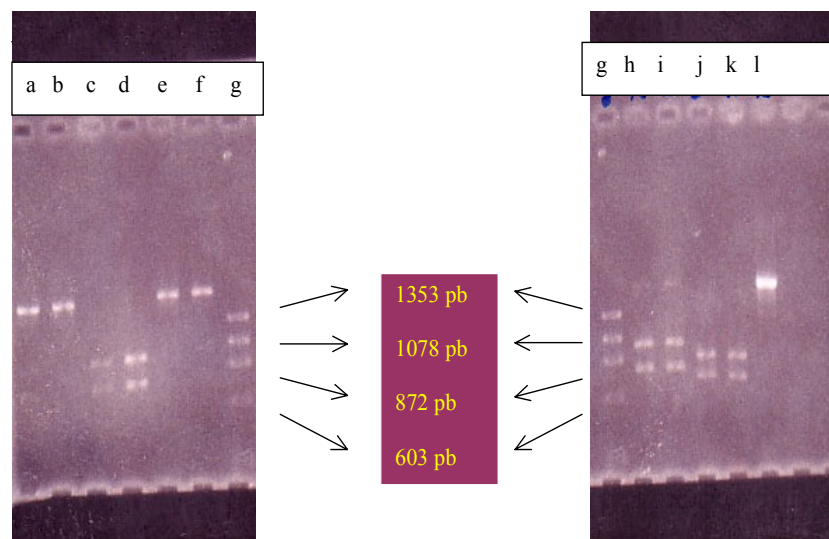
PEMBAHASAN

Amplifikasi fragmen DNA lokus *GLUI* 1784 pb *E. fibuligera*

Tujuan penggunaan *PCR* adalah untuk *amplifikasi* segmen DNA tertentu dalam hal ini adalah segmen dari gen glukamilase. Oleh karena itu hal pertama yang diperhatikan adalah keluarnya produk *amplifikasi* tersebut. Kemudian dilakukan optimasi kondisi *amplifikasi*. Optimasi ini bertujuan untuk menghasilkan produk *amplifikasi* dalam jumlah maksimal dan meminimalkan produk yang tidak dikehendaki dan *smear* yang akan muncul pada waktu *elektroforesis* (Innis dan Gelfand, 1990)

Amplifikasi DNA target melalui *PCR* yang dilakukan memberikan hasil bahwa DNA target yang berukuran 1784 pb (berdasarkan perancangan primer) dapat dihasilkan dengan cetakan DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB. R. cc. 64. Fragmen DNA 1784 pb juga dapat dihasilkan dengan cetakan DNA plasmid rekombinan *pSf GLUI* sebagai pembanding (kontrol positif). Hasil *amplifikasi* dengan *PCR* ini dapat dilihat pada Gambar 1. Dari analisis *elektroforesis* gelnya terlihat bahwa letak pita hasil penggandaan DNA kromosom *E. fibuligera* ITB. R. cc. 64 (Gambar 1c) dan letak hasil penggandaan DNA plasmid rekombinan *pSf GLUI* (Gambar 1d) sebagai kontrol positif

Karakterisasi Fragmen 1784 pb DNA lokus *GLUI* *E. fibuligera* ITB.R.cc.64



Gambar 2. Elektroforesis gel agarosa 2% hasil karakterisasi fragmen DNA 1784 pb hasil PCR oleh enzim restriksi a. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yang dipotong *Stu I*; b. Fragmen DNA 1784 pb *pSfGLU1* yang dipotong *Stu I*; c. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yg dipotong *Eco RV*; d. Fragmen DNA 1784 pb *pSfGLU1* yang dipotong *Eco RV*; e. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yang dipotong *Eco RI*; f. Fragmen DNA 1784 pb *pSfGLU1* yang dipotong *Eco RI*; g. DNA standar (f x174 RF DNA/*Hae III*) 1353 pb–72 pb; h. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yg dipotong *Bam HI*; i. Fragmen DNA 1784 pb *pSfGLU1* yang dipotong *Bam HI*; j. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yg dipotong *Sau 3A*; k. Fragmen DNA 1784 pb *pSfGLU1* yang dipotong *Sau 3A*; l. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 *uncut*; m. fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yg dipotong *Sau 3A*; Fragmen DNA 1784 pb *pSfGLU1* yang dipotong *Sau 3A*; o. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 *uncut*

