

Kloning gen penyandi β -1,6-glukanase kapang secara cepat dengan teknik RT-PCR menggunakan primer spesifik

Rapid cloning for gene encoding fungal β -1,6-glucanase by means of RT-PCR using specific primers

Asmini BUDIANI, Riza A. PUTRANTO, Hayati MINARSIH,
Niyah FITRANTI & Djoko SANTOSO*)

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151

Summary

*Production of bioethanol from biomass of agricultural waste has been hindered with a high production cost because enzymes needed for the process has to be imported with relatively a high price. Genetic engineering using its encoding genes is able to produce those enzymes with lower cost. In this report we described a research aimed to clone gene encoding β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* with a relatively rapid and inexpensive method, by means of RT-PCR using gene specific primers. The primers were designed based on the DNA sequence of the target gene from the same species of organism used in this research. RT-PCR using that primers resulted in DNA fragment with sizes corresponding to the predicted size of full length gene encoding β -1,6-glucanase, about 1300 bp. After a sequential experiments of cloning using pGEM-T Easy vector, DNA sequencing and BlastN - BlastX analyses of the sequences, it was proven that the isolated DNA was full length gene of β -1,6-glucanase. This was implied from the percentage of Identity and E-value which were 96% and 0.0 (< e-04) respectively.*

Ringkasan

Produksi bioetanol dari biomassa limbah pertanian, terkendala oleh tingginya biaya produksi karena enzim yang diperlukan untuk proses tersebut masih harus diimpor dengan

harga yang relatif mahal. Melalui rekayasa genetika menggunakan gen-gen penyandinya, enzim-enzim tersebut dapat diproduksi dengan biaya yang lebih murah. Penelitian ini bertujuan untuk mengklon gen penyandi β -1,6-glukanase dari *Trichoderma harzianum* secara cepat dan ekonomis, dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik. Primer tersebut dirancang berdasarkan sekuen DNA dari gen target asal spesies organisme yang sama dengan yang digunakan dalam penelitian. RT-PCR dengan primer tersebut menghasilkan fragmen DNA yang ukurannya sesuai dengan gen lengkap penyandi β -1,6-glukanase, yaitu sekitar 1300 bp. Setelah secara berurutan diklon menggunakan vektor pGEM-T Easy, sekuensing urutan DNA dan analisis BlastN maupun BlastX dari sekuen yang diperoleh, terbukti bahwa fragmen DNA tersebut adalah gen lengkap penyandi β -1,6-glukanase. Hal ini ditunjukkan oleh Nilai Kesamaan (*Identity*) dan *E-Value* yang masing-masing mencapai 96% dan 0.0.

[Key words : *Trichoderma harzianum*, β -1,6-glukanase, bioethanol, RT-PCR, enzyme]

Pendahuluan

Potensi bioteknologi molekuler dalam mendukung industri pangan maupun energi sangat besar. Melalui rekayasa genetika organisme dengan kemampuan

*) Penulis korespondensi

baru yang unggul dapat dikembangkan dengan tingkat presisi yang tinggi dalam waktu yang relatif lebih singkat daripada melalui pendekatan konvensional. Lebih dari itu, sifat genetik organisme yang dengan cara konvensional tidak dapat diciptakan, melalui rekayasa genetika yang telah berkembang dengan pesat, hal tersebut menjadi mungkin. Meskipun, riset dan pengembangan bidang teknologi tersebut memerlukan investasi yang sangat besar, namun sebagai salah satu bidang iptek yang paling aktif dikembangkan, banyak penelitian telah dilakukan di berbagai negara, sehingga kemajuan iptek dasar bidang ini tergolong sangat pesat. Teknik-teknik molekuler dan database genetika pendukung bidang ini yang telah menjadi *public domain* semakin banyak dan lengkap. Dengan demikian, keterbatasan sumberdaya riset dan pengembangan bidang ini di negara berkembang dapat dikompensasi oleh ketersediaannya pada domain tersebut.

