



klc  
kfc  
LP. 57/10  
Ari  
k

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING  
TAHUN ANGGARAN 2007

KLONING GEN PENYANDI SELULASE ASAL KEONG EMAS  
MELALUI TRANSFORMAN *Pichia pastoris*  
GUNA PRODUKSI ENSIM REKOMBINAN

Oleh :

M. Anam Al-Arif, MP., drh.

Dr. Suwarno, MSi., drh.

Dr. Mirni Lamid, MP., drh.



**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan  
Pengabdian kepada Masyarakat Nomor : 564/JO3.2/PG/2007  
Tanggal 28 Mei 2007

Fakultas Kedokteran Hewan  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2007

## HALAMAN PENGESAHAN

**Judul** : Kloning Gen Penyandi Selulase Asal Keong Emas Melalui Transforman *Pichia pastoris* Guna Produksi Ensim Rekombinan

**Ketua Peneliti**

Nama : M. Anam Al-Arif, MP., Drh.  
Jenis Kelamin : Laki-laki  
Pangkat/Golongan/ NIP : Penata Tingkat I /III-d/131836993  
Jabatan : Lektor  
Bidang Keahlian : Makanan Ternak  
Fakultas/ Jurusan/ Puslit : Fakultas Kedokteran Hewan  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga


**Tim Peneliti**

NO	NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	M. Anam Al-Arif, MP.,Drh	Pakan Ternak	FKH	Unair
2	Dr. Suwarno, MSi.,Drh	Biomolekuler	FKH	Unair
3	Dr. Mimi Lamid, MP.,Drh	Pakan Ruminansia	FKH	Unair

**Pendanaan dan jangka waktu penelitian**

Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 (tiga) tahun  
Biaya yang diusulkan : Rp 150.000.000,00  
Biaya yang disetujui tahun II : Rp 35.000.000,00

Mengetahui,  
Dekan FKH-Unair,

  
Prof.Hj.Romziah Sidik, drh.PhD

NIP. 130 687 305

Surabaya, 19 Desember 2007  
Ketua Peneliti,

  
M. Anam Al-Arif, MP., Drh.

NIP. 131 836 993

Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian  
Kepada Masyarakat Unair,

  
Prof.Dr.H. Sarmanu, MS.

NIP. 130 705 125



## RINGKASAN

Penelitian ini secara keseluruhan bertujuan untuk membakukan suatu probiotik pencerna serat kasar untuk meningkatkan pencernaan jerami padi sebelum diberikan kepada ternak ruminansia. Pada tahap pertama penelitian dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran RNA dari saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) serta untuk mengetahui hasil amplifikasi DNA ensim selulase. Pada tahap kedua dimaksudkan untuk mengetahui gambaran sekuen nukleotida gen selulase, mentransformasikan gen tersebut ke *Pichia pastoris* serta mengetahui ekspresi gen tersebut menggunakan SDS-PAGE dan Western Blot.

Jaringan pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) digerus dan dilakukan isolasi RNA total menggunakan reagen Trizol-LS, sintesis cDNA dengan menggunakan *ready-to-go reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RTG-RT-PCR) kit dan amplifikasi DNA menggunakan RTG-PCR kit. Hasil PCR kemudian di *running* dengan elektroforesis DNA. Dari penelitian ini didapatkan gambaran RNA dari sel-sel pada saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) yaitu 28 S dan 18 S. Hasil amplifikasi DNA ensim selulase menunjukkan panjang nukleotida 640 bp.

Pada tahap kedua, produk PCR dimurnikan menggunakan *gen cleaned kitt*, kemudian dilakukan sekuensing nukleotida menggunakan *ready reaction kitt* dan *Big dye terminator kitt* (Applied Biosystems). Pada tahap ini didapatkan sekuen nukleotida dengan panjang potongan atas 349 – 351 bp, namun setelah dilakukan alignment ternyata tidak didapatkan kemiripan dengan gen selulase hasil temuan Imjongjirak dkk. Untuk itu perlu dilakukan desain primer yang baru.

Kata kunci : ensim selulase, keong emas (*Pomacea canaliculata*), RNA, DNA, sekuensing, nukleotida

## SUMMARY

The full aim of this research is to standardize a probiotic for fiber digesting to increase the straw digestibility before passed to ruminant. At first phase of research intended to get of RNA characteristic from digestion tissue of gold snail (*Pomacea canaliculata*) and also to know the result of cellulase DNA amplification. In the second phase intended to get of the cellulase nucleotide sequence, transforming it to *Pichia pastoris* yeast and to know the expression of the gene by SDS-PAGE and Western Blot.

The digestive tissue of golden snail (*Pomacea canaliculata*) were grinded homogenous and done to isolation of total RNA by Trizol-LS reagent, synthesizing the cDNA by ready-to-go reverse transcriptase polymerase chain reaction (RTG-RT-PCR) kit and DNA amplification by RTG-PCR kit. The PCR results then running by DNA electroforeses. The result of this research is got by RNA characteristic from the digestive tissue of golden snail (*Pomacea canaliculata*) that is 28-S and 18-S. The DNA amplification of cellulose show the length of nucleotide is 640 bp.

At the second phase, PCR product was purified using gene cleaned kitt, then sequenced by ready reaction kit and Big dye terminator kit (Applied Bio-systems). The result of this phase was half nucleotide sequence is 349 - 351 bp, but after alignment was not got same as cellulase gene from Imjongjirak et al. To continuing this research, it is required newly primer design.

**Keyword :** cellulase enzyme, golden snail (*Pomacea canaliculata*), RNA, DNA, sequencing, nucleotide.

## PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah s.w.t. atas segala Rahmat dan KaruniaNya sehingga laporan penelitian Tahap II dengan judul : “Kloning Gen Penyandi Selulase Asal Keong Emas Melalui Transforman *Pichia pastoris* Guna Produksi Ensim Rekombinan” ini dapat diselesaikan.

Ensim selulase dibutuhkan oleh semua hewan ruminansia untuk mencerna selulosa yang merupakan bagian terbesar dari dinding sel tanaman. Ensim selulase tidak dapat diproduksi oleh semua hewan tingkat tinggi, sehingga hewan ruminansia perlu bersimbiosis dengan mikrobia untuk mendapatkan enzim tersebut. Meskipun sudah bersimbiosis dengan mikrobia, namun pemberian *feed additive* berupa pemberian mikrobia ataupun pengolahan pakan ruminansia menggunakan enzim ternyata dapat meningkatkan pencernaan pakan tersebut sehingga hewan yang mengkonsumsinya dapat berproduksi dengan lebih baik.

Beberapa hewan tingkat rendah misalnya rayap, semut dan keong dapat memproduksi enzim selulase komplek yang sangat dibutuhkan untuk mencerna selulosa. Isolasi gen pembawa selulase serta upaya kloning gen tersebut dirasa perlu untuk mendapatkan sumber enzim yang mudah dan tidak membutuhkan waktu lama.

Kami menyadari bahwa tulisan ini masih belum sempurna, oleh sebab itu kami mengharapkan masukan yang sangat berharga dari semua pihak, demi kesempurnaan laporan ini dan semoga bermanfaat bagi para pembaca.

Surabaya, Desember 2007

Penulis,

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	ii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR/ ILLUSTRASI .....	vi
I.    PENDAHULUAN .....	1
II.   TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I .....	8
III.  TINJAUAN PUSTAKA .....	10
IV.  METODE PENELITIAN .....	23
V.   HASIL DAN PEMBAHASAN .....	33
VI.  KESIMPULAN DAN SARAN .....	43
DAFTAR PUSTAKA .....	44
LAMPIRAN .....	50

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1. Ikatan glikosida pada pati dan selulosa .....	15
3.2. Kristal selulosa .....	16
3.3. Mekanisme selulase dalam menghidrolisis selulosa secara sinergis .....	17
5.1. Elektroforesis RNA total dari jaringan pencernaan serta isi usus keong emas ( <i>Pomacea canaliculata</i> ) .....	33
5.2. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-1.....	35
5.3. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-2.....	36
5.4. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-3.....	37
5.5. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-4.....	38
5.6. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-5.....	39
5.7. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-6.....	40
5.8. Sekuensing nukleotida dengan menggunakan primer EGX-F .....	40
5.9. Sekuensing nukleotida dengan menggunakan primer EGX-01R .....	41

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang Permasalahan**

Kebutuhan bahan pangan asal hewani semakin hari semakin meningkat. Hal ini seiring peningkatan jumlah penduduk, tingkat pendapatan, kesadaran gizi dan kualitas hidup masyarakat. Jumlah penduduk yang besar tersebut merupakan pangsa pasar yang besar karena kebutuhan bahan pangan asal hewan (daging, susu dan telur) merupakan kebutuhan primer yang harus dipenuhi.

Populasi ternak sapi di Indonesia pada tahun 2001 berjumlah sekitar 11,9 juta ekor, yang terdiri dari sapi asli (sapi Bali, sapi Madura, sapi Pesisir, sapi Peranakan Ongole (PO), sapi Aceh), dan sapi eksotik yang diimpor dari luar negeri (sapi Simmental, Brahman). Jumlah sapi tersebut belum mampu memenuhi kebutuhan pangan dalam negeri, sehingga harus diimpor sebanyak 450.000 ekor/tahun dari Australia (Rusfrida, 2005). Program kecukupan daging tahun 2010 yang dirancang Direktorat Jenderal Peternakan, menyebutkan peran produksi daging sapi dalam negeri harus memberikan kontribusi sebesar 90-95 persen dari kebutuhan nasional (Kompas, 2006).

