

ABSTRAK

Transformasi Plasmid Rekombinan Gen *endo-β-1,4-D-xilanase* pET30(+) dari Bakteri *E. coli* Strain TOP10 ke *E. coli* Strain BL21 dan Uji Aktivitas Enzim Yang Diproduksi

Agung Budi Santoso¹

Sumber Dana BOPTN Universitas Jember 2014

¹ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

Mikroorganisme *Bacillus sp* dalam perut rayap mampu mensekresi enzim xilanolitik. Salah satu komponen enzim tersebut yaitu *endo-β-1,4-D-xilanase* diketahui mengkatalisa hidrolisis ikatan glikosida pada xilan untuk menghasilkan xiloöligosakarida dan xilosa. Enzim ini telah digunakan pada industri pangan, pakan, *pulp* dan kertas. Permintaan enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* selalu meningkat dengan kualitas dan kemurnian yang tinggi yaitu bebas dari enzim selulosa. Untuk memenuhi permintaan tersebut dapat dilakukan dengan kloning gen enzim *endo-β-1,4-D-xilanase*. Rekombinan enzim *endo-β-1,4-D-xilanase* asal *Bacillus sp* sumber abdominal rayap telah berhasil diperoleh pada penelitian KBI Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember yang dipimpin Dr. AAI Ratnadewi. Rekombinan tersebut berupa plasmid PET30a yang mengandung gen target dan termuat dalam bakteri *E. coli* TOP10. Pada peta jalan riset tahap berikutnya adalah pemindahan plasmid dari bakteri *E. coli* varian TOP10 ke bakteri *E. coli* varian BL21. Pemindahan ini perlu dilakukan karena varian BL21 dapat mengekspresikan protein target dengan lebih baik disamping viabilitasnya lebih tinggi. Sementara varian TOP10 lebih ditujukan pada amplifikasi *in vivo* dari plasmid rekombinan. Mula-mula plasmid akan dikeluarkan dari *E. coli* TOP10 dengan lisis dan diisolasi dengan sentrifugasi bertingkat. Transformasi plasmid ke *E. coli* BL21 dilakukan dengan getaran ultrasonik pada sel-sel yang kompeten. Keberhasilan transformasi akan dipantau dengan uji viabilitas pada biakan padat menggunakan antibiotik yang gen resistensinya termuat pada plasmid rekombinan. Demikian juga dengan keberadaan sisipan gen akan dipantau dengan antibiotik yang bersesuaian. Pemantauan dilakukan pada biakan padat dalam cawan petri dengan variasi media pertumbuhan menggunakan antibiotik kanamycin. Setelah transformasi berhasil maka dilakukan pembiakan pada medium cair untuk memproduksi enzyme target. Kurva pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 perlu dipetakan untuk menentukan waktu panen yang tepat. Enzyme target yang dihasilkan perlu diuji dengan substrat xylan untuk melihat aktivitasnya.

Kata kunci : *endo-β-1,4-D-xilanase*, transformasi plasmid, *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21,

ABSTRACT

Transformation Recombinant Gene Plasmid *endo-β-1,4-D-xylanase* pET30(+) from *E. coli* TOP10 to *E. coli* BL21 and Enzyme activities analysis

Agung Budi Santoso

¹ Chemistry Dept, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Jember University

In this research we successfully transform Plasmid pET-Endo from *E.coli* TOP10 to *E.coli* BL21. Plasmid pET Endo is recombinant plasmid base on pET-30a(+) inserted with gene of *endo-1,4-β-xylanase* isolated from *Bacillus subtilis* sp which is originally living in termite abdomen. First step is isolation of plasmid pET-Endo from *E.coli* TOP10 with alkaline lyses. Denaturation and renaturation of DNA occurred then separated with centrifugation. Plasmid pET-Endo is smaller than Chromosome DNA. Agarose gel electrophoresis confirmed that Plasmid pET-Endo has isolated. Electrogram of pET-Endo show the band in 6022 bp compare to empty plasmid pET-30a(+) 5422 bp. *E.Coli* BL21 got pretreatment with CaCl_2 solution to make cell competent for transformation. Isolated pET-Endo inserted to *E.coli* BL21 with heat shock method. Resistance test with antibiotic has done to know the result of transformation. *E.coli* BL21 contained plasmid pET-Endo will survive in kanamycin agar media. Colony of *E.coli* BL21 then cultured in liquid media and examine its growth phase. IPTG as gene inducer given after 2,5 hour of inoculation. Crude enzyme tested for xylanase activity and well proved. Isolation of plasmid pET-Endo then running in Agarose gel electrophoresis also confirm good result of transformation.