Dalam bidang energi yang ramah lingkungan, pengembangan biofuels generasi kedua (G2) dari biomassa limbah pertanian telah banyak dilaporkan (Gong *et al.*, 1999; Maas *et al.*, 2008), dan diyakini dapat meminimalkan konflik dengan program ketahanan pangan. Berbagai penelitian rekayasa genetika yang terkait dengan bioenergi dari limbah pertanian tersebut juga telah banyak dilaporkan (Howard & White, 1988; Irwin *et al.*, 2003; Dmytruk *et al.*, 2007). Namun teknologi pembuatan etanol G2 atau etanol selulosik semacam ini belum ekonomis karena enzim yang diperlukan dan merupakan input penting, harus diimpor dengan harga yang tergolong mahal. Akibatnya biaya keseluruhan untuk

produksi etanol G2 masih jauh lebih mahal daripada biaya produksi etanol generasi pertama (G1) yang bahan bakunya sama dengan bahan pangan. Hal tersebut memacu perkembangan rekayasa genetika, baik untuk memproduksi enzim maupun untuk menghasilkan mikroba unggul, seperti *Saccharomyces cerevisiae*, yang berkemampuan lebih terutama dalam hal enzimatisnya maupun toleransinya terhadap etanol (Alper *et al.*, 2006; Carle-Urioste *et al.*, 1996; Nevoigt, 2008; Stephanopoulos, 2007).

Lignoselulosa merupakan komponen utama tanaman berkayu maupun tanaman non kayu, dan terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Pada umumnya kandungan selulosa dalam biomassa lignoselulosa pertanian berkisar antara 40 – 50% (Howard *et al.*, 2003) yang merupakan bahan baku potensial untuk produksi etanol. Konversi biomassa lignoselulosa menjadi etanol memerlukan beberapa tahapan, salah satunya adalah hidrolisis selulosa menjadi glukosa yang dapat dilakukan secara kimiawi menggunakan asam atau secara biokimiawi menggunakan enzim selulase. Selulase merupakan kompleks enzim yang berdasarkan aktivitasnya dapat dikelompokkan menjadi tiga, yaitu endoglukanase, selobiohidrolase atau eksoglukanase, dan β -glukosidase. Beberapa mikroorganisme dilaporkan dapat menghasilkan kompleks selulase yang berbeda. Pada bakteri misalnya, enzim ini terdapat dalam kompleks multi enzim yang disebut selulosom dan terdiri dari beberapa subunit. Sedangkan selulase dari *Trichoderma reesei* mengandung dua eksoglukanase, paling sedikit empat endoglukanase dan satu β -glukosidase (Kumar *et al.*, 2008).

Kloning gen penyandi β -1,6-glukanase kapang secara cepat

Enzim β -1,6-glukanase merupakan salah satu endoglukanase, yang menghidrolisis ikatan 1,4-glukosida secara acak pada beberapa situs di bagian tengah dari rantai selulosa, sehingga membuka situs baru untuk hidrolisis berikutnya oleh eksoglukanase. Eksoglukanase merupakan komponen utama (40-70%) selulosa fungi. Enzim ini memindahkan mono- dan dimer dari bagian tepi rantai glukosa. Sedangkan β -glukosidase menghidrolisis dimer glukosa menjadi glukosa. Proses hidrolisis biomassa lignoselulosa untuk produksi etanol diyakini dapat berjalan lebih efisien apabila digunakan campuran enzim-enzim tersebut. Dalam rangka produksi enzim-enzim yang diperlukan dalam hidrolisis biomassa untuk mendukung pengembangan etanol selulosik, penelitian ini bertujuan untuk mengklon gen penyandi β -1,6-glukanase secara cepat dan efisien.

Bahan dan Metode

Sebagai sumber gen digunakan *Trichoderma harzianum* isolat DT38 koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor. Sedangkan untuk inang (*host*) dalam kloning produk RT-PCR digunakan *Escherichia coli* galur DH5 α . Untuk mencapai tujuan dari kegiatan ini beberapa tahapan dilakukan yaitu (1) Isolasi RNA total dari kapang *T. harzianum*, (2) Perancangan primer spesifik, (3) Amplifikasi fragmen DNA penyandi β -1,6-glukanase menggunakan RT-PCR, dan (4) Kloning *full-length* gen penyandi β -1,6-glukanase produk RT-PCR dilanjutkan sekuensing dan analisis sekuen DNA.