Hewan ruminansia, misalnya sapi, kerbau, kambing, domba, antelop dan sebagainya termasuk golongan pemakan hijauan (herbivora). Peningkatan jumlah ternak sapi akan membutuhkan hijauan pakan ternak dalam jumlah yang besar. Jika jumlah hijauan tidak mencukupi maka dibutuhkan pakan alternatif pengganti hijauan. Salah satu pilihan yang selama ini banyak digunakan para peternak untuk



menggantikan hijauan adalah jerami padi. Jerami padi merupakan salah satu limbah pertanian yang berlimpah di seluruh wilayah Indonesia, terutama pada saat musim panen.

Menurut Hadjipanayiotou dkk. (1993), jerami padi mempunyai kelemahan berupa kandungan protein, mineral, vitamin dan karbohidrat tersedia yang rendah, serta kecernaan nutrien yang lambat dan rendah. Jackson (1978) menyatakan bahwa pencernaan jerami padi hanya sekitar 22% meskipun mempunyai kandungan TDN sebesar 35–51%. Preston (1986) menyatakan bahwa jerami padi mempunyai kandungan Protein Kasar 3–4% dari Bahan Kering, selulosa 43%, hemiselulosa 25%, lignin 12% dan abu 16 – 17%.

Jerami padi banyak mengandung selulosa. Menurut Wang (2004) selulosa merupakan rangkaian glukosa dengan jumlah 1000 sampai lebih dari satu juta unit sehingga merupakan sumber energi yang sangat potensial. Murashima dkk. (2002) menyebutkan bahwa glukosa pada selulosa terhubung dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida sehingga sulit didegradasi kecuali oleh enzim selulase.

Enzim selulase merupakan suatu kompleks enzim yang dapat memfermentasi selulosa menjadi glukosa melalui proses degradasi enzimatik. Terdapat tiga bentuk enzim selulase, yaitu komponen C1 ( *$\beta$ -1,4-glucan cellobiohydrolase* atau *exo- $\beta$ -1,4-glucanase*) yang dapat memecah unit glukosil kutub non-reduksi pada selulosa kristal menghasilkan selobiosa, komponen Cc (*endo- $\beta$ -1,4-glucanase*) yang dapat mendegradasi selulosa terlarut menghasilkan selulo-oligosakarida, serta komponen selobiase ( *$\beta$ -glucocidase*) yang memecah unit glukosil kutub non-reduksi pada selulo-oligosakarida dan menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Murashima dkk., 2002).

Dalam rumen hewan ruminansia terdapat mikrobia penghasil enzim selulase, namun pencernaan terhadap jerami masih tergolong rendah. Varga dan Kolver (1997) menyatakan bahwa hewan ruminansia hanya mampu mengubah 10 – 35% serat sebagai sumber energi sedangkan 20 – 70% selulosa tidak dapat tercerna.

Penambahan enzim pencerna serat, baik yang diaplikasikan pada pakan maupun diberikan secara langsung dapat meningkatkan produktivitas ternak (Adesogan, 2005). Krehbiel dkk. (2003) menyatakan bahwa pemberian mikrobia langsung pada hewan ruminansia dapat menurunkan asidosis rumen, meningkatkan konsentrasi propionat, jumlah protozoa serta respon kekebalan. Knowlton dkk. (2002) menemukan bahwa enzim pencerna serat yang diberikan langsung pada sapi perah dapat menimbulkan efek yang berbeda tergantung periode laktasi, baik terhadap pertambahan berat badan maupun produksi susu.

Beauchemin dkk. (2003) menyatakan bahwa enzim pencerna serat yang diaplikasikan pada hijauan, bijian ataupun pakan komplet sebelum dikonsumsi oleh sapi periode laktasi dapat meningkatkan pencernaan. Kung-Jr. dkk. (2002) juga menyatakan bahwa pemberian pakan komplet dengan sumber hijauan telah ditaburi enzim selulase dan xylanase dapat memberikan respon yang positif pada sapi laktasi.

Secara umum enzim selulase hanya diproduksi oleh mikrobia, baik bakteri, protozoa maupun jamur. *Clostridium cellulovorans* bisa memproduksi enzim selulase kompleks, yang disebut sebagai selulosam. Selulosam terdiri dari endoglukanase, eksoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase (Murashima dkk., 2002).

Beberapa hewan invertebrata, misalnya nematoda parasit tanaman, arthropoda dan moluska diketahui menghasilkan enzim selulase endogen. Sampai sekarang telah ditemukan kurang lebih 20 jenis hewan yang dapat memproduksi enzim selulase berupa endo- $\beta$ -glukanase dan  $\beta$ -glukosidase dan telah berhasil dikloning. Hewan-hewan tersebut antara lain rayap, kecoa, kumbang bertanduk, keong dan lain-lain (Lo dkk., 2003; Ji dkk., 2003; Tokuda dkk., 2004).

Tokuda dkk. (2004) menyebutkan bahwa dari 2600 spesies rayap ternyata 75%-nya tidak bersimbiosis dengan flagellata dalam saluran pencernaannya untuk mendegradasi serat kasar. Untuk mendegradasi serat kasar, rayap menghasilkan enzim pencerna serat dari tubuhnya yang disebut sebagai enzim endogen. Rayap yang bersimbiosis dengan flagellata ternyata juga menghasilkan enzim endogen untuk mencerna serat bersama-sama dengan enzim yang dihasilkan oleh flagellata. Enzim ini dihasilkan di saluran pencernaan rayap, mulai glandula saliva sampai usus bagian belakang.

Ji dkk. (2003) menyatakan bahwa enzim endogen pada keong *Ampullaria crossean* merupakan enzim multifungsi yang terdiri dari endoglukanase, eksoglukanase dan endoxylanase. Adanya enzim tersebut memungkinkan keong tersebut mencerna selulosa dan hemiselulosa. Menurut Lo dkk. (2003) sekuen gen selulase endogen yang dihasilkan oleh hewan invertebrata mempunyai kemiripan yang tinggi, rata-rata lebih dari 50%.

Keong emas banyak memakan berbagai macam hijauan pertanian meskipun bukan termasuk hewan ruminansia. Keong menyukai padi berusia muda, yaitu umur 1 - 3 minggu. Tingkat serangannya sangat sporadis, sehingga dalam waktu semalam

ribuan batang padi bisa habis dikonsumsi (Suara Merdeka, 2004). Keong emas (*Pomacea canaliculata*) mampu memakan tumbuhan karena kemungkinan dalam saluran pencernaan terdapat mikrobia yang mampu mencerna bahan yang banyak mengandung serat kasar atau karena keong emas menghasilkan enzim selulase endogen.

Charrier dan Brune (2003) menemukan mikrobia dalam saluran pencernaan keong Pulmonata. Castro-Vazquez dkk. (2002) menyebutkan bahwa pada usus bagian tengah keong emas (*Pomacea canaliculata*) terdapat korpuskel C dan K yang mampu memproduksi enzim pencernaan. Andrews (1965) dalam Jeong dkk. (1999) menyebutkan bahwa pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) mengandung enzim selulase yang kuat. Al-Arif dkk. (2004) menemukan bahwa isi saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) mempunyai aktivitas selulase lebih tinggi dibandingkan dengan isi saluran pencernaan rayap (*Macrotermes sp.*).

Ji dkk. (2003) menemukan enzim endogen pada keong *Ampullaria crosseana*. Enzim tersebut juga berhasil diisolasi dan diekspresikan pada *Pichia pastoris* sebagai enzim rekombinan. Imjongjirak dkk. (2006) menyatakan bahwa sekuen asam amino enzim selulase pada keong emas (*Pomacea canaliculata*) mempunyai kemiripan 98% dengan enzim selulase pada *Ampullaria crosseana*.

*Pichia pastoris* merupakan ragi metilotropik yang bisa mengekspresikan protein dalam jumlah tinggi, baik intrasel maupun ekstrasel, bahkan tidak akan terganggu walaupun terdapat endotoksin ataupun kontaminasi virus, oleh sebab itu protein yang tidak bisa diekspresikan pada bakteri bisa diekspresikan pada *Pichia pastoris* (Charoenrat, 2005).

*Pichia pastoris* populer sebagai *host* dalam pembuatan protein rekombinan, namun bagaimana kondisi saat proses tersebut berlangsung belum banyak diungkap sebagaimana *E. coli* dan *S. cerevisiae*. Sel bakteri cukup sederhana, waktu generasi yang cepat, produksi banyak dan murah, namun tidak mempunyai membran tempat organel menempel. Ragi merupakan eukaryota sederhana yang menyerupai sel mamalia, dapat tumbuh cepat dan murah sebagaimana bakteri, namun produksinya masih dinilai rendah. *Pichia pastoris* merupakan mikrobia bersel tunggal yang mudah dimanipulasi dan dikultivasi. Seperti halnya eukaryota, pada pasca translasi juga bisa dimodifikasi misalnya dalam proses proteolitik, formasi ikatan disulfida ataupun glikosilasinya (Jahic, 2003).

## **1.2. Subyek Penelitian**

Penelitian ini menggunakan keong emas (*Pomacea canaliculata*) sebagai subyek penelitian. Dari keong emas tersebut diambil bagian organ pencernaan, meliputi lambung dan usus. Diharapkan dari organ pencernaan tersebut bisa didapatkan enzim selulase endogen yang bisa digunakan sebagai probiotik untuk meningkatkan pencernaan serat kasar pada hewan ruminansia.

## **1.3. Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Makanan Ternak – Bagian Ilmu Peternakan FKH Unair, Lab. Virologi dan Immunologi – Bagian Mikrobiologi Veteriner FKH Unair, Lab. Biomolekuler – FKH Unair dan TDC – Unair.

#### **1.4. Hasil yang ditargetkan**

Hasil yang ditargetkan dalam penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan enzim selulase endogen dari saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*)
2. Mengetahui sekuen gen selulase endogen keong emas.
3. Mentransformasikan gen tersebut pada *Pichia pastoris*.
4. Mengetahui ekspresi gen tersebut dengan menggunakan SDS-PAGE dan Western Blot.
5. Pembakuan probiotik pencerna serat kasar untuk meningkatkan kecernaan jerami padi sebelum diberikan kepada ternak.