Key words : *endo-β-1,4-D-xylanase*, transformation, *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21

RINGKASAN EKSEKUTIF

Transformasi Plasmid Rekombinan Gen *endo-β-1,4-D-xilanase* pET30(+) dari Bakteri *E. coli* Strain TOP10 ke *E. coli* Strain BL21 dan Uji Aktivitas Enzim Yang Diproduksi

Agung Budi Santoso¹

Sumber Dana BOPTN Universitas Jember 2014

¹ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

Deseminasi : ada, International Protein Seminar, CDAST Universitas Jember, 29 Okt 2014

Pendahuluan

Pada tahun 2012 KBI Biokimia Jurusan Kimia Universitas Jember dibawah pimpinan Dr. AAI Ratnadewi telah berhasil mengkloning dan mengamplifikasi gen penyandi *endo-β-1,4-xilanase* asal bakteri dalam abdominal rayap tanah. Amplikon disisipkan pada plasmid pET30a(+) dan ditransformasi ke *E. coli* TOP10. Sekuensing urutan basa nitrogen sudah dilakukan pada gen rekombinan tersebut. Gen rekombinan PET-*Endo* ini berukuran 642 pb dan memiliki homologi 99% dengan gen dari *Bacillus subtilis*. Penyusunan pohon filogenetik memasukkannya pada kelompok glikosida hidrolase famili 11.

Rekombinan pET30a(+)-*endo-β-1,4-xilanase* dalam *E. coli* TOP10 berfungsi untuk amplifikasi in vivo, perbanyak plasmid rekombinan. Tetapi untuk study pada tingkat protein atau produksi protein skala masif bakteri *E. coli* TOP10 bukanlah inang yang tepat. Hal ini karena pada *E. coli* TOP10 tidak memiliki T7 RNA polymerase. Sehingga untuk study lanjut dan persiapan ke arah produksi, plasmid rekombinan harus dipindahkan ke *E. coli* strain BL21. Jadi pada penelitian ini akan dilakukan pemindahan pET-30a(+) dari *E. coli* TOP10 ke *E. coli* BL21. Pemindahan tersebut diawali dengan lisis bakteri *E. coli* TOP10 dan isolasi plasmidnya. Plasmid yang diperoleh selanjutnya ditransformasikan ke *E. coli* BL21 yang sudah kompeten. Keberhasilan transformasi dipantau dengan biakan media padat mengandung antibiotik kanamycin. *E. coli* BL21 yang mengandung plasmid rekombinan akan dapat tumbuh pada media tersebut karena pada plasmidnya terdapat gen resisten anti kanamycin.

Selanjutnya dilakukan ekspresi gen *endo-β-1,4-xilanase* untuk menghasilkan produk enzimnya. Produksi enzim dilakukan dengan menumbuhkan *E. coli* BL21 Rekombinan pET-30a(+) pada media cair. Kurva pertumbuhan perlu ditentukan karena karakter strain BL21 berbeda dengan TOP10. Dari kurva pertumbuhan akan diperoleh informasi kapan pemanenan sebaiknya dilakukan. Setelah protein enzim diperoleh maka perlu dilakukan uji aktivitas. Aktivitas enzim sebanding dengan kuantitas atau jumlah enzim yang diproduksi.

Metodologi Penelitian

Tahapan Penelitian meliputi : Isolasi plasmid dari *Escherchia coli* TOP10, Analisis DNA Plamid pET30a(+) dengan Elektroforesis Gel Agarosa, Preparasi sel kompeten *E. coli* menggunakan CaCl_2 , Transformasi sel kompeten *Escherchia coli*, Produksi Endo- β -1,4-Xilanase, Analisis *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), Persiapan alat SDS-PAGE, Pembuatan Gel SDS-PAGE, Preparasi Sampel SDS-PAGE, Running SDS-PAGE, Staining dan Destaining SDS-PAGE, Penentuan Aktivitas Enzim dan Penentuan Kadar Enzim

Hasil dan Pembahasan

Isolasi pET-Endo dari *E. coli* TOP10 dilakukan dengan metode alkalin lisis (Sambrook *et al.*, 1989). Alkalin lisis merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi DNA plasmid yang terdapat dalam bakteri. Bakteri *E. coli* TOP10 dibiakkan dalam media LB yang sudah ditambahkan kanamisin, kemudian diinkubasi selama ± 18 jam pada 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Tahap isolasi plasmid dilakukan dengan tahap awal sentrifuse 5000 rpm, 4°C selama 15 menit. Sentrifuse ini bertujuan untuk memisahkan material selular (DNA) dengan cairan yang terdapat dalam sel dan juga media LB sehingga semua material penyusun sel berada dalam pelet. Pelet yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam larutan bufer fisiologis yang mengandung EDTA. Larutan ini terdiri dari glukosa, EDTA dan buffer Tris-Cl pH 8. Keberadaan EDTA dalam buffer fisiologis berperan sebagai agen pengkelat yang mampu mengikat ion logam Ca^{2+} dan Mg^{2+} . Kedua ion logam ini merupakan kofaktor dari DNase. DNase merupakan enzim yang mendegradasi DNA. Keberadaan enzim ini tidak diharapkan dan merugikan dalam tahap isolasi pET-Endo. Apabila kedua kofaktor berinteraksi dengan EDTA maka kerja DNase akan terganggu, sehingga kemungkinan kecil untuk terjadi degradasi DNA yang akan diisolasi.