Isolasi RNA dari miselium kapang

RNA total diisolasi dari miselium kapang menggunakan metode Chang *et al.* (1993) yang dimodifikasi. *T. Harzianum* yang disimpan pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) diremajakan kembali pada medium yang sama selama tiga hari, kemudian disubkultur ke dalam medium PDB (*Potato Dextrose Broth*) selama empat hari pada suhu kamar. Sebanyak 2,5 gram serbuk miselium yang diperoleh kemudian digerus dalam keadaan beku menggunakan nitrogen cair, dan ditambahkan ke dalam 10 mL bufer ekstraksi (Trizma Base 0,2 M, LiCl 0,3 M, EDTA 0,01 M, PVP MW 36,000 1%, Thiourea 5 mM, Aurintrikarboksilat 1 mM, dan 2-Merkaptoetanol 2%). Campuran dikocok kuat kemudian ditambahkan 1 volume fenol : kloroform : isoamilalkohol (25 : 24 : 1), divorteks 3x30 detik, dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 15.000 rpm dan suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan diekstraksi sekali lagi menggunakan campuran kloroform : isoamilalkohol (24:1) sebanyak 1 volume dilanjutkan sentrifugasi pada 15.000 rpm dan suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung sentrifus baru, kemudian ditambahkan 1/30 volume Na asetat 3,3 M pH 5,2 dan 1/10 volume etanol absolut. Setelah campuran diendapkan dalam es selama 30 menit, RNA diendapkan melalui sentrifugasi pada 15.000 rpm dan suhu 4°C selama 25 menit. Pelet yang terbentuk dicuci menggunakan etanol 70% dingin dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm suhu 4°C selama lima menit, kemudian dilarutkan dalam

DEPC-dH₂O. RNA dipisahkan dari DNA dengan menambahkan LiCl 8 M hingga konsentrasi akhir 2 M, didiamkan selama 4-16 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifus kembali pada 13.000 rpm suhu 4°C selama 20 menit. Setelah pembilasan menggunakan etanol dingin 70% yang dilanjutkan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama lima menit, pelet RNA dilarutkan kembali dalam 50-100 µL DEPC-dH₂O. RNA yang diperoleh diuji kualitas dan kuantitasnya dengan elektroforesis pada gel agarose 0,8% dan dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 260, 280, dan 230 nm.

Perancangan primer spesifik

Primer spesifik untuk mengamplifikasi cDNA daerah penyandi lengkap (cgs) β-1,6-glukanase dirancang berdasarkan sekuen gen yang sama yang tersedia pada *GenBank*, dari organisme yang sama dengan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *T. harzianum*. Primer dirancang menggunakan program Primer3 yang dapat diakses secara *online*. Penyusunan primer dilakukan dengan mempertimbangkan panjang nukleotida, *melting temperature* (T_m) dan komplementasi pada daerah 3'. Amplifikasi dengan primer tersebut diprediksi menghasilkan fragmen DNA berukuran sekitar 1300 bp, sama dengan ukuran daerah penyandi lengkap β-1,6-glukanase.

Amplifikasi fragmen DNA

Untuk RT-PCR, sintesis cDNA utas tunggal dilakukan menggunakan kit *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) dengan templat RNA total menggunakan primer heksamer acak yang tersedia di dalam kit.

Utas tunggal cDNA selanjutnya dijadikan templat dalam proses PCR menggunakan primer spesifik yang telah dirancang sebelumnya. Reaksi PCR dilakukan dengan program sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama dua menit, 35 siklus masing-masing terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, penempelan primer pada suhu 48 °C selama 45 detik, dan ekstensi pada suhu 70°C selama dua menit. Selanjutnya reaksi diakhiri dengan ekstensi pada suhu 70°C selama empat menit. Hasil RT-PCR dicek pada gel agarosa.