## BAB II

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHAP II

#### 2.1. Tujuan penelitian

##### 2.1.1. Tujuan khusus penelitian jangka pendek

Penelitian ini pada tahun pertama bertujuan untuk :

1. Untuk mendapatkan gambaran RNA dari saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*)
2. Untuk mengetahui hasil amplifikasi DNA enzim selulase asal saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*)

Pada tahun kedua bertujuan untuk :

1. Mendapatkan gambaran sekuen DNA penyandi enzim selulase
2. Melakukan pemetaan gen selulase dengan enzim restriksi endonuklease
3. Mentransformasikan gen selulase pada *P. pastoris*
4. Mengetahui ekspresi gen selulase dengan teknik SDS-PAGE dan Western Blot

##### 2.1.2. Tujuan khusus jangka panjang

Penelitian ini selama tiga (3) tahap, secara keseluruhan bertujuan untuk membakukan probiotik pencerna serat kasar untuk meningkatkan pencernaan jerami padi sebelum diberikan kepada ternak ruminansia.

## **2.2. Manfaat Penelitian**

Diharapkan dari penelitian ini dapat memecahkan masalah daya cerna hewan ruminansia yang rendah terhadap serat kasar terutama yang berasal dari jerami padi dengan menghasilkan probiotik pencerna serat kasar. Diharapkan jerami padi yang telah difermentasi dengan probiotik tersebut kecernaannya dapat ditingkatkan sehingga ternak yang mengkonsumsi bisa memproduksi dengan baik. Dengan demikian kekurangan bahan pakan ternak ruminansia yang selama ini banyak dialami para peternak sapi bisa diatasi.



## **BAB III**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **3.1. Pakan Ruminansia**

Keberhasilan industri peternakan ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu ketersediaan pakan, faktor bibit, manajemen dan kesehatan hewan, serta inovasi teknologi dan faktor eksternal lain. Profil usaha peternakan di sektor primer menunjukkan bahwa usaha peternakan unggas, sapi, kambing dan domba memberikan peluang usaha yang baik sepanjang manajemen pemeliharaan mengikuti prosedur dan ketentuan yang berlaku (Dwiyanto dkk., 2005).

Menurut Dirjen Bina Produksi Peternakan, masyarakat Indonesia baru mampu mengkonsumsi daging sapi sekitar 1,7 kg/orang/tahun. Jika penduduk Indonesia sekitar 220 juta orang, maka dibutuhkan 1,5 juta ekor sapi lokal dan 350.000 ekor sapi bakalan serta 30.000 ton daging. Jika terjadi peningkatan jumlah penduduk 2% per-tahun dan populasi sapi 14% per-tahun dengan kemampuan mengkonsumsi daging naik 1 gram/kapita/hari, maka dibutuhkan 1.265,8 ton/hari yang identik dengan 10.548 ekor/hari atau 3,85 juta ekor/tahun (Tawaf, 2004).

Populasi ternak sapi di Indonesia pada tahun 2001 berjumlah sekitar 11,9 juta ekor, yang terdiri dari sapi asli (sapi Bali, sapi Madura, sapi Pesisir, sapi Peranakan Ongole (PO), sapi Aceh), dan sapi eksotik yang diimpor dari luar negeri (sapi Simmental, Brahman). Jumlah sapi tersebut belum mampu memenuhi kebutuhan pangan dalam negeri, sehingga harus diimpor sebanyak 450.000 ekor/tahun dari Australia (Rusfrida, 2005).

Peningkatan jumlah ternak akan membutuhkan hijauan pakan ternak dalam jumlah yang besar pula. Jika jumlah hijauan tidak mencukupi maka dibutuhkan pakan alternatif pengganti hijauan (Rusfrida, 2005). Nitis (1994) menyebutkan bahwa komposisi hijauan yang dikonsumsi hewan ruminansia berbeda-beda tergantung spesies hewan, tempat pemeliharaan serta musim. Pada musim penghujan hijauan yang dikonsumsi sapi terdiri dari 79% rumput, 14% dedaunan serta 7% lain-lain, sedangkan pada musim kemarau hijauan yang dikonsumsi bisa terdiri dari 49% rumput, 32% dedaunan serta 19% lain-lain.

Salah satu pilihan yang selama ini banyak digunakan para peternak untuk menggantikan hijauan adalah jerami padi. Jerami padi merupakan salah satu limbah pertanian yang berlimpah di seluruh wilayah Indonesia, terutama pada saat musim panen. Selama ini jerami padi hanya digunakan sebagai bahan industri kertas, bahan bakar, media tanam jamur serta sebagian digunakan sebagai pakan ternak ruminansia pada musim kemarau. Penggunaan jerami padi sebagai pakan ruminansia mempunyai keuntungan antara lain berjumlah banyak serta tidak bersaing dengan kebutuhan manusia (Orskov, 1998).

Sebagai golongan limbah, jerami padi mempunyai kelemahan berupa kandungan protein, mineral, vitamin dan karbohidrat tersedia yang minim, serta lambat dan rendahnya pencernaan nutrisi. Jerami juga mengandung lignin yang melingkupi dinding sel sehingga sulit dicerna (Hadjipanayiotou dkk., 1993). Kualitas jerami padi sangat bervariasi, kandungan protein kasar berkisar 2-7% serta ADF (*Acid Detergent Fiber*) berkisar 41 - 56% berdasar Bahan Kering (Drake dkk., 2002).

Variasi ini dipengaruhi oleh faktor lingkungan, varitas dan penyimpanan (Soejono, 1995).

Doyle dkk. (1986) menyatakan bahwa jerami padi tersusun dari 4,1% Protein Kasar serta 86% dinding sel, sedangkan Preston (1986) menyatakan bahwa jerami padi mempunyai kandungan Protein Kasar 3 – 4% dari Bahan Kering, selulosa 43%, hemiselulosa 25%, lignin 12% dan abu 16-17%. Komar (1994) menyatakan bahwa dinding sel jerami padi tersusun atas 43,7% selulosa; 27,2% hemiselulosa; 9,8% lignin dan 13% silika.

Hewan ruminansia misalnya sapi, kerbau, kambing, domba, antelop, kijang dan sebagainya, berbeda dengan hewan non-ruminansia karena mempunyai kemampuan untuk menggunakan serat kasar sebagai sumber energi (Schneider dan Flatt, 1975). Semua hewan tingkat tinggi tidak bisa mencerna serat kasar, namun hewan ruminansia mampu memanfaatkan serat kasar karena dalam saluran cernanya terdapat mikrobia pencerna serat kasar (Ensminger dkk., 1990). Mikrobia yang ada dalam saluran pencernaan hewan ruminansia bisa berupa protozoa, bakteri maupun jamur. Ensim yang dihasilkan oleh mikrobia tersebut antara lain bersifat proteolitik, selulolitik, hemiselulolitik, lipolitik, amilolitik, metanogenik dan sebagainya (Ogimoto dan Imai, 1981).

Jackson (1978) menyatakan bahwa pencernaan jerami padi hanya sekitar 22% meskipun mempunyai kandungan TDN sebesar 35 – 51%. Menurut Van Soest (1994) selulosa dan hemiselulosa dalam rumen akan mengalami proses fermentasi yang menghasilkan *volatile fatty acid* (VFA) yang dapat memenuhi 50-60% kebutuhan energi.

Pemrosesan menggunakan bahan kimia maupun biologis diharapkan mampu memperbaiki kelemahan jerami padi. Pemrosesan yang banyak dilakukan selama ini adalah dengan menggunakan hidrolisis basa maupun amoniasi. Jerami padi yang dihidrolisis dengan 3% kapur dan 4% urea menghasilkan pertambahan berat badan lebih tinggi serta konversi pakan lebih rendah dibandingkan dengan jerami tanpa perlakuan (Trach, 2001).

Hidrolisis basa bisa meningkatkan kecernaan hingga 20% namun berharga mahal serta bisa menimbulkan pencemaran lingkungan, sedangkan amoniasi meskipun bisa meningkatkan kandungan protein jerami namun peningkatan kecernaannya hanya sebesar 12% (Jackson, 1978). Trach (2001) menyatakan bahwa dosis efektif amoniasi untuk meningkatkan kecernaan jerami padi adalah dengan menggunakan urea sebesar 4%, namun dosis ini terlalu besar bagi kebutuhan ternak ruminansia, kelebihan nitrogen akan dibuang bersama urin sehingga dosis tersebut dinilai tidak efisien. Penggunaan urea 2% yang ditambah dengan kapur juga dapat meningkatkan jerami padi meskipun dosis urea tersebut masih terlalu tinggi bagi kebutuhan mikrobia rumen. Menurut Trach (2001) proses amoniasi juga semakin mahal seiring peningkatan harga urea, sedangkan perlakuan secara biologis dengan menggunakan enzim diharapkan mampu mengatasi kesulitan kedua cara tersebut.

Penambahan enzim selulase dalam ransum hewan ruminansia dapat meningkatkan pertumbuhan meskipun dalam saluran pencernaan hewan tersebut sudah terdapat mikrobia pencerna serat kasar (Selinger dkk., 1996). Hino dkk., (2000) juga menyatakan bahwa penambahan enzim selulase dapat memperbaiki pencernaan serat kasar pada sapi potong terutama pada sapi yang diberi ransum tinggi konsentrat.