Pelet yang telah larut dalam bufer fisiologis kemudian ditambahkan dengan larutan II yang mengandung NaOH 0,2 N dan SDS 1%. SDS berfungsi untuk merusak membran sel dengan cara menghancurkan atau melisis fosfolipid (lemak) dan protein yang terdapat dalam membran sel. Ketika lemak dan protein penyusun membran sel rusak maka penyusun sel akan keluar. Kegunaan NaOH pada tahap ini untuk membuat suasana basa yaitu pada pH 12,0 – 12,5. Perubahan pH yang terjadi akan menyebabkan terjadinya denaturasi pada DNA kromosom dan pET-Endo yang terdapat dalam *E. coli* TOP10. Pada pH 12,0 – 12,5 ikatan hidrogen pada DNA kromosom dan pET-Endo akan putus sehingga rantai *double-helix* DNA akan terurai sehingga terbentuk *single-helix*.

pET-Endo yang telah terdenaturasi harus direnaturasi karena merupakan produk yang akan diisolasi. Renaturasi ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan III yang terdiri atas kalium asetat, asam asetat glasial, dan ddH₂O. Pada saat penambahan larutan III, kondisi larutan yang awalnya basa kemudian berubah menjadi kondisi netral. Perbedaan DNA plasmid dan DNA kromosom adalah DNA plasmid memiliki struktur sirkular dan DNA kromosom strukturnya linear. Selain itu, DNA plasmid berukuran lebih kecil dibanding DNA kromosom. Dua perbedaan tersebut membuat DNA plasmid dan DNA kromosom dapat dipisahkan (Boyer, 1993). Proses renaturasi yang terjadi pada DNA kromosom terjadi secara acak dan tidak beraturan sedangkan renaturasi pET-Endo terjadi secara sempurna karena struktur pET-Endo yang berupa sirkular. DNA kromosom memiliki berat molekul yang lebih tinggi dibandingkan pET-Endo sehingga untuk memisahkan keduanya dapat dilakukan sentrifuse. Sentrifuse menghasilkan 2 fase yaitu supernatan dan pelet. pET-Endo yang lebih ringan dibanding DNA kromosom berada pada supernatan sedangkan DNA kromosom berada pada pelet.

Keberhasilan isolasi pET-Endo dapat diketahui dengan menggunakan elektroforesis gel. Elektroforesis gel merupakan suatu teknik pemisahan berdasarkan muatan dan ukuran molekul dengan menggunakan medan listrik (Holme dan Peck, 1998). Elektroforesis gel untuk DNA menggunakan agarosa dengan konsentrasi bergantung pada DNA yang akan dipisahkan. Pada elektroforesis terdapat arus listrik yang mengalir pada buffer TAE. Keberadaan gugus fosfat (PO₄⁻) pada DNA menyebabkan semua DNA bermuatan negatif sehingga DNA tersebut dapat bermigrasi dari katoda ke anoda. Kecepatan migrasi masing-masing DNA berbeda bergantung pada ukuran DNA. Apabila DNA berukuran besar maka migrasinya lambat begitu sebaliknya. Perbedaan kecepatan migrasi ini menyebabkan setiap DNA yang berbeda ukuran dapat dipisahkan. Teknik ini dapat digunakan untuk mengetahui ukuran DNA yang telah diisolasi.

Visualisasi DNA dapat dilakukan dengan merendam gel elektroforesis dalam buffer TAE yang mengandung etidium bromida. Keberadaan DNA dalam gel dapat diketahui melalui konsentrasi EtBr karena senyawa ini berikatan dengan DNA dan terjadi fluoresensi. Pembacaan pita DNA dalam gel dilakukan dengan menggunakan sinar ultraviolet (Boyer, 1993).

pET-Endo yang telah berhasil diisolasi kemudian diinsersikan ke dalam *E. coli* BL21. Metode transformasi yang digunakan adalah *heat shock*. Metode ini sederhana, hanya menggunakan kejutan panas yaitu perubahan suhu yang sangat signifikan. Bakteri yang akan

dijadikan sel inang pada proses transformasi, diberi perlakuan menggunakan CaCl_2 . Penambahan CaCl_2 ini bertujuan untuk melunakkan membrane sel bakteri sehingga mampu dilewati oleh plasmid. Bakteri yang telah mendapat perlakuan ini disebut dengan sel kompeten. Plasmid rekombinan (pET-Endo) dicampur dengan sel kompeten kemudian diinkubasi dalam es. Tujuannya agar plasmid menempel pada membran bakteri. Perlakuan panas dilakukan secara langsung setelah bakteri diinkubasi dalam es. Pada tahap ini diharapkan pori-pori membran bakteri terbuka dan plasmid masuk ke dalam sel bakteri.

Uji resistensi antibiotik merupakan salah satu cara yang digunakan untuk mengetahui berhasil tidaknya sebuah plasmid diinsersikan ke dalam sel inang. Ketika pET-Endo berada dalam *E. coli* BL21 maka bakteri tersebut akan mengalami transformasi yaitu perubahan resistensi terhadap antibiotik kanamisin. Hal ini dikarenakan pada pET-Endo terdapat gen yang resisten terhadap antibiotik kanamisin. *E. coli* BL21 yang awalnya tidak mampu bertahan hidup (tidak resisten) pada media yang mengandung antibiotik kanamisin, setelah diinsersi pET-Endo menjadi mampu bertahan hidup (resisten) pada media yang mengandung antibiotik kanamisin.

Sel inang yang ditanam pada media padat yang mengandung kanamisin tidak tumbuh dan hasil transformasi pET-Endo menunjukkan terdapat koloni *E. coli* BL21 yang tumbuh pada media padat yang mengandung kanamisin. Hal ini menunjukkan bahwa transformasi pET-Endo ke *E. coli* BL21 berhasil. Keberadaan bakteri yang tumbuh pada media padat yang tidak mengandung kanamisin menunjukkan bahwa pET-Endo tidak tertransformasi ke semua *E. coli* BL21.