Kloning produk RT-PCR dan analisis sekuen DNA

Fragmen DNA hasil RT-PCR diisolasi dari gel menggunakan kit *QIAquick Gel Extraction* dari QIAGEN, diligasikan pada vektor kloning pGEM-T Easy, kemudian dimasukkan ke dalam sel inang *E. coli* DH5α kompeten. Preparasi *E. coli* kompeten dilakukan dengan prosedur kejutan panas (Sambrook *et al.*, 1989.). *E. coli* hasil transformasi diseleksi pada medium LB agar yang mengandung ampisilin, IPTG dan X-gal. Adanya sisipan DNA target dalam koloni putih yang tumbuh pada medium seleksi dianalisis dengan PCR koloni menggunakan primer universal SP6 dan T7. Plasmid rekombinan yang mengandung fragmen DNA terklon diisolasi kembali dari koloni yang teruji positif pada analisis PCR koloni, kemudian dilakukan sekuensing untuk menentukan sekuen DNA dari fragmen terklon. Sekuen DNA yang diperoleh kemudian dianalisis dengan BlastN dan BlastX untuk mengkonfirmasi kebenaran DNA terklon sebagai fragmen DNA daerah penyandi lengkap β-1,6-glukanase.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi RNA dari miselium kapang

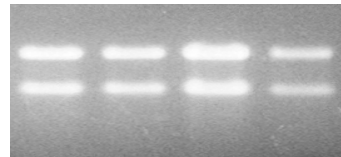
Analisis dengan elektroforesis pada gel agarosa dan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang 260, 280, dan 230 menunjukkan bahwa RNA yang tinggi kualitasnya berhasil diisolasi dari kapang *T. harzianum* (Gambar 1 dan Tabel 1). Selain tidak terdegradasi, RNA yang diperoleh juga menunjukkan kemurnian yang tinggi terhadap protein (A260/A280) dan polisakarida (A260/A230). Konsentrasi RNA yang diperoleh dari empat kali preparasi berkisar antara 692 ng/ μ L hingga 1708 ng/ μ L (Tabel 1).

Keberhasilan reaksi RT-PCR untuk mengisolasi suatu gen, dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah kualitas RNA yang digunakan. Selain utuh (tidak terdegradasi), RNA tersebut juga harus bebas dari kontaminan DNA dan senyawa lain seperti protein dan polisakarida. Adanya kontaminan DNA dapat menjadi target polimerase untuk amplifikasi sehingga hasil yang diperoleh menjadi tidak spesifik. Sedangkan kontaminasi protein dan polisakarida akan menghambat kerja polimerase sehingga dapat berakibat pada kegagalan proses amplifikasi. Oleh karena itu RNA yang terdegradasi oleh *RNase* atau terkontaminasi oleh komponen lain termasuk DNA menjadi salah satu indikator ketidakberhasilan isolasi RNA. Kualitas dan kuantitas RNA yang tinggi pada penelitian ini sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1 dan Tabel 1, sangat memenuhi syarat sebagai templat dalam reaksi RT-PCR pada tahap berikutnya.

Primer spesifik dan amplifikasi gen penyandi β -1,6-glukanase

Gambar 2 adalah sekuen DNA gen penyandi β -1,6-glukanase dari *T. harzianum* yang diakses secara *online* dari *GenBank* dengan no akses *X79197* dan dijadikan input pada perancangan primer menggunakan program *primer3*. Pada Gambar tersebut dapat dilihat posisi primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA daerah penyandi β -1,6-glukanase. Dua primer *forward* (Cell-F1 dan Cell-F2) dan satu primer *reverse* (Cell-R) yang digunakan dalam penelitian ini beserta susunan nukleotida, dan suhu leleh (T_m)nya disajikan pada Tabel 2.

Hasil RT-PCR menggunakan kedua pasang primer (Cell-F1/R dan Cell-F2/R) dapat dilihat pada Gambar 3. Nampak bahwa kedua pasang primer menghasilkan fragmen DNA spesifik dengan ukuran yang lebih kurang sama dan diperkirakan mendekati ukuran gen lengkap penyandi β -1,6-glukanase. Sesuai dengan posisi masing-masing primer yang ditunjukkan pada Gambar 1, maka pasangan primer Cell-F1/R diharapkan akan menghasilkan fragmen DNA berukuran 1322 bp sedangkan pasangan primer Cell-F2/R akan mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 1316 bp.



Gambar 1. Profil RNA hasil isolasi dari *T. harzianum*.

Figure 1. Profile of RNA isolated from *T. harzianum*.