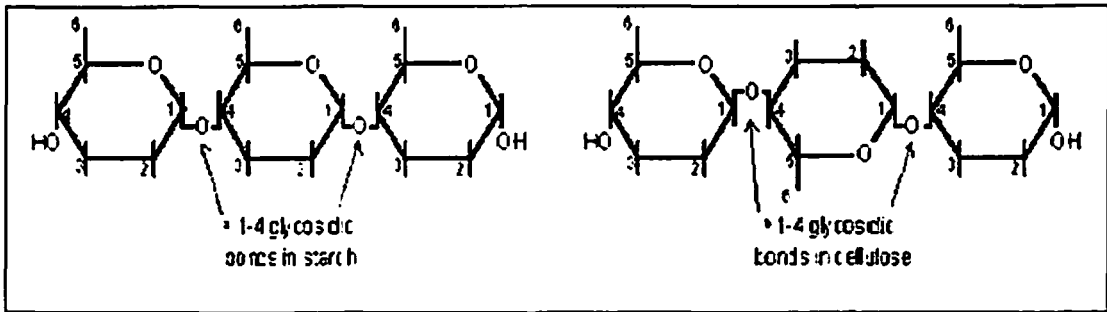
Nsereko dkk. (2002) menyebutkan bahwa pemberian enzim pencerna serat pada sapi perah dapat meningkatkan jumlah bakteri rumen pencerna hemiselulosa serta jumlah produk sekunder dari pencernaan selulosa. Beauchemin dkk. (2003) menyatakan bahwa pemberian *feed additive* berupa enzim terutama selulase dan xylanase dapat meningkatkan kecernaan serat serta efisiensi pakan dan penampilan ternak, baik pada sapi perah maupun sapi potong.

### 3.2. Selulosa

Selulosa merupakan salah satu polimer alam yang sangat melimpah di bumi. Selulosa merupakan elemen pokok dari dinding sel tanaman. Elemen ini banyak terdapat pada kulit kacang-kacangan dan butiran (40-50% BK), hijauan dan bagas (10-30% BK), biji butiran dan kacang-kacangan (3-15% BK) serta biji sereal (1-5% BK) (Perez, 2004). Selulosa dan hemiselulosa merupakan mayoritas struktur polisakarida tanaman dengan jumlah sekitar 70% dari biomassa tanaman. Selulosa dan hemiselulosa juga merupakan sumber nutrisi utama bagi herbivora. Nutrien ini bisa dikonversi menjadi gula terlarut oleh enzim selulase dan hemiselulase yang terutama dihasilkan oleh mikrobia (Bedford dan Partridge, 2001).

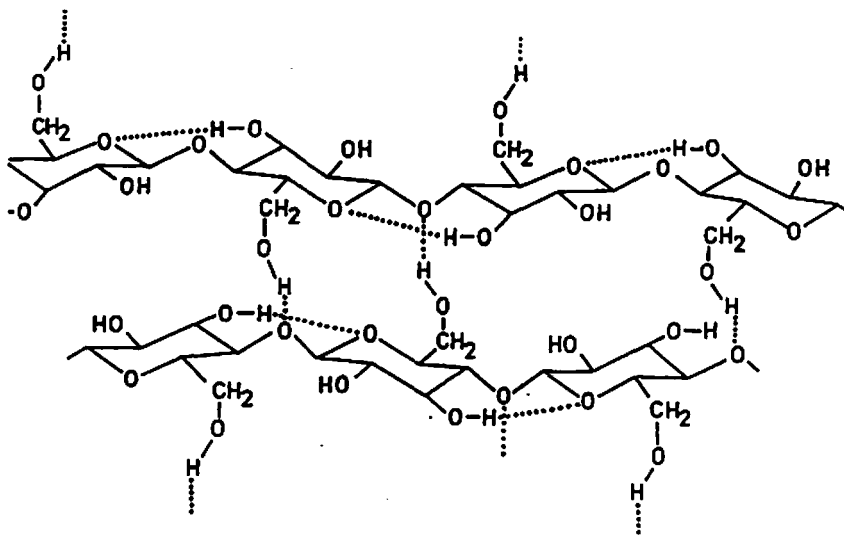
Komposisi kimia selulosa sangat sederhana, hanya berupa rangkaian glukosa yang terhubung dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida (Murashima dkk., 2002). Setiap molekul selulosa terdiri dari 1.000 sampai lebih dari 1 juta unit glukosa yang terangkai tanpa cabang. Ada dua tipe ikatan hidrogen pada molekul selulosa yaitu antara C<sub>3</sub>OH dengan oksigen pada cincin piranose pada molekul yang sama, serta antara C<sub>6</sub>OH pada molekul yang satu dengan oksigen pada ikatan glikosida molekul

lainnya (Wang, 2004). Setiap residu glukosa berputar 180° terhadap tetangga, sehingga struktur sub-unit selulosa berupa selobiosa (Staudenbauer dan Schwarz, 2004). Berikut adalah perbedaan ikatan antara pati dan selulosa.



**Gambar 3.1. Ikatan glikosida pada pati dan selulosa**

Ikatan hidrogen pada selulosa sangat ketat sehingga membentuk kristal. Kristal selulosa yang sangat ketat menyebabkan tidak ada enzim ataupun air yang bisa mendegradasi kecuali eksoglukanase (Wang, 2004). Murashima dkk. (2002) menyatakan meskipun rangkaian kristal selulosa cukup sederhana namun tidak ada satupun enzim tunggal yang bisa mendegradasi. Untuk mendegradasi kristal selulosa menjadi glukosa dibutuhkan tiga jenis enzim yang bekerja secara sinergis yaitu endoglukanase (CMCase = karboksi metil selulase/ Cx/ endo-1,4- $\beta$ -glukanase/ 1,4- $\beta$ -D-glukan glukanohidrolase), eksoglukanase (selobiohidrolase/ C1/ avicelase/ ekso-1,4- $\beta$ -glukanase/ 1,4- $\beta$ -D-glukan selobiohidrolase) dan selobiase ( $\beta$ -glukosidase) (Miyamoto, 1997; Bedford and Partridge, 2001). Berikut ini adalah gambaran kristal selulosa :

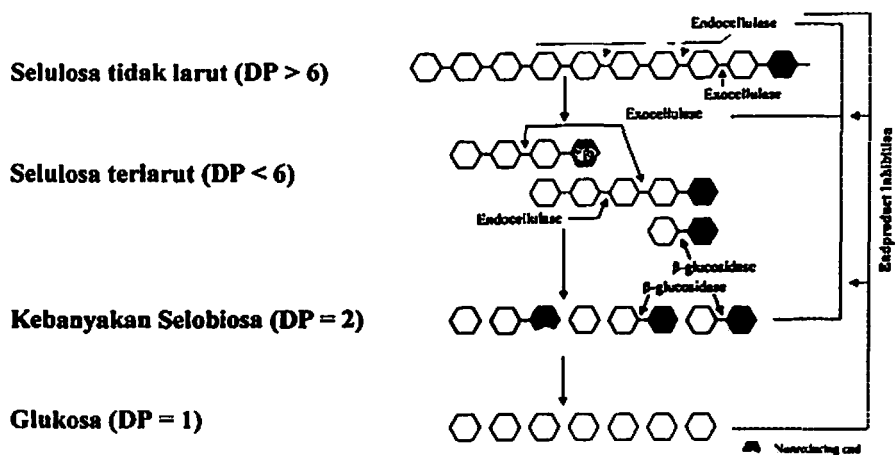


Gambar 3.2. Kristal selulosa (Staudenbauer dan Schwarz, 2004).

Irwin dkk., (2000) menyatakan bahwa di samping endoselulase juga dibutuhkan dua tipe eksoselulase untuk menghidrolisis selulosa secara maksimum. Satu memutus rangkaian selulosa dari kutub non-reduksi, sedangkan yang lain memutus dari kutub reduksi, sedangkan Staudenbauer dan Schwarz (2004) menyatakan bahwa enzim endoglukanase dapat bekerja sendiri untuk mendegradasi selulosa terlarut.

Enzim endoglukanase menghidrolisis ikatan 1,4- $\beta$  pada rangkaian selulosa secara acak menghasilkan selulodekstrin/selulo-oligosakarida, selobiohidrolase memecah unit glukosil dari kutub non-reduksi pada rangkaian selulosa menghasilkan selobiosa (Henrissat dan Bairoch, 1996; Miyamoto, 1997), sedangkan  $\beta$ -glukosidase memecah unit glukosil dari kutub non-reduksi dari selulo-oligosakarida (Henrissat dan Bairoch, 1996) dan menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Miyamoto, 1997).

Menurut Wang (2004), konversi selulosa menjadi glukosa oleh enzim *Trichoderma viride* melewati dua tahap. Tahap pertama  $\beta$ -1,4-glukanase memecah ikatan glukosidik menjadi selobiosa, ikatan  $\beta$ -1,4-glukosida kemudian dipecah oleh  $\beta$ -glukosidase (selobiase) menjadi glukosa. Reese dkk. dalam Miyamoto (1997) menyebutkan bahwa awalnya eksoglukanase menyebabkan kerusakan pada ikatan hidrogen selulosa, kemudian diikuti dengan hidrolisis oleh endoglukanase. Berikut adalah proses degradasi selulosa :



Gambar 3.3. Mekanisme selulase dalam menghidrolisis selulosa secara sinergis (Miyamoto, 1997)

Polisakarida pada dinding sel tanaman dapat digunakan oleh hewan sebagai sumber energi oleh aktivitas mikrobia rumen. Selulase dan xylanase merupakan kumpulan enzim yang dihasilkan oleh mikrobia rumen yang mampu menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida pada selulose dan xylan, suatu struktur polisakarida yang banyak terdapat pada tanaman (Ekinci dkk., 2001).



Banyak spesies hewan yang bersimbiosis dengan mikrobia untuk mendegradasi selulosa. Bakteri selulolitik juga bisa didapatkan dari saluran pencernaan cacing pemakan kayu serta rayap (Ljung dan Eriksson, 1985). Nakashima dkk. (2002) menyatakan bahwa pada saluran usus bagian tengah rayap *Coptotermes formosanus* terjadi pencernaan selulosa yang melibatkan enzim endo-1,4- $\beta$ -glucanase, sedangkan pada usus bagian belakang melibatkan selulase lain karena bersimbiosis dengan mikrobia berflagela.