Bakteri memerlukan nutrisi sebagai sumber karbon, sumber nitrogen dan mineral untuk kelangsungan hidupnya. Media pertumbuhan bakteri (media LB) terdiri atas NaCl, Triptopan, dan ekstrak yeast. Natrium klorida dibutuhkan oleh bakteri sebagai sumber mineral, triptopan menyediakan sumber nitrogen bagi bakteri dan ekstrak yeast sebagai sumber karbon. Pada media pertumbuhan telah ditambahkan triptopan sehingga operon *trp* tidak dapat melakukan ekspresi gen. Regulasi ekspresi gen endo- β -1,4-xilanase rekombinan menggunakan operon *lac*. *Inducer* yang digunakan adalah IPTG. Senyawa ini memiliki struktur hampir mirip dengan laktosa, sehingga keberadaan senyawa ini menginduksi operon *lac* untuk mengekspresikan gen yang terdapat dalam bakteri. Penambahan IPTG ini pada saat pertumbuhan bakteri memasuki fase log.

Pertumbuhan bakteri dapat diamati dengan cara mengukur OD atau kekeruhan media pertumbuhan yang telah ditambahkan dengan bakteri. Indikasi adanya pertumbuhan yaitu

kekeruhan yang semakin meningkat akibat semakin meningkatnya jumlah sel bakteri. Pertumbuhan bakteri mengacu pada penambahan sel-sel bakteri bukan pada perkembangan individu organisme bakteri. Pertumbuhan bakteri dapat diamati menggunakan kurva pertumbuhan bakteri. Beberapa fase pertumbuhan bakteri antara lain fase adaptasi, fase permulaan pembiakan, fase pembiakan cepat, fase pembiakan lambat, fase konstan, fase kematian dan fase kematian dipercepat.

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara membiakkan *E. coli* BL21 yang telah mengandung pET-Endo. Setiap jam pertumbuhan bakteri tersebut diamati dengan cara mengukur OD pada panjang gelombang 600 nm. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fase adaptasi bakteri berlangsung pada 1 jam pertama setelah inkubasi dan fase permulaan pembiakan bakteri berlangsung pada 2 jam setelah inkubasi. Fase pembiakan cepat berlangsung pada 3 jam setelah inkubasi yaitu dengan peningkatan OD secara signifikan yang awalnya 0,264 menjadi 0,770. Pada fase pertumbuhan cepat inilah waktu yang tepat untuk menambahkan *inducer* sehingga enzim target diekspresikan dengan cepat dan banyak. Selanjutnya fase pembiakan lambat berlangsung pada jam ke 4 sampai 12, hingga akhirnya masuk fase konstan pada jam ke 13.

Endo- β -1,4-xilanase rekombinan merupakan enzim intraseluler sehingga untuk memperoleh enzim ini perlu dilakukan pemecahan membran sel. Pemecahan membran sel dapat dilakukan secara mekanis menggunakan gelombang bunyi yaitu dengan sonikator. Pelet yang diperoleh dari sentrifuse bakteri dilarutkan dalam bufer kemudian disonikasi. Sonikasi dilakukan selama 30 detik *on* dan 30 detik *off* dengan frekuensi 30 Hz. Sampel yang disonikasi harus berada dalam es. Inkubasi dalam es dan sistem *on off* bertujuan untuk mencegah enzim agar tidak terdenaturasi. Sampel yang telah disonikasi kemudian disentrifuse guna memisahkan pecahan sel dengan *crude enzyme*. *Crude enzyme* berada supernatan.

Crude enzyme kemudian diuji aktivitas enzim dan kadar protein. Pengujian aktivitas enzim menggunakan reagen miller yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Enzim ditambahkan dengan substrat xilan kemudian diinkubasi 1 jam pada suhu 40°C. Inkubasi ini bertujuan untuk memaksimalkan proses hidrolisis xilan oleh endo- β -1,4-xilanase dan suhu tersebut merupakan suhu optimum dari endo- β -1,4-xilanase. Penambahan DNS bertujuan untuk mengetahui atau mengukur kadar xilosa yang dihasilkan. Keberadaan xilosa dapat dideteksi dengan banyaknya ANS yang dihasilkan dari reaksi xilosa dengan DNS. Perubahan warna dari kuning menjadi coklat mengindikasikan adanya xilosa atau aktivitas

enzim endo- β -1,4-xilanase. Pengukuran kadar protein, aktivitas enzim dan aktivitas spesifik crude enzyme memberikan hasil berturut-turut 0,178 U/ml, 0,421 mg/ml dan 0,423 U/mg.

Analisa berat molekul protein menggunakan metode elektroforesis. Perbedaan elektroforesis yang digunakan untuk analisa DNA dengan protein terletak pada jenis gel yang digunakan. Hal ini disebabkan oleh perbedaan ukuran antara DNA dan protein sehingga pori gel yang digunakan untuk elektroforesis juga berbeda. Gel yang digunakan pada elektroforesis protein adalah poliakrilamida. Metode analisa berat molekul protein dikenal dengan SDS-PAGE. Prinsip dasar teknik ini adalah memisahkan molekul – molekul protein berdasarkan ukuran protein. Elektroforesis ini menggunakan 2 lapisan gel dimana kedua gel tersebut menggunakan bufer dengan pH berbeda. Pada gel atas menggunakan bufer pH 6.8 dan gel bawah menggunakan bufer pH 8,8. Gel atas berfungsi untuk menyamakan awal migrasi sampel. Gel bawah sebagai matrik pemisahan protein berdasarkan ukurannya.