menunjukkan posisi yang sama. Hasil penggandaan tersebut menunjukkan bahwa fragmen DNA 1784 pb merupakan fragmen DNA lokus *GLUI E. fibuligera* ITB. R. cc. 64 yang diduga mempunyai derajat homologi yang tinggi terhadap gen glukoamilase *GLUI* pada plasmid *pSfGLUI*. Hal ini juga membuktikan bahwa *primer* yang dirancang dengan benar dapat menempel pada DNA target pada posisi yang diharapkan, yaitu pada urutan nukleotida ke-144–163. Proses polimerisasi nukleotida berhenti pada urutan nukleotida ke-1906–1927, sehingga menghasilkan fragmen DNA produk *amplifikasi PCR* berukuran 1784 pb.

Karakterisasi Fragmen 1784 pb DNA lokus *GLUI E. fibuligera* ITB.R.cc.64

Untuk meyakinkan bahwa fragmen DNA 1784 pb yang diperoleh dari proses *PCR* adalah fragmen DNA pada lokus *GLUI*, maka dilakukan karakterisasi fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 dan *pSfGLUI* dengan enzim *Stu I*, *Eco RV*, *Eco RI*, *Bam HI* dan *Sau 3A*. Hasil pemotongan fragmen DNA 1784 pb dengan kelima enzim restriksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 2. Sedangkan sisi pengenalan enzim restriksi (*recognition site*) dan ukuran fragmen DNA hasil pemotongannya dapat dilihat pada Tabel 1. Ukuran fragmen DNANYa dihitung berdasarkan urutan nukleotida *pSfGLUI*.

Tabel 1. Hasil pemotongan fragmen DNA 1784 pb dengan enzim restriksi

Enzim restriksi	Substrat fragmen DNA 1784 pb	Posisi pemotongan	Ukuran fragmen (pb)
<i>Stu I</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64 <i>PsfGLUI</i>	AGG↓CCT	±1784
			±1784
<i>Eco RV</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64 <i>PsfGLUI</i>	GAT↓ATC	± 997
			± 787
			± 997 ; ± 787
<i>Eco RI</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64 <i>PsfGLUI</i>	G↓AATCC	± 1784
			± 1784
<i>Bam HI</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64 <i>PsfGLUI</i>	G↓GATCC	± 1000
			± 780
			± 1000 ; ± 780
<i>Sau 3A</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64 <i>PsfGluI</i>	GA↓TC	± 870, ± 750, ± 160
			± 870, ± 750, ± 160

Hasil pemotongan fragmen DNA 1784 pb produk *PCR* baik yang berasal dari *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 maupun *pSfGLUI* sebagai kontrol positif oleh kelima macam enzim restriksi di atas terlihat adanya pola beberapa fragmen hasil pemotongan yang sama. Hal ini menunjukkan kedua fragmen DNA 1784 pb tersebut mempunyai kesamaan pola potong oleh kelima enzim restriksi tersebut.

Fragmen DNA 1784 tidak dapat terpotong oleh enzim restriksi *Stu I* maupun *Eco RI* (Gambar 2a,b,e,f). Hal ini

dibuktikan oleh letak fragmen DNA tersebut yang sama dengan letak fragmen DNA 1784 pb yang tidak dipotong oleh enzim (Gambar 2.l), berarti pada kedua fragmen DNA 1784 tersebut tidak terdapat urutan nukleotida AGG↓CCT maupun G↓AATCC yang dikenal sebagai sisi potong enzim restriksi *Stu I* dan *Eco RI*. Pemotongan dengan enzim *Eco RV* menghasilkan 2 fragmen DNA dengan ukuran ± 997 pb dan ± 787 pb. Ukuran fragmen DNA ini sesuai dengan yang ada pada peta restriksi urutan nukleotida gen glukoamilase *GLUI Saccharomycopsis fibuligera* galur HUT7212, berarti pada urutan nukleotida fragmen DNA *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 terdapat urutan GAT↓ATC yang dikenal sebagai sisi potong enzim *Eco RV*. Pada urutan nukleotida *pSfGLUI*, urutan GAT↓ATC terletak pada posisi (607–612) yang berada di antara P1 (144 – 163) atau (–178 s/d –158) dan P2 (1906–1927) atau (+28 s/d +49). Jadi fragmen DNA 1784 dapat dipotong antara posisi 607–612 oleh enzim *Eco RV*

Pemotongan menggunakan enzim *Bam HI* menghasilkan 2 fragmen dengan ukuran ± 1000 pb dan ± 780 pb dengan sisi potong G⁻GATCC. Pada Gambar 3 sisi potong ini tidak ditemukan, seharusnya fragmen 1784 ini tidak terpotong oleh enzim *Bam HI*. Hal ini diduga karena ada perbedaan urutan nukleotida *GLUI S. fibuligera* HUT7212 dengan urutan nukleotida *GLUI E. fibuligera* ITB.R.cc.64.