Xu dkk. (2000) menyatakan bahwa dalam saluran pencernaan kupang terdapat enzim endoglukanase dengan berat molekul 20 dan 70 kDa. Ji dkk. (2003) menyatakan bahwa kurang lebih 20 jenis hewan terdapat gen endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase dalam tubuhnya. Suzuki dkk., (2003) juga menyatakan bahwa enzim selulase bisa didapatkan pada herbivora tidak bertulang belakang misalnya artropoda, nematoda dan moluska. Tokuda dkk. (2004) menyebutkan bahwa saluran pencernaan rayap mengandung enzim selulase endogen yang membantu rayap mencerna selulosa, sedangkan pada rayap *Coptotermes formosanus* mengandung selulase dengan aktivitas yang tinggi pada seluruh bagian saluran pencernaan.

### 3.3. Keong emas

Menurut Mohan (2002) keong emas dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

<i>Phylum</i>	: <i>Mollusca</i>
<i>Class</i>	: <i>Gastropoda</i>
<i>Subclass</i>	: <i>Probobranchia</i>
<i>Order</i>	: <i>Mesogastropoda</i>
<i>Superfamily</i>	: <i>Cyclophoracea</i>
<i>Family</i>	: <i>Ampullariidae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Pomacea</i>
<i>Species</i>	: <i>Pomacea canaliculata</i>

Keong emas (*Pomacea canaliculata*) merupakan keong air tawar dengan ukuran besar yang berasal dari Amerika Selatan sebagai hiasan akuarium (Baker, 2000). Sekitar tahun 1980 keong tersebut menyebar ke Jepang dan Taiwan untuk dikonsumsi sebagaimana bekicot (Bronson, 2002; dan Kenji, 2003). Lewat campur tangan manusia, keong tersebut dengan cepat tersebar ke Indonesia, Thailand, Kamboja, Hongkong, Cina, Filipina, Hawaii dan kemungkinan juga ke Australia (Bronson, 2002).

Keong emas menjadi hama yang meresahkan banyak petani padi di banyak negara di Asia, termasuk Taiwan, Jepang, Filipina dan Indonesia (Bidin, 2002). Keong tersebut menyukai padi berusia muda, yaitu umur 1 - 3 minggu. Tingkat serangan yang sangat sporadis, bahkan dalam waktu semalam ribuan batang padi bisa habis dikonsumsi (Suara Merdeka, 2004). Serangan ini biasa terjadi pada malam hari pada persawahan yang berair dengan ketinggian lebih dari 1 sentimeter atau pada air yang tergenang. Pengontrolan populasi keong emas sangat sulit dan membutuhkan

banyak biaya karena tingkat reproduksi yang tinggi. Setiap ekor keong emas betina dapat menghasilkan 2.000-3.000 butir telur setiap tahun (Bidin, 2002).

Menurut Charrier dan Brune (2003) keong mampu memakan tumbuhan karena dalam saluran pencernaan terdapat mikrobia yang mampu mencerna bahan yang banyak mengandung serat kasar. Umezurike (1976) menyebutkan bahwa pada saluran pencernaan bekicot terdapat enzim  $\beta$ -glukosidase dengan berat molekul  $\pm$  82.000 (C) dan berat molekul  $\pm$  41.000 (D). Andrews (1965) yang disitasi oleh Jeong dkk., (1999) menyebutkan bahwa saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) terutama pada bagian lambung mengandung enzim selulase yang kuat. Andrews (1965) yang disitasi oleh Castro-Vazquez dkk. (2002) menyebutkan bahwa dalam saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) terdapat korpuskel C dan K yang mengekskresikan enzim pencerna serat kasar. Al-Arif dkk. (2004) menemukan bahwa isi saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) mempunyai aktivitas selulase lebih tinggi dibandingkan dengan isi saluran pencernaan rayap (*Macrotermes sp.*).

### 3.4 *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* merupakan ragi metilotropik yang bisa mengekspresikan protein dalam jumlah tinggi, baik intrasel maupun ekstrasel, bahkan tidak akan terganggu walaupun ada endotoksin ataupun kontaminasi virus, oleh sebab itu protein yang tidak bisa diekspresikan pada bakteri bisa diekspresikan pada *P. pastoris*. *Pichia pastoris* bisa digunakan untuk memproduksi enzim  $\beta$ -glukosidase dari Thai Rosewood. Enzim  $\beta$ -glukosidase banyak diteliti karena potensial dalam bidang medis,

pertanian, bioteknologi dan industri.  $\beta$ -glucosidase diklasifikasikan berdasarkan hydrolasenya dan dapat digunakan untuk mendegradasi selulosa dan dan selobiosa (Charoenrat, 2005).

*Pichia pastoris* populer sebagai host dalam pembuatan protein rekombinan, namun bagaimana kondisi saat proses tersebut berlangsung belum banyak diungkap sebagaimana *E. coli* dan *S. cerevisiae*. Sel bakteri cukup sederhana, waktu generasi yang cepat, produksi yang banyak dan murah. Ragi merupakan eukaryota sederhana yang menyerupai sel mamalia, dapat tumbuh cepat dan murah sebagaimana bakteri. *Pichia pastoris* merupakan mikroba bersel tunggal yang mudah dimanipulasi dan dikultivasi. Sebagaimana eukaryota, pada post translasi juga bisa dimodifikasi misalnya dalam proses proteolitik, formasi ikatan disulfida ataupun saat glikosilasi. Vektor linier dapat diintegrasikan pada genom *P. pastoris* dengan rekombinasi homolog dan menghasilkan transforman yang stabil. Ekspresi gen heterolog juga memungkinkan untuk dilakukan dengan mengontrol promoter *alcohol oxydase promoter* (AOX1) (Jahic, 2003).

Jika tidak ada sumber karbon, *P. pastoris* dapat menggunakan methanol sebagai sumber karbon. Adanya AOX1 akan mengontrol ekspresi alkohol oksidase sebagai katalis pada step pertama jalur methanol-metabolik. Tanpa adanya methanol maka alkohol oksidase tidak terdeteksi. AOX1 promoter dapat mengontrol ekspresi protein rekombinan tingkat tinggi dan menghasilkan kadar protein sampai dengan 12 g/l. *Pichia pastoris* strain GS115 memiliki genotip *hist4* yang merupakan empat unsur seleksi vektor yang mengandung gen *hist4* (Invitrogen, 2000).

Vektor pPIC9K dengan panjang 9,3 kb merupakan vektor sekresi yang mengandung *multiple copies gene*. Vektor pPIC9K membawa promotor AOX1 untuk induksi ekspresi, gen *hist4* untuk seleksi pada mikroba strain *hist4*, dan 3' AOX1 untuk target integrasi ke dalam genom *P. pastoris*, serta  $\alpha$ -faktor *signal peptide* untuk mentransport secara langsung protein rekombinan ke dalam medium. Gen selulase mempunyai panjang 1185 bp yang menyandi 395 asam amino. Start codon ATG dimulai pada 162 bp dari ujung 5' cDNA dan diakhiri dengan signal AATAAA pada ujung 3' *untranslate region* yang berjarak sekitar 24 nukleotida dari ekor poly (A). Gen ini dapat dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *NotI*. Gen yang telah dipotong dapat disisipkan pada pPIC9K yang juga memiliki tempat pemotongan yang sama dengan gen selulase. Dengan menggunakan T4 DNA ligase gen selulase dapat diligasi ke dalam vektor pPIC9K (Ji dkk., 2003).

Imjongjirak dkk. (2006) menyatakan bahwa sekuen asam amino enzim selulase pada keong emas (*Pomacea canaliculata*) mempunyai kemiripan 98% dengan enzim selulase pada *Ampullaria crossean* (Lampiran 1). Panjang total cDNA dari EGX-CI01 1300 bp mengandung *Open Reading Frame* (ORF) 1188 nukleotida yang mengkode 395 polipeptida asam amino dengan berat molekul 44 kDa.

Imjongjirak dkk. selanjutnya memaparkan 4 macam sekuen nukleotida gen selulase asal keong emas (*Pomacea canaliculata*) dengan panjang 1300, 1277, 4512 serta 4937 bp (NCBI, 2007). Gambaran selengkapnya bisa dilihat pada Lampiran 2.

## BAB IV METODE PENELITIAN

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap yaitu :

1. Tahap I (tahun pertama) : isolasi RNA total dari jaringan usus keong emas, sintesis cDNA, amplifikasi DNA dan elektroforesis DNA.
2. Tahap II (tahun kedua) : pemurnian DNA, sekuensing nukleotida, pemetaan gen selulase dengan ensim restriksi endonuklease, ligasi dengan vektor pPIC9K, transformasi hasil ligasi pada *P. pastoris* dan pengamatan ekspresi selulase yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dan Western Blot
3. Tahap III (tahun ketiga) : produksi selulase melalui biakan *P. pastoris* rekombinan, uji aktifitas selulase secara in-vitro dengan Filter Paper Assay dan in-vivo pada ternak domba

### 4.1. Metode Penelitian Tahap I (Tahun Pertama)

Metode penelitian tahap I meliputi isolasi RNA total dari jaringan usus keong emas, sintesis cDNA, amplifikasi DNA dan elektroforesis DNA.

#### 4.1.1 Isolasi RNA total

RNA total diisolasi dari jaringan usus keong emas. Jaringan usus diseksi dan dihomogenasi sehingga terbentuk larutan kental seperti bubur. Isolasi RNA total dari jaringan usus dilakukan dengan menggunakan Trizol-LS reagent (Invitrogen Life Technologies).