Sampel protein yang telah ditambahkan bufer kemudian dipanaskan pada 100°C selama 5 menit. Tujuan pemanasan adalah mendenaturasi protein, dikhawatirkan masih terdapat protein yang belum terdenaturasi. Jadi pemanasan ini bertujuan untuk memastikan semua protein telah terdenaturasi sebelum dimasukkan dalam sumur (*well*) gel SDS-PAGE.

Ketika elektroforesis dilakukan protein yang telah bermuatan negatif dan linear akan bergerak menuju kutub positif (anode) yaitu pada bagian bawah kompartemen. Kecepatan migrasi protein dipengaruhi oleh ukuran molekul protein. Semakin besar ukuran protein maka semakin lambat kecepatan migrasinya, sebaliknya semakin kecil ukuran protein maka semakin cepat migrasi protein tersebut. Protein yang memiliki ukuran lebih besar dibanding pori gel poliakrilamida tidak akan bergerak menuju kutub positif. Selain ukuran protein, bentuk dari protein juga berpengaruh terhadap kecepatan migrasinya menuju ke kutub positif. Apabila bentuk protein lebar maka migrasi protein tersebut akan lambat dan sebaliknya (Sudarmadji, 1996).

Elektroforesis dihentikan ketika pewarna pada bufer sampel telah mencapai ujung gel akrilamida. Kemudian dilakukan perendaman dalam larutan staining. Larutan ini mengandung CBB. Setelah itu dilakukan proses destaining yaitu untuk melepas CBB yang tidak mengikat protein sehingga pita-pita protein terlihat jelas.

Elektroforegram yang dihasilkan menunjukkan bahwa protein endo- β -1,4-xilanase berukuran 50 kDa. Pada elektroforegram juga terlihat pita dari protein endo- β -1,4-xilanase paling tebal dibandingkan dengan pita protein ini. Hal ini menunjukkan ekspresi endo- β -1,4-xilanase berhasil dan menghasilkan enzim ini dalam jumlah besar.

KESIMPULAN

Plasmid pET30a(+) berhasil diisolasi dari *E. coli* TOP10 dan dipindahkan ke *E. coli* BL21. Transformasi dilakukan setelah penyiapan sel kompeten dari *E. coli* BL21 menggunakan heat shock treatment. Keberhasilan transformasi dibuktikan dengan uji penumbuhan pada media mengandung antibiotik kanamisin. *E. coli* BL21 yang mengandung plasmid pET30a(+) berhasil ditumbuhkan pada media cair dan memiliki pertumbuhan secara longitudinal dengan fase log akhir sekitar 13 jam. Pada fase log akhir dilakukan penambahan IPTG sebagai inducer produksi enzyme dan dihasilkan *endo*- β -1,4-xilanase. Uji aktivitas enzyme dilakukan dengan substrat oat spelt xylan dan reagen miller yang mendeteksi adanya produk xylosa. Pengukuran kadar protein, aktivitas enzim dan aktivitas spesifik pada crude enzyme memberikan hasil berturut-turut 0,178 U/ml, 0,421 mg/ml dan 0,423 U/mg. Konfirmasi ukuran enzyme juga dilakukan dengan elektroforesis SDS page.

DAFTAR PUSTAKA

- Ratnadewi, A. A. I., dan Handayani, W. 2006. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xiloöligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker. **Laporan Penelitian Tahun I Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi**. Jember : Universitas Jember. (Tidak Dipublikasikan)
- Ratnadewi, A. A. I., dan Handayani, W. 2007. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik Asal Mikrob dalam Sistem Intestinal Rayap untuk Memproduksi Xiloöligosakarida sebagai Pereduksi Resiko Kanker. **Laporan Penelitian Tahun II Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi**. Jember : Universitas Jember. (Tidak Dipublikasikan)
- Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., Santoso, A. B., dan Idrial. 2007. Produksi dan Karakterisasi *beta*-Endoxilanase Rayap dan Kajian Aplikasinya sebagai Improver Roti. **Laporan Penelitian Program Insentif Riset Dasar**. Jember : Lembaga Penelitian Universitas Jember. (Tidak Dipublikasikan)
- Ratnadewi, A. A. I., dan Naqib, M. 2007. Optimasi Kondisi Produksi Xiloöligosakarida dari *Oat-Spelt Xylan* dan Pengembangan Sistem Deteksi secara Kromatografi. **Laporan Penelitian Beasiswa Unggulan**. Jember : Universitas Jember. (Tidak Dipublikasikan)
- Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. **Buletin AgroBio** 5 : 29-36.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. Review Paper. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 30 : 279 -291.
- Viikari, L, Ranva, M, Kantelinen, A, Sandquist, J, and Linko, M. 1986. Bleaching with enzymes. **Third International Conference in Biotechnology in Pulp and Paper Industry, Stockholm, 16–19 June, pp. 67–69.**
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms : Functions and Applications. **Microbiological Reviews** 52 : 305-317.