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian RNA hasil isolasi.
 Table 1. Concentration and purity of the isolated RNA.

RNA No.	Konsentrasi Concentration ng/uL	A 260/A280	A260/A230
RNA-1	692	2,088	1,682
RNA-2	800	2,002	1,560
RNA-3	1324	2,019	1,704
RNA-4	1708	1,909	1,730

cctacagctaccatca agatgaagtactccatcgt tctccc g gc ta t tctcgcggcacc
 gccftt catg gctgccccaaagaccgca cct gaa ggcctcaacca gaccgctcg tttc
 gagcagcttg gcaa gcgctttgagcctgcacttg ctct ggtatcaccaa g atcc gtgg
 gtcaact tcggtgg at g gcttatcagtga gccatggat gatgtccaatgagtggaaacaac
 aacatgg gctgcaacaatgctgcctctga gttcg at t gcatgcaacaactacatgggc
 agcaagcgtgacgcaaacaccaagtccagaaccactacagg gactggatcaacccc
 cccaccg t tca g tctg ttcacg atgtcg gctgaacactatccgtatccca t tgctac
 tggctctacga tgccat tctgacacg gctagcgagccattgccc at ggcaacctccag
 ctccgctatct t g acgctg tt gttcagaa g gccgct gatctcg gaatctac gtcacatt
 gatcttcacgggtgccctg g tg gtaacaacaggatgccttcaccggccagaacccaac
 cctgctg g t tctacaactcatacactatg gtcgtgct ga ga g tg gctgtcttggatg
 acaaaccgca tc cacacca accctgcctactcgac tg ttg gtat gattgaggttctaac
 gagcctgtctccagacacg tg ga gg tggctgctaccctgctcctggcaggaccaagc
 atggtccagacctactaccagg tgcctcaa ggccgtgctg atgccgaggctgctgctg
 aacgtccaagcaacaagaagctgcacgtgcag ttcattg tccagcaag tg ggattctggt
 gatctcgcagcaacgccgccc tcaagaacgaccccatg gttg gcttgacgaccacaac
 tacattg gcttt g cctta gcaacactg gcgacca gtactctctca t gca cagcgcctgc
 actgactctcgtgtcgtcagcggccag gact tt gctatca ctg gcgagtggagcatgacc
 tctgg tgcgactg gcatgac g gaaact tcttccaagaat tcttcaagctcagcagcag
 ctgtatgagtctctg gaatggacg gatg ga tctactggacctg gaagaccgagttgaac
 gacccccg atggacc tactctta tgtaecta cct ca actaca tcccaaccaacgctgct
 gccctgca gcagcagaac tt ta ccag gatgtctgctctggatacaggtaaacacgag
gatt g tca acg gtcatcact tat tacatactact tcaaatct g ta t at t tctcg atgg
 acat a at f ta tt a gacttgaactacctag ccaa ct tt aa ttaaca ta aat gtgtc
 tagtatctatc

Gambar 2. Sekuen DNA gen penyandi β-1,6-glukanase (X79197) dan posisi primer. Tanda panah hitam adalah primer Cell-F1, tanda panah biru adalah primer Cell-F2 dan tanda panah merah adalah primer Cell-R.

Figure 2. DNA sequence of the gene encoding β-1,6-glukanase (X79197) and the primer position. Black arrow is Cell-F1 primer, blue arrow is Cell-F2 primer and red arrow is Cell-R primer.

Tabel 2. Susunan nukleotida primer hasil rancangan beserta suhu leleh (T_m)

Table 2. Nucleotide sequence of the designed primers with melting temperature (T_m)

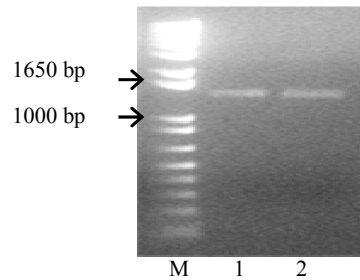
Primer	Susunan nukleotida	T_m
Primer	Sequence of nucleotide	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
Cell-F1	5'-ATCAAGATGAAGTACTCCATC	58
Cell-F2	5'-ATGAAGTACTCCATCGTTGCT	58
Cell-R	5'-ACCGTTGAGCAATCACTCGT	60