1. Satu gram jaringan usus keong emas digerus dengan mortar steril kemudian ditambah dengan 1 cc PBS dan dihomogenisasi.
2. Sebanyak 250  $\mu$ l suspensi jaringan usus ditambah dengan 750  $\mu$ l Trizol-LS, dicampur dengan pipet dan didiamkan 5 menit pada suhu ruangan.
3. Campuran kemudian ditambah 200  $\mu$ l chloroform, divortex, diinkubasi 5 menit pada suhu ruang dan disentrifus 12.000 rpm selama 15 menit.
4. Supernatan diambil sebanyak 500  $\mu$ l, dipindah ke tabung baru, ditambah 500  $\mu$ l Propanol-2, divortex, diinkubasi suhu ruang 10 menit dan disentrifus 12.000 rpm 10 menit.
5. Supernatan dibuang dan pelet ditambah dengan 1000  $\mu$ l etanol 70%, selanjutnya RNA total dapat disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan.

#### 4.1.2 Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan *ready-to-go reverse transcriptase polymerase chain reaction (RTG-RT-PCR)* kit (Amersham Biosciences).

1. RNA total dikeringkan dengan disentrifus, etanol dibuang dan dihisap dengan pompa vakum.
2. RNA total kering kemudian dilarutkan dalam *nuclease free water (NFW)*. Pelet (RNA total) ditambah dengan 200  $\mu$ l Bufer TE (Tris EDTA).
3. Sebanyak 10  $\mu$ l larutan RNA total dipanaskan di atas penangas air dengan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit.

4. *Bead* RTG-RT-PCR dilarutkan dalam 43 µl NFW ditambah dengan 5 µl RNA yang telah didenaturasi dan 2 µl primer oligo (dT) 12£18, sehingga total volume 50 µl.
5. Tabung kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Gene cyclor*, BioRad) dan dijalankan dengan program denaturasi 95°C 5 menit dan inkubasi 42°C 90 menit.

#### 4.1.3 Amplifikasi DNA

Untuk amplifikasi gen selulase dengan panjang 1,3 kb diperlukan beberapa langkah, yaitu amplifikasi bagian ujung-3' dan ujung-5' serta daerah *open reding frame* (ORF). Pada bagian ujung-5' digunakan primer EGX-F dan EGX01R, pada ujung-3' digunakan primer EGX-03F dan EGX-R. Untuk amplifikasi daerah ORF digunakan primer EGX-F dan EGX-01R.

NAMA	URUTAN 5' – 3'	SENSE
EGX01F	GC(A/T/G/C)GC(A/T/G/C)GG(A/T/G/C)GC(A/T/G/C)GG(A/T/G/C)GT(A/T/G/C)AC	+
EGX-11F	ATGCCCTCTGGTGCTGCTG	+
EGX-F	CGACGCTTCACAGTCAAGCGCATG	+
EGX03F	ATGACAATGGCTACAAC	+
EGX04F	ACCAGCATCAACTGAATG	+
EGX10F	CAGGCTGACCAGAATCCACTA	+
EGX01R	GG(A/G)TC(A/T/G/C)GC(A/T/G/C)GC(A/G)TG(A/T/G/C)GC(A/G)AT	-
EGX-R	GCCCTCTGAGTGTCGCTCTA	-



EGX10R	TTCAACTTTATTGCCCTCTG	-
EGX-11R	AATGTTGACGGTGTGGGGAC	-
	Oligo (dT) 18	-
Anchor	GGCCTGCAGTCGACTAGTAC-Oligo (dT) 17	-

Amplifikasi DNA menggunakan RTG-PCR kit (Amersham-Biosciences).

1. *Bead* RTG-PCR dilarutkan dalam 16  $\mu$ l NFW, ditambah 5  $\mu$ l produk RT, ditambah 2  $\mu$ l (100 pmol) primer *forward* dan 2  $\mu$ l (100 pmol) primer *reverse* atau oligo (dT), sehingga volume menjadi 25  $\mu$ l.
2. Tabung kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR dan dijalankan dengan siklus awal berupa denaturasi 95°C - 5 menit, 40 siklus dengan denaturasi 94°C - 45 detik, *annealing* 60°C - 45 detik dan *extension* 72°C - 2 menit serta siklus akhir 72°C - 7 menit.

#### 4.1.4 Elektroforesis DNA

Hasil PCR kemudian di *running* dengan elektroforesis DNA.

1. Agarose 1 % dilarutkan dalam bufer TAE, ditambah etidium bromid 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l, kemudian dicetak pada gel *plate* yang terdapat *comb*.
2. Gel selanjutnya diletakkan pada *chamber* elektroforesis dan dituangi bufer TAE. Sampel DNA produk PCR sebanyak 5  $\mu$ l ditambah dengan 2  $\mu$ l *blue juice*, dimasukkan ke dalam sumuran gel. Sebagai acuan panjang nukleotida

digunakan marker *EZ load 500 bp rulers* (Biorad). *Chamber* selanjutnya dinyalakan dengan kekuatan 100 V selama 30 menit.

3. Gel kemudian dibaca pada u.v tranluminator dan hasilnya difoto.

## **4.2. Metode Penelitian Tahap II (Tahun Kedua)**

Metode penelitian tahap II meliputi pemurnian DNA, sekuensing nukleotida, pemetaan gen selulase dengan ensim restriksi endonuklease, ligasi dengan vector pPIC9K, transformasi hasil ligasi pada *P. pastoris* dan pengamatan ekspresi selulase yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dan Western Blot.

### **4.2.1 Pemurnian DNA**

Pemurnian DNA produk PCR atau yang berasal dari TAE agarose gel dilakukan dengan *Gene Clean Kit* (Biogene).

1. Sebanyak 400  $\mu$ l *spin glass milk* ditambahkan ke dalam spin filter dan ditambah larutan DNA atau gel yang mengandung pita DNA yang telah dipotong.
2. Tabung kemudian dipanaskan pada 55°C - 5 menit untuk melelehkan gel. Selanjutnya disentrifus 1 menit sampai *liquid* dapat dipindah dari tabung.
3. Ditambah 500  $\mu$ l larutan pencuci ke dalam filter, disentrifus 30 detik dan disentrifus lagi 2 menit untuk mengeringkan pelet.
4. Filter kemudian dipindah ke tabung baru dan ditambah dengan 15  $\mu$ l larutan elusi ke dalam filter.

5. *Spin glass milk* selanjutnya diresuspensi dengan pipet, sentrifus 30 detik untuk memindah DNA *eluad* ke dalam tabung. Spin filter kemudian dibuang dan DNA *eluad* dapat disimpan sampai digunakan.

#### 4.2.2 Sekuensing Nukleotida

Sekuensing nukleotida dilakukan dengan *automated sequencer* ABI Prism 310 dengan menggunakan *ready reaction kitt* (Applied Biosystems) dan *Big dye terminator kitt* (Applied Biosystem).

1. DNA kering dengan konsentrasi 200 ng/ml ditambah 25  $\mu$ l *template suppression reagent*, divortex kemudian dipanaskan 95°C - 5 menit dan dimasukkan ke dalam es.
2. Sebanyak 30 – 90 ng DNA ditambah primer EGX10F (ujung depan) atau primer EGX10R (ujung belakang), 8  $\mu$ l *ready reaction mix* dan *deionized water* sehingga volume mencapai 20  $\mu$ l.
3. Tabung kemudian divortex, *spin down*, dan ditambah 30  $\mu$ l mineral oil.
4. Tabung kemudian *diloading* pada mesin *sequencer* pada program 96°C 10 detik, 96°C - 30 detik, 50°C - 5 menit dan 40°C - 4 detik sebanyak 25 siklus.
5. Hasil sekuen kemudian di *running* pada mesin *sequencer* dan hasil dibaca melalui monitor dalam bentuk grafik alogram.

#### **4.2.3 Pemetaan gen selulase**

Pemetaan gen selulase terdiri dari :

- a. Pemotongan DNA menggunakan enzim. Enzim yang digunakan adalah EcoRI dan NotI.

Larutan DNA 10 µg ditambah 1 µl enzim endonuklease restriksi (10 U/µl), 1 µl bufer enzim 10x, ditambah aquades sampai volume akhir 10 µl. Larutan kemudian diinkubasi 37°C selama 3 jam.

- b. Pemotongan DNA oleh dua enzim

Larutan DNA 30 µg ditambah 3 µl enzim restriksi I (10 U/ µl), 2 µl bufer enzim 10x ditambah aquades sampai 30 µl. Larutan diinkubasi 37°C selama 3 jam. Sebanyak 3 µl larutan tersebut kemudian ditambah 1 µl enzim restriksi II, 1 µl bufer enzim 10x dan 5 µl aquades. Selanjutnya larutan diinkubasi 37°C 3 jam. Hasil pemotongan DNA dilihat dengan elektroforesis DNA.

#### **4.2.4 Ligasi cDNA dengan vector pPIC9K**

Hasil pemurnian DNA dari gel agarose elektroforesis diambil sebanyak 6 µl ditambah 3 µl larutan DNA pPIC9K, 2 µl enzim T4 DNA ligase, 2 µl bufer ligase 5x dan 7 µl aquades. Larutan diinkubasi 15°C selama 4 jam. Hasil ligasi siap untuk ditransformasi.

#### 4.2.5 Transformasi hasil ligasi

cDNA yang telah diligasi pada vektor diambil 10 µl kemudian ditambahkan pada 50 µl sel kompeten *P. pastoris*. cDNA dan sel kompeten tersebut kemudian diinkubasi pada 37°C selama ½ jam dan dilakukan *heat shock* pada 42°C selama 59 detik, dimasukkan dalam es 2 menit. Ke dalam campuran ditambahkan medium yeast agar lunak, disentrifus 5000 rpm selama 20 menit. Pelet diresuspensi, kemudian ditanam pada plat agar medium yang bebas histidin.