EXECUTIVE SUMMARY

Introduction

Endo- β -1,4-xylanase is hydrolytic enzyme which break down β -1,4 glycosidic linkage on xylan chain to produce various xylooligosaccharide. This enzyme used in food, pulp and feed industry also bioremediacy and bioconversion. Xylose and xylooligosaccharide are low calorie sweetener for candy, gum, ice cream and tooth paste. The enzyme also use to clearance fruit juice, coffe extraction and bakery (Wong & Sadler, 1993). *Endo*- β -1,4-xylanase could be found in termite abdominal produce by bacillus which living there. Isolation of this Bacillus from soil termite had been done by Ratnadewi at 2006. Termite consume and digest the woods with xylanolitics enzymes produce by bacterial in his stomach. Woods contain hemycellulose (20-40%), lignin (18-25%) and cellulose (40-55%). Hemycellulose compose by xilan, mannan, galactan and glucan.

Endo- β -1,4-*D*-xylanase is pentosanase with code number EC 3.2.1.8 in IUBMB. *Endo*-1,4- β -*D*-xylanase also named as xylanase, *endo*xylanase, 1,4- β -*D*-xylan-xylanohidrolase, β -1,4-xylanase dan β -xylanase (Collins *et al.*, 2005). Cloning and characterization of *endo*- β -1,4-*D*-xylanase from microorganism as bacteria, yeast and mould has been done (Camona,1998,Polizeli,2005,Lu,2008 and Chen,2009). xylobiosa produced from hydrolysis Xylan with these enzyme known as effective stimulator for Bifidobacterium in human intestine (Achaury,2009)

Endo- β -1,4-xylanase from *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, dan *Aspergillus oryzae* have molecular weight 13-14 kDa, 22-34 kDa dan 19 kDa. While these Enzymes produce by *Bacillus sp.* 16-43 kDa, *Aeromonas sp.* 22-58 kDa dan *Thermatoga sp.* 40-120 kDa (Sunna dan Antraniklan, 1997). Xyloöligosakarides are prebiotic oligosaccharide of xylan (Nakakuki, 2002). Its oligomer of xylosa sugar. Xyloöligosakarides enhance the growth of *Bifidobacterium* spp which is suppressing activity of pathogen bacterial in intestine. Its also inhibit *enteroputrefactive* connecting to production of short chain fatty acid.

Biochemistry labororium of Chemistry Department Jember University successfully isolated and identified *endo*- β -1,4-*D*-xylanase from soil termite abdominal. Compare to β -xylosidase, α -arabinofuranosidase, α -glukuronidase, and asetil xylan esterase; *endo*- β -1,4-*D*-xylanase has highest activity. The enzyme then Purify through ammonium sulfate fractionation, dialyses, chromatography hidrophobic, dan ion exchange chromatography. Its got specific activities 6,93 U.mg⁻¹ in hidrophobic chromatography, 1,57 U.mg⁻¹ in ion exchange chromatography. Optimum condition of Enzyme is 40°C and pH 5,0; thermal

stability is 4 hours at 40°C and pH between 5,0-8,0. Molecular weight is 45.000 - 66.200 Dalton base on SDS-PAGE zimogram (SDS-Xylan-PAGE) data.

Biochemistry Laboratorium of Chemistry Department, Jember University successfully clone the gene of *Endo*- β -1,4-xylanase originally from bacterial of termite abdominal (Ratnadewi, 2007). Amplicon has inserted to pET30a(+) plasmide then transforming to *E. coli* TOP10. Sequencing of nitrogen base has been done which has 642 bp and 99% homology with *Bacillus subtilis* gene. Phylongenetic tree grouping this enzyme to glycoside hydrolase family 11. Cloning and expression of *endo*- β -1,4-*D*-xylanase from *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., and *Acidobacterium capsulatum* (Inagaki *et al.*, 1998) to *Escherichia coli* had been done. Honda *et al.* (1985a, 1985b, 1985c dan 1986 a, 1986b) writing about production, purification, parsial characterisation, molecular cloning, sequensing, and gene expression of *endo*- β -1,4-*D*-xylanase from alcalophylic *Bacillus* sp. Strain C-125 to *Escherichia coli* with plasmide pCX311.

pET30a(+)-*endo*- β -1,4-xylanase recombinant in *E. coli* TOP10 only for multiply the gene on plasmide in vivo. *E. coli* TOP10 is not sufficient for protein expression of the cloning gene because its lack of T7 RNA polymerase. For protein production *E. Coli* BL21 is preferable, recombinant plasmide must be transferred to this bacteria. In this research we transferred recombinant plasmide pET-30a(+) from *E. coli* TOP10 to *E. coli* BL21. Its begin with isolation of the plasmide from *E. coli* TOP10 then transform to competent cell of *E. coli* BL21. Transformation process will be confirmed with planting of bacteria in kanamycin antibiotic medium. *E. coli* BL21 which contain of recombinant plasmide will be growth in this media since it has gene of anti kanamycin resistance in the plasmide.