Selain kemurnian RNA yang digunakan, keberhasilan reaksi RT-PCR juga sangat dipengaruhi oleh spesifisitas dan suhu penempelan primer. Spesifisitas primer yang tinggi akan lebih menjamin komplementasi antara basa-basa dari primer dengan basa-basa dari kedua ujung fragmen DNA yang akan diamplifikasi sehingga peluang keberhasilan amplifikasi fragmen DNA target lebih tinggi. Dalam merancang primer terdapat beberapa ketentuan umum untuk primer yang ideal, di antaranya adalah panjang primer antara 18-28 nukleotida, tersusun oleh 50 – 60% G+C dan kedua primer mempunyai titik leleh yang sebanding (Innis & Gelfand, 1990). Pada penelitian ini, meskipun kedua primer *forward* yang digunakan mempunyai kandungan GC lebih rendah dari 50%, ternyata masih dapat berfungsi dengan baik dalam proses PCR, dan menghasilkan fragmen DNA yang spesifik.

Kloning kedua fragmen DNA hasil RT-PCR secara terpisah ke dalam *E. coli* menggunakan vektor pGEM-T Easy juga memberikan hasil sebagaimana diharapkan. Hasil analisis PCR terhadap koloni putih yang tumbuh pada medium seleksi menunjukkan bahwa lebih dari 50% koloni yang dianalisis terbukti positif mengandung sisipan DNA yang diduga adalah DNA target hasil RT-PCR. Karena primer yang digunakan adalah primer

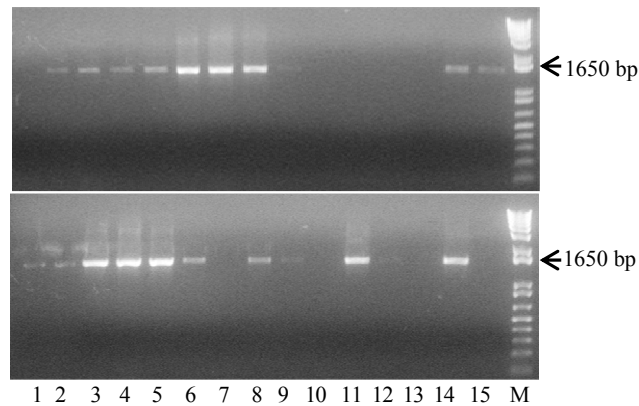
universal T7 dan SP6, maka ukuran fragmen DNA yang dihasilkan lebih besar dari ukuran DNA hasil RT-PCR, yaitu sekitar 1450 bp (Gambar 4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa rangkaian prosedur percobaan kloning yang terdiri dari rekombinasi fragmen DNA hasil RT-PCR dengan vektor pGEM-T Easy, transformasi dengan kejutan panas, dan kultur pada medium seleksi yang mengandung antibiotik, secara kuantitatif cukup efektif dan efisien. Pendekatan kloning dengan RT-PCR semacam ini atau dengan primer heterologous telah banyak dilaporkan keefektivannya, antara lain kloning gen *TcAPI* dengan primer yang diisolasi dari jaringan tanaman kakao (Samanhudi *et al.*, 2006) dan gen ACCase dari tanaman kelapa sawit (Budiani *et al.*, 2007).

Untuk lebih memastikan keberhasilan rekombinasi dan keperluan analisis pada tahap eksperimen berikutnya, selanjutnya dilakukan isolasi plasmid rekombinan dan pengujian dengan digesti menggunakan enzim endonuklease *EcoRI* yang situs pemotongannya mengagit sisipan DNA terklon pada vektor kloning. Profil elektroforesis plasmid rekombinan hasil isolasi dan digestinya menggunakan *EcoRI* mengkonfirmasi bahwa rekombinan antara vektor kloning dengan gen β -1,6-glukanase putatif telah diperoleh (Gambar 5). Fragmen DNA hasil pemotongan masing-masing berukuran



Gambar 3. Hasil RT-PCR menggunakan pasangan primer Cell-F1/R (lajur 1), dan Cell-F2/R (lajur 2); M : 1 kb plus DNA ladder.