#### 4.2.6 Pengamatan ekspresi selulase

Koloni *P. pastoris* yang tumbuh pada media bebas histidin digoyang pada 37°C selama 24 jam. Kultur disentrifus 4000 g 10 menit, pelet diresuspensi dengan PBS. Suspensi sel disonikasi 5 x 3 menit dan disentrifus 400 g 10 menit. Supernatan diambil dan dilihat ekspresinya pada SDS-PAGE dan *Western Blot* kemudian dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif.

##### a. Denaturasi partikel selulase

Sebanyak 20 µl suspensi selulase ditambahkan 600 µl bufer lisis I kemudian ditambahkan 300 µl bufer lisis II dan dicampur baik-baik kemudian dibagi 50 µl untuk setiap *tube* steril. Sampel yang mengandung enzim selulase kemudian dipanaskan pada temperatur 65°C selama 15 menit sebelum *diload* pada gel atau disimpan pada -80°C sampai digunakan penelitian lanjutan.

#### **b. SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulphate - Polyacrylamid gel elektrophoresis*)**

Setelah larutan gel pemisah 15% dimasukkan pada *gel plate* pada posisi vertikal kemudian di atasnya diberi butanol sampai mengeras, butanol kemudian dibuang dan dibersihkan dengan PBS dan dikeringkan dengan *Whatman paper*. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* dan setelah itu dimasukkan *comb* dan ditunggu sampai betul-betul siap. *Comb* diambil dan dicuci dengan aquades kemudian diberi bufer. Sampel yang sudah dicampur dengan lysis bufer I/II dipanaskan 65°C selama 15 menit kemudian 10 µl sampel dimasukkan ke dalam lubang dengan tip 200 µl. Setelah itu *power supply* di starter dengan kekuatan 30 mA selama 5 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian di matikan dan *plate* dibuka dan dipisahkan selanjutnya dicuci dengan bufer.

#### **c. Western Blot**

Protein dari gel kemudian ditransfer ke membran nitrocellulose (PVDF) dengan cara memotong kertas whatman dan PVDF sesuai dengan besar gel. Enam sheets kertas absorben pada anode buffer I dan 3 *sheets* pada anode bufer II dan 6 *sheets* pada katode bufer.

Membran PVDF di inkubasikan pada anode bufer II selama 5 menit kemudian disusun 6 *sheets* kertas absorben dari buffer I, 3 *sheets* dari bufer II, PUDF, polyacrylamid dan 6 *sheet* kertas absorben dari katode bufer. Selanjutnya diberi aliran listrik dengan 0,8 mA/cm<sup>2</sup> dari gel. Setelah protein

ditransfer, PVDF dicuci dengan aquades selama 10 menit dan larutan TBS selama 10 menit kemudian dilakukan blotting. PUDF blot diblok dengan BSA 10 % selama 30 menit pada temperatur ruangan kemudian dicuci dengan larutan TBS 2 kali. Selanjutnya direaksikan dengan serum antiselulase dan sebagai kontrol direaksikan dengan serum negatip, kemudian diinkubasikan pada temperatur ruangan selama 1 jam . Setelah dicuci dengan larutan TBS 3 kali direaksikan dengan konjugat alkalin phospatase dan substrat p-NPP dan diwarnai dengan *fast-red*. Akhirnya dikeringkan pada temperatur ruangan. Dari hasil ini kemudian ditentukan protein spesifik, berat molekul protein dan kemudian dilakukan isolasi protein.

#### **d. Isolasi protein enzim dari gel SDS-PAGE**

Masing-masing pita pada Gel SDS-PAGE dipotong sesuai dengan jenis dan berat molekul enzim selulase yang terdeteksi, kemudian enzim diisolasi dengan cara elusi. Masing-masing potongan pita pada gel SDS-PAGE kemudian dimasukkan ke dalam kantong nilon yang diikat pada kedua ujung, ujung yang satu diikatkan pada *magnetic bar* dan ujung yang lain pada panel pengikat, kemudian dimasukkan ke dalam beker glas yang berisi PBS pH 7,2 dan diputar dengan *magnetic stirrer* selama 24 jam pada suhu dingin dan setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Protein enzim kemudian dipisahkan dari gel dan siap dilakukan penelitian lanjut.

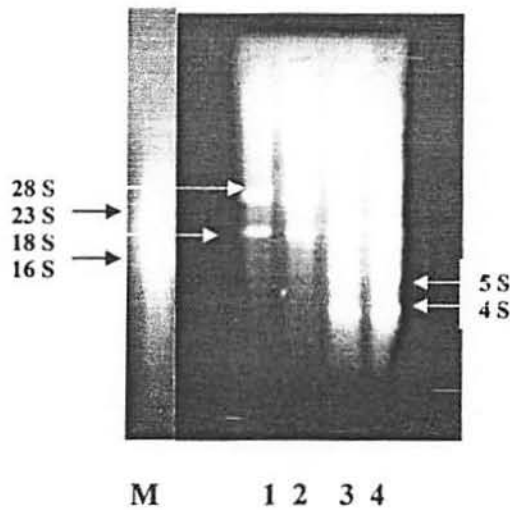
## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Penelitian

##### 5.1.1. Isolasi RNA Total

Hasil isolasi RNA total dari saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) dan dielektroforesis pada gel agarose dapat dilihat pada Gambar berikut ini.



**Gambar 5.1. Elektroforesis RNA total dari jaringan pencernaan (1 dan 2) serta isi usus (3 dan 4) keong emas (*Pomacea canaliculata*)**

Dari Gambar 5.1 tersebut terlihat beberapa pita (*band*) baik pada jaringan pencernaan keong emas. Sebagai pembandingan, dalam penelitian ini juga digunakan isi usus keong emas yang juga menunjukkan adanya pita. Pada jaringan pencernaan terlihat pita dengan nilai 28 S dan 18 S, sedangkan pada isi usus menunjukkan pita dengan nilai 5 S dan 4 S. RNA total mengandung *transfer* RNA (tRNA), *ribosomal* RNA (rRNA) dan *messenger* RNA (mRNA).

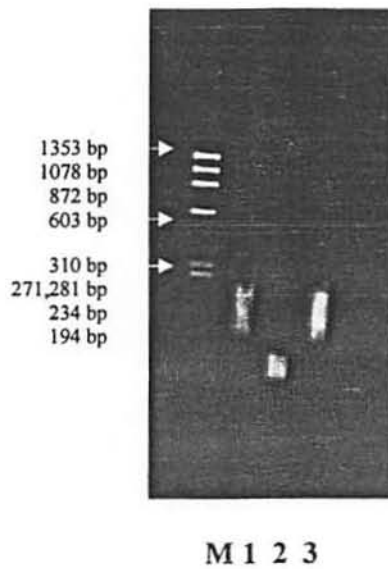


Menurut Irawan (2006) nilai 28 S dan 18 S menunjukkan rRNA, yang umum terdapat pada eukariota. Nilai 5 S adalah rRNA dan 4 S adalah tRNA, sedangkan nilai mRNA bervariasi. Nilai 5 S (rRNA), 4 S (tRNA) dan mRNA bisa berasal dari eukariota maupun prokariota. Menurut Charrier dan Brune (2003) dalam saluran pencernaan keong terdapat mikrobial yang mampu mencerna bahan pakan yang banyak mengandung serat kasar. Dalam penelitian ini isi usus keong emas menunjukkan kandungan rRNA, tRNA dan mRNA yang berasal dari mikrobial pencerna serat. Al-Arif dkk. (2004) juga menemukan bahwa isi saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) yang mengandung mikrobial mempunyai aktivitas selulase lebih tinggi dibandingkan dengan isi saluran pencernaan rayap (*Macrotermes sp.*).

Farrel (1993) menyatakan bahwa pita RNA berukuran 28 S dan 18 S merupakan rRNA dan mempunyai ukuran panjang 4,6 – 5,2 kb dan 1,8 – 2,0 kb dan ditemukan sebanyak 85% dari total RNA. Kedua pita 28 S dan 18 S dapat digunakan sebagai indikator jumlah RNA serta kualitas atau keutuhan RNA hasil ekstraksi.

### **5.1.2. Amplifikasi DNA**

Hasil amplifikasi DNA pada beberapa kali pengamatan menunjukkan hasil sebagai berikut.

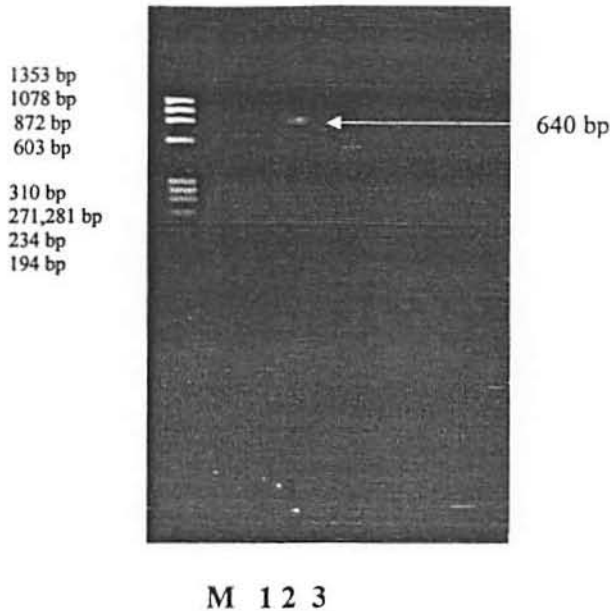


Gambar 5.2. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-1 (M : Marker, 1 : jar. pencernaan, 2 & 3: Isi usus)

Gambar 5.2 merupakan hasil amplifikasi menggunakan primer EGX-10F (CAGGCTGACCAGAATCCACTA) dan EGX-10R (TTCAACTTTATTGCCCTC-TG) dengan suhu *annealing* 62°C. Pada Gambar tersebut terlihat bentukan *smear*, baik yang berasal dari jaringan maupun pada isi usus. Hal ini menunjukkan bahwa suhu *annealing* masih belum sesuai.