E. coli BL21 pET30a(+)-*endo*- β -1,4-xylanase recombinant will be growth in liquid LB medium at room temperature. Growth curve will be studied by optical density observation every hour in accordance to get the point of inducer addition. Maximum production of targete Enzyme will be achieve when the population of bacteria is maximum in the end of log phase. After inducer addition, enzymes will be produced and harvested. Confirmation of the enzyme *endo*- β -1,4-xylanase done by activity test, SDS polyacrilamide gel electrophoresis and zimogram.

Research Methods

Research conducted at Biochemistry Laboratorium of Chemistry Dept. Faculty of Natural Sciences and at CDAST Lab of Jember University from 2014 June. Research

beginning with growing up pET30a(+)-*endo*- β -1,4-xylanase recombinant *E. coli* TOP10 from glycerol stock to liquid LB medium. Transformant *E. coli* inoculated to 5 ml liquid LB medium contain 2,5 μ L kanamycin and incubate at shaker incubator at 37 °C, 150 rpm for 16 hours. 5 ml cell suspension centrifuged for 2 minute, 10.000 rpm at 4 °C, pellet suspended with solution I (25 μ L Glukosa 50 mM, 25 μ L Tris-HCl 2,5 mM pH 8, 50 μ L Na₂EDTA 10 mM pH 8) 100 μ L, homogenized and let it stay for 5 minute. Then added 200 μ L solution II (NaOH 20 μ L, SDS 1% 100 μ L, ddH₂O sterile 80 μ L) and homogenized. Mixing incubate in ice for 15 minute then added 150 μ L solution III (50 μ L Kalium asetat 5 M, 50 μ L asam asetat glasial, 50 μ L cold ddH₂O), incubate in ice for 10 minute. Mixing then centrifuged for 5 minute at 12.000 rpm, 4 °C, supernatant move carefully by pipet to new Eppendorf tube then added fenol: kloroform: isoamil alkohol (25: 24 : 1) 1 time of total volume, Shake till emulsion formed the centrifuged 12.000 rpm 2 minute to get 3 layer. The top phase move to other new eppendorf then concentrated with cold absolute ethanol 2 time total volume, then incubate in ice for 1 hour. Centrifuged 12.000 rpm 5 minute, pellet washing with cold 70% and centrifuged again. Eppendorf tube dried from ethanol with turn back the tube and let it for 5 minute. Pellet then resolving in 30 μ L ddH₂O.

Competence cell made by CaCl₂ 0,1 M. *E. coli* BL21 inoculated in 4 ml LB medium for 18 hours. 40 μ L (1%) *E. coli* BL21 transferred to 50 mL LB medium, incubate at shaker incubator 37°C, 150 rpm for 2-2,5 hours or till OD_{600 nm} =0,4. Then bacterial culture dipped in ice for 10 minute. 2 ml of cold bacterial culture put into eppendorf tube and centrifuged at 12000 rpm 4°C for 1 minute. Pellet suspended at 1 ml CaCl₂ 0,1 M 4°C and homogenized then put in ice for 30 minute. The tube centrifuged at 12000 rpm 4°C for 2 menit. Pellet suspended in 100 μ L CaCl₂ 0,1M and glycerol 14,5% then vortex. Cell competent may use directly or keep at -80°C.

5 μ L *endo*- β -1,4-xylanase plasmid from former isolation put in to Competent cell of *E. coli* BL21 then homogenized and let in ice for 30-60 minute. Directly heat shock done for 30 second in water bath 42°C then immerse in ice for 10 minute. Fresh LB medium 250 μ L put in to eppendorf tube then incubate for 60-90 minute at 37°C. 50 μ L *E. coli* which had transformed plating in agar medium contain kanamycin 50 mM. incubate for \pm 18 hour at 37°C (Campos, 2011 dan Singh, 2010).

Colony of *E. coli* BL21 take with ose spoon then planting to liquid LB medium 10 ml containing kanamycin 50 μ g/ml and incubated at 37°C 150 rpm for \pm 16–18 hour. 1% of culture put into 250 ml production medium which also contain kanamycin 50 μ g/ml and

incubated at 37 °C 150 rpm for ± 2.5 hour , observed OD₆₀₀, till get absorbantion 0,6 added 250 µL 0,4 M IPTG (*isopropil-thio-β-D-galaktopiranosida*)/100 ml media then incubate again till ±16–18 hour . Centrifuged at 10.000 rpm 4°C for 10 menit. Pellet dissolved in lysis buffer pH 8 (imidazol 10 mM, asam fosfat 20 mM, NaCl 300 mM) 20 ml, then sonicated at 20 Hz till solution clear. Centrifuged again at 10.000 rpm 4°C for 10 menit. Protein will be analyse by SDS PAGE, measure the activities and purified.

Result and Discussion

Isolation of pET-Endo from *E. coli* TOP10 had been done with alkaline lysis method. Plasmid isolation beginning with centrifugation of the culture at 5000 rpm, 4°C for 15 minute. Pellet cell redissolve in physiologic bufer containing glucose, EDTA and Tris-Cl pH 8. EDTA is chelating agent which bind Ca²⁺ dan Mg²⁺ Ions. These two ions are co-factor of DNase. This binding will inactivate DNase and prevent destruction of the plasmid targete.