Figure 3. Result of RT-PCR with primer pairs of Cell-F1/R (lane 1), and Cell-F2/R (lane 2); M : 1 kb plus DNA ladder.



Gambar 4. PCR dari 15 koloni hasil transformasi *E.coli* dengan produk RT-PCR (lajur 1-15) dengan pasangan primer Cell-F1/R (atas) dan Cell-F2/R (bawah). M: 1 kb plus DNA ladder.

Figure 4. PCR of 15 colonies produced by transformation of *E.coli* with RT-PCR product (lanes 1-15) using primer pairs of Cell-F1/R (top) and Cell-F2/R (bottom). M: 1 kb plus DNA ladder.

sekitar 3 kb (representasi ukuran pGEM-T) dan sekitar 1300 bp yang sesuai dengan ukuran gen β -1,6-glukanase putatif. Karakterisasi lebih lanjut gen β -1,6-glukanase putatif 1,3 kb ini dilakukan dengan sekuensing DNA kedua fragmen

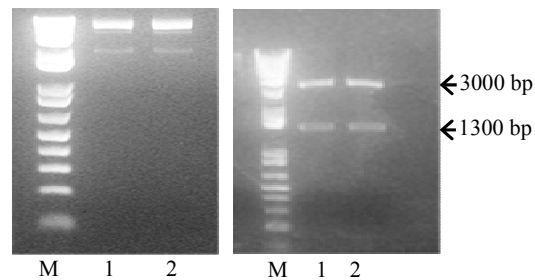
terklon yang dilanjutkan analisis Blast untuk memastikan identitasnya sebagai gen lengkap penyandi β -1,6-glukanase. Sekuensing dilakukan dengan primer universal M13 dan T7 yang merupakan bagian dari vektor kloning. Masing-

Kloning gen penyandi β -1,6-glukanase kapang secara cepat.....

masing sekuensing dapat membaca urutan nukleotida dengan relatif teliti hingga 600-an basa. Sekuen DNA yang dihasilkan setelah dibersihkan dari kontaminasi vektornya kemudian ditentukan identitasnya melalui analisis Blast. Hasil analisis secara ringkas ditampilkan pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Dari Tabel 3 dan Tabel 4 nampak bahwa fragmen DNA hasil RT-PCR terklon mempunyai homologi tinggi dengan gen penyandi β -1,6-glukanase dari *T. harzianum* dan dari *H. virens*. Selain

BlastN juga dilakukan analisis BlastX untuk melihat homologi di tingkat proteinnya. Hasil analisis BlastX juga memberikan kecenderungan yang sangat mirip (data tidak ditampilkan) dengan data hasil analisis BlastN. Data yang diperoleh dari analisis Blast ini membuktikan bahwa fragmen DNA produk RT-PCR terklon adalah gen β -1,6-glukanase. Secara teoritis hasil analisis Blast dengan E -value $\leq e-04$ mengindikasikan tingkat kemiripan yang tinggi (Claveri *et al* 2003).



Gambar 5. Plasmid rekombinan hasil isolasi dari koloni 1 dan 2 (kiri); hasil digesti dengan *EcoRI* (kanan). M : 1 kb plus DNA ladder.

Figure 5. Recombinant plasmid isolated from colonies 1 and 2 (left); digested with *EcoRI* (right). M: 1 kb plus DNA ladder.

Tabel 3. Hasil BlastN terhadap ujung M13 sekuen gen β -1,6-glukanase putatif.

Table 3. Results of BlastN of the M13 end of putative β -1,6-glucanase sequence.

No. Aksesii Accession No.	Deskripsi Description	<i>E</i> - Value	Identitas Identity
X79196.1	<i>Tharzianum</i> β 1,6 glucanase gene	0,0	96%
AF395757.1	<i>Hypocrea virens</i> β -1,6-glucanase	1e-174	85%
FJ589724.1	<i>Hypocrea virens</i> β -1,6-glucanase	7e-167	98%

Tabel 4. Hasil BlastN terhadap ujung T7 sekuen gen β -1,6-glukanase putatif.
 Table 4. Results of BlastN of the T7 end of putative β -1,6-glukanase sequence.