Pemotongan dengan menggunakan enzim *Sau 3A* juga menghasilkan 2 fragmen DNA dengan ukuran ± 870 dan ± 750. Bila kedua fragmen tersebut dijumlahkan menjadi berukuran 1670 pb padahal fragmen yang dipotong berukuran 1784 kemungkinan yang dapat dikemukakan adalah fragmen yang berukuran kecil ± 160 pb tidak nampak karena sudah keluar gel. Pada Gambar 3 sisi potong enzim *Sau 3A* GA↓TC terletak pada posisi (700–704), dan (1317–1321) di antara P1-P2.

Adanya pola fragmen-yang sama hasil pemotongan dengan enzim *Eco RV*, *Bam HI* dan *Sau 3A* antara *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 dengan *pSfGLUI* menunjukkan bahwa minimal ada 20 urutan nukleotida kedua amplicon *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 dan *pSfGLUI* yang sama.

Dari uraian diatas dapat disimpulkan bahwa hasil pemotongan restriksi fragmen DNA 1784 pb lokus gen glukoamilase *Endomicopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 produk *PCR* adalah sebagai berikut: fragmen DNA 1784 pb tidak dapat dipotong oleh enzim *Stu I* dan *Eco RI*. Pemotongan dengan enzim *Eco RV* menghasilkan 2 fragmen DNA yang mempunyai ukuran ± 997 pb dan ± 787 pb, pemotongan dengan enzim *Bam HI* menghasilkan 2 fragmen DNA yang mempunyai ukuran ± 1000 pb dan ± 780 pb, dan pemotongan dengan enzim *Sau 3A* menghasilkan 2 fragmen

KEPUSTAKAAN

- Baktir A dan Soedigdo P, 1991. Biokonversi Pati Sago Menjadi Sirup Glukosa Menggunakan Amilase *Endomycopsis fibuligera* yang Diamobilisasi dalam Matrik Gel Poliakrilamid, *Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Industri*, PAU ITB, Bandung.
- Baktir A, Ni Nyoman TP, dan Sofijan Hadi, 1997. Pemisahan dan Karakterisasi Amilase dari *ndomEycopsis fibuligera*. *Seminar Nasional XIII Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia*, Fakultas Kedokteran Unair, Surabaya
- Fujii M dan Kamamura Y, 1985. dalam Fujii, M., Taira Homa dan Masayuki Taniguchi, 1988, Synergism of α -amilase and Glukoamilase on Hydrolysis of native Sarch Granuls, *Biotechnol. Bioeng.* 32:910–915.
- Futatsugi M, Ogawa T, dan Fukuda H, 1993. Purification and Properties of Two form of Glukoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera*, *J. of Fermentation and Bioengineering*, 70(6):521–523.
- Innis M dan Gelfand DH, 1990. Optimization of PCRs dalam Innis, MA, et al. (Ed) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York.
- Priest FG, 1984. *Extracellular Enzyme*, Van Norstrand Reinhold (UK) Co. Ltd. England.
- Puspaningsih NNT, Hadi S, Akhmaloka dan Manuhara S, 1996–1999. Pembentukan Sel Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) Galur Baru yang Mampu Mencerna Pati Secara Langsung Menjadi Etanol Melalui Kloning Gen Amilase, *Laporan Penelitian Hibah Bersaing V/I–V/3*, DIKTI, Jakarta.
- Shibuya L, Tanura G, Shima H, Ishikawa T, dan Hara S, 1992. Construction of an α -amylase/glukoamylase Fusion Gene and Its Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(6):884–889.
- Yamashita I, Itoh I, Fukui S, 1985. Cloning and expressin of *Saccharomycopsis fibuligera* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiol Biotechnology*, 23:130–133.