Solution II added to the mixture. This solution contain NaOH 0,2 N dan SDS 1%. SDS is detergent which disturb phospholipide and destruct the cell membrane. As the cell membrane destructed the cell contain will be flow out. NaOH made condition alkaline at pH 12,0 – 12,5 and denatured DNA. Chromosomal and plasmid DNA will be denatured to form *single-helix*.

Solution III will be renatured plasmid DNA but not Chromosomal. This solution which contain Kalium acetate, glacial asetic acid and ddH₂O made pH around neutral. Plasmid DNA is small and circular, easy to renatured, but not Chromosomal DNA. With centrifugation these two DNA could be separated. Isolation of these plasmid could be confirmed with agarose gel electrophoresis. Size of pET-Endo is 6022 bp and pET-30a(+) is 5422 bp.

pET-Endo plasmid then inserted to *E. coli* BL21 through heat shock transformation. *E. coli* BL21 must be treated first with CaCl₂ solution to softening its membrane. pET-Endo plasmid then mixing with these cell under ice, in cold condition the plasmid will be stack in cell membrane. When the heat immediately given the pores of membrane will be open and plasmid enter to the cell.

Antibiotic resistance test is the methods to know weather plasmid succesfully inserted to the cell. After pET-Endo plasmid inserted to *E. coli* BL21, the bactery will transformed to be resistance to kanamycin antibiotic. Its cause in pET-Endo plasmid there are gene for this resistance.

After transformation, *E. coli* BL21 which contain pET-30a(+) able to growth in kanamycin medium. Its prove that transformation is succesfull, plasmid pET30a(+)-*endo*- β -1,4-xylanase inserted well to *E. coli* BL21.

Expression of *endo*- β -1,4-xylanase gene in plasmid pET-30a(+) regulated by operon *lac. Inducer* . IPTG is the chemical compounds which has similar structure with lactose, so its has activity as *lac. Inducer*. IPTG added to the culture of bacteria at the end of log phase when the population of culture almost maximum. Growth of bacteria observed by optical density through UV-Vis spectrophotometer. Optical density will be raise during the growth of bacteria since its more cloudy with population growth of bacteria. The growth will be stop after several hours at lag phase. For these *E. coli* BL21 pET-30a(+), observation show that adaptation phase around first one hour, then beginning of growth at second hour after inoculation, fast growth at third hour with OD from 0,264 to 0,770. This is log phase when IPTG as inducer added. Then the culture come to slow growth from fourth to twelfth hour. Finally constant phase or lag phase at thirteenth hour.

Endo- β -1,4-xylanase recombinant is intracellular enzyme since its new host *E. coli* can not pass this enzyme outside through its cell membrane. Harvesting this enzyme must be start with breaking the cell with sonicator for 30 second on and 30 second off at 30 Hz. Centrifugation will separate enzyme in supernatant and debris of cell in pellet. Activity test of the enzyme done by reagen Miller and measure the absorbation of xylose product by spectrophotometer at 550 nm. After measurement of protein content in crude enzyme by kjehdahl, we got the protein content, activity and specific ativity of enzyme are 0,178 U/ml, 0,421 mg/ml dan 0,423 U/mg.

Crude enzyme also analyze by SDS PAGE which show the band at 50 kDa predicted as *endo*- β -1,4-xylanase at 50 kDa. This bold band indicated the protein produced in big amount as it was overexpressed by gene cloning.

Conclusion

Plasmide pET30a(+) *endo*- β -1,4-xylanase successfully transmited from *E. coli* TOP10 to *E. coli* BL21. Growth test in kanamycin medium of *E. coli* BL21 confirmed that Plasmide pET30a(+) inserted well to the bacteria. *E. Coli* BL21 pET30a(+)*endo*- β -1,4-xylanase growing well in liquid LB medium and growth curve define well with log phase at 13 hours after inoculation. Addition of IPTG inducer produce the enzyme *endo*- β -1,4-xylanase which confirm by activity test and SDS PAGE. Measurement of protein content in crude enzyme by Kjehdahl methods, show the protein content, activity and specific ativity of enzyme are 0,178

U/ml, 0,421 mg/ml dan 0,423 U/mg respectively. Analyzing by SDS PAGE show the bold band at 50 kDa predicted as endo- β -1,4-xylanase. This bold band indicated the protein produced in big amount as it was overexpressed by gene cloning

Bibliography

- Ratnadewi, A. A. I., dan Naqib, M. 2007. Optimasi Kondisi Produksi Xiloöligosakarida dari *Oat-Spelt Xylan* dan Pengembangan Sistem Deteksi secara Kromatografi. **Laporan Penelitian Beasiswa Unggulan**. Jember : Universitas Jember. (Tidak Dipublikasikan)
- Richana, N. 2002. Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. **Buletin AgroBio 5 : 29-36**.
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms : Functions and Applications. **Microbiological Reviews 52 : 305-317**.

ABSTRAK DAN RINGKASAN EKSEKUTIF
PENELITIAN DOSEN PEMULA



**Transformasi Plasmid Rekombinan Gen *endo-β-1,4-D-xilanase*
pET30(+)** dari Bakteri *E. coli* Strain TOP10 ke *E. coli* Strain
BL21 dan Uji Aktivitas Enzim Yang Diproduksi

Tahun pertama dari rencana satu tahun

AGUNG BUDI SANTOSO, S.Si., M.Si.
0030047104

UNIVERSITAS JEMBER
2014