No. Aksesii <i>Accession No.</i>	Deskripsi <i>Description</i>	<i>E - Value</i>	Identitas <i>Identity</i>
X79196.1	<i>Tharziaunum</i> β -1,6-glukanase gene	0,0	96%
FJ589724.1	<i>Hypocrea virens</i> β -1,6-glukanase	0,0	95%
AF395757.1	<i>Hypocrea livii</i> β -1,6-glukanase	0,0	85%

Kesimpulan

Dengan pendekatan eksperimental RT-PCR menggunakan primer spesifik, vektor kloning pGEM-T, *dideoxy sequencing* dan analisis BlastN, telah berhasil diklon dan dikarakterisasi secara relatif mudah dan cepat cDNA daerah penyandi lengkap β -1,6-glukanase dari *Trichoderma harzianum*.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Pemerintah Indonesia melalui DIPA 2008 Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor 396/PL. 200/I.9/3/08 tanggal 3 Maret 2008.

Daftar Pustaka

Alper, H., J. Moxley, E. Nevoigt, G.R. Fink & G. Stephanopoulos (2006). Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Sci.*, 314, 1565-1568.

Budiani, A., D. Santoso & A.R. Purba (2007). Keragaman sekuen DNA fragmen gen

penyandi ACCase subunit BCCP dari tiga tipe kelapa sawit. *Menara Perkebunan*, 75, (1), 1- 11.

- Chang, S., J. Puryear & J. Cairney (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11, 98-100.
- Carle-Urioste, J.C., J.E. Escobar-Vera, S. El-Gogary, F. Henrique-Silva, E. Torigoi, O. Crivellaro, A. Herrera-Estrella & H. El-Dorry (1996). Cellulase Induction in *Trichoderma reesei* by Cellulose Requires Its Own Basal Expression. *J. Biologic. Chem.*, 272, 10169-10174.
- Claveri, J. M. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics for Dummies*. 2^{sd} Ed. New York, Wiley Publishing.
- Dmytruk, O.V, A.Y. Voronovsky, C.A. Abbas, K.V. Dmytruk, O.P. Ishchuk & A.A. Sibirny (2007). Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.*, 8, 165 – 173.
- Gong, C. S., N. J. Cao, J. Du & G.T. Tsao. (1999). Ethanol Production from Renewable Resources. *Adv in Biochem Enginee/Biotech.*, 65, 207-239.

Kloning gen penyandi β -1,6-glukanase kapang secara cepat.....

- Howard, G.T. & B.A. White (1988). Molecular Cloning and Expression of Cellulase Genes from *Ruminococcus albus* 8 in *Escherichia coli* Bacteriophage λ . *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1752-1755.
- Howard, R.L., E. Abotsi, E.L. Jansen van Rensburg & S. Howard (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J. Biotech.*, **2**, 602-619.
- Irwin, D.C., M. Cheng, B. Xiang, J.K.C. Rose & D.B. Wilson (2003). Cloning, expression and characterization of a family-74 xyloglucanase from *Thermobifida fusca*. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3083-3091
- Kumar, R., S. Singh & O.V. Singh (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspective. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, **35**, 377-3791.
- Maas, R.H.W., R.R. Bakker, A.R. Boersma, I. Bisschops, J.R. Pels, E. de Jong, R.A. Weusthuis & H. Reith (2008). Pilot-scale conversion of lime-treated wheat straw into bioethanol: quality assessment of bioethanol and valorization of side streams by anaerobic digestion and combustion. *Biotech. for Biofuels*, **1**, 1-13.
- Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. & Mol. Biol. Rev.*, **72**, 379-412.
- Samanhudi, T. Chaidamsari, R.A. de Maagd, R. Poerwanto & D. Santoso (2006). Cloning and expression of the cacao APETALA gene. In: D. Santoso (ed). *Molecular and Genetic Engineering Studies Toward Improvement of Cacao Bean Production*. Bogor, Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops. 133p.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, & T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Santoso, D. (2006). *Molecular and Genetic Engineering Studies Toward Improvement of Cacao Bean Production*. Bogor, Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops. 133p
- Stephanopoulos, G. (2007). Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Sci.*, **315**, 801-804
- Voet, D. & J.G. Voet (1990). *Biochemistry*. New York, John Wiley & Sons. 1223p.