Amplifikasi DNA memerlukan primer yang spesifik. Efektifitas suatu primer tergantung dari hasil percobaan dan keberhasilan reaksi amplifikasi sangat ditentukan oleh pemilihan primer yang benar. Perbedaan sekuen nukleotida pada daerah *primer* dipilih (posisi *primer*) bisa menyebabkan tidak terjadi *annealing*, sehingga menghasilkan PCR yang negatif.

Hasil amplifikasi DNA pada pengamatan lain dapat dilihat pada Gambar 5.3 berikut ini.

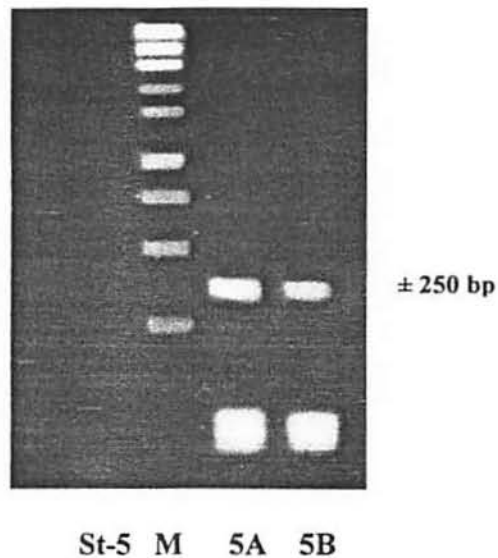


**Gambar 5.3. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-2 (M: Marker)**

Gambar 5.3 merupakan hasil amplifikasi menggunakan primer sebagai berikut :

1) EGX-03F (ATGACAATGGCTACAAC) dan EGX-01R (GG(A/G)TC(A/T/G/C)GC(A/T/G/C)GC(A/G)TG(A/T/G/C)GC(A/G)AT); 2) EGX-11F (TAAGAATTC-CCCTCTGGTGCTGCTGGT) dan EGX-01R (GG(A/G)TC(A/T/G/C)GC(A/T/G/C)GC(A/G)TG(A/T/G/C)GC(A/G)AT); 3) EGX-03F (ATGACAATGGCTACAAC) dan EGX-11R (AATGTTGACGGTGTGGGGAC) dengan suhu *annealing* 50°C. Pada Gambar tersebut pada pasangan primer nomor tiga (3) terlihat bentukan pita kecil, sedangkan pasangan primer lainnya terlihat *smear*. Berdasarkan posisi primer EGX-03F dengan nomor nukleotida 536 – 552 bp dan EGX-11R dengan nomor nukleotida 1157 – 1176 bp maka dapat diketahui bahwa pita DNA tersebut mempunyai panjang 640 bp.

Berdasarkan sekuen nukleotida yang dikemukakan oleh Imjongjirak dkk. (NCBI, 2007) maka digunakan pasangan primer yang baru. Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.4 berikut ini.

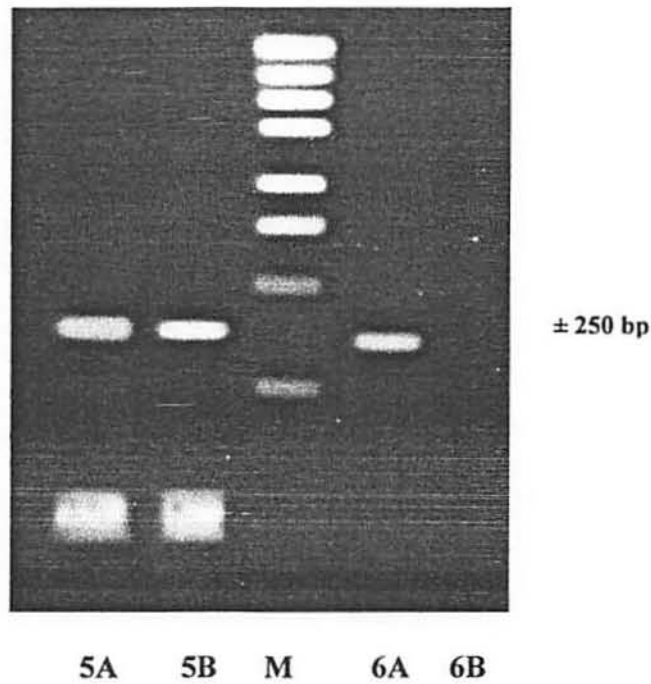


**Gambar 5.4. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-3**

Kolom pertama (St-5) menggunakan pasangan primer EGX-F (CGACGCTTCACAGTCAAGCGCATG) dan EGX-R (TAGAGCGACTCAGAGGGC) dengan panjang nukleotida 1300 bp, namun tidak terlihat sewaktu dielektroforesis. Selanjutnya dilakukan NESTED dengan menggunakan potongan depan (5A) EGX-F (CGACGCTTCACAGTCAAGCGCATG) dan EGX-01R (GG(A/G)TC(A/T/G/C)GC(A/T/G/C)GC(A/G)TG(A/T/G/C)GC(A/G)AT) serta potongan belakang (5B) EGX-03F (ATGACAATGGCTACAAC) dan EGX-R (TAGAGCGACTCAGAGGGC) dengan panjang nukleotida masing-masing sekitar 650 bp.

Pada Gambar 5.4 terlihat bentukan pita dengan berat molekul masing-masing sekitar 250 bp. Namun pita yang terlihat bukanlah pita tunggal, pada bagian bawah masih terlihat pita lainnya. Oleh sebab itu pada percobaan selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan pasangan primer yang sama namun konsentrasinya dikurangi.

Hasil amplifikasi DNA menggunakan metode tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.5 berikut ini.

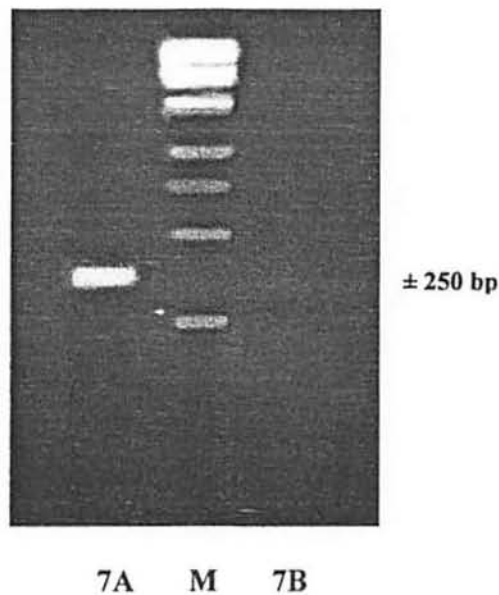


**Gambar 5.5. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-4**

Kolom 6A menggunakan pasangan primer seperti 5A, sedangkan 6B menggunakan pasangan primer seperti 5B, namun konsentrasinya berbeda. 5A dan 5B menggunakan primer dengan konsentrasi 60 pmol, sedangkan 6A dan 6B menggunakan primer dengan konsentrasi 20 pmol.

Pada Gambar 5.5 terlihat kolom 6A menunjukkan pita yang sama dengan 5A, dengan berat molekul sekitar 250 bp meskipun tidak begitu nyata, sedangkan kolom 6B tidak terlihat adanya pita.

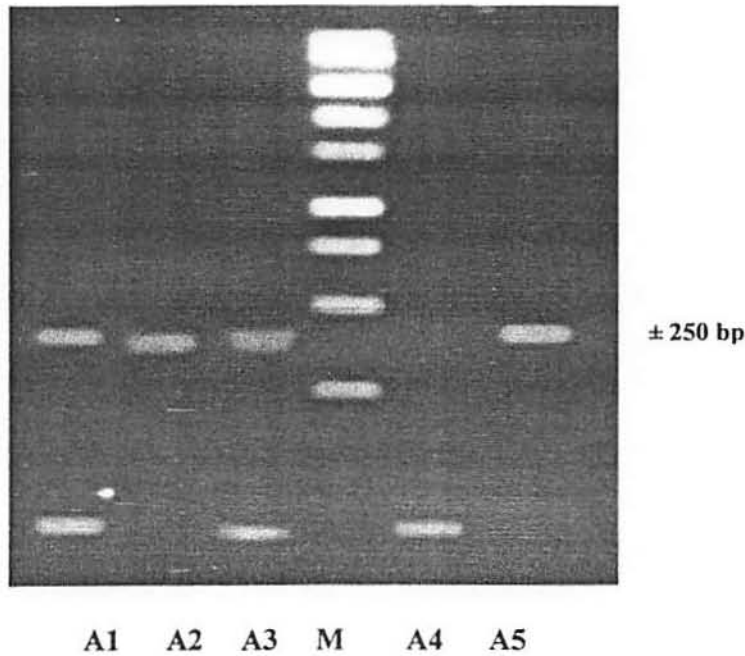
Untuk memastikan hasil, maka pasangan primer pada kolom 6A dan 6B diulangi lagi. Hasil amplifikasi DNA tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.6 berikut ini.



**Gambar 5.6. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-5**

Pada Gambar 5.6 terlihat pita yang sama seperti pada Gambar 6 (kolom 6A dan 6B). Pada Gambar tersebut pita yang terlihat hanya pada kolom 7A dengan berat molekul sekitar 250 bp, sedangkan kolom 7B tidak terlihat adanya pita.

Selanjutnya pada percobaan berikutnya pasangan seperti kolom 7A diperbanyak untuk percobaan selanjutnya (sekuensing nukleotida). Hasil amplifikasi DNA selanjutnya dapat dilihat pada Gambar 5.7 berikut ini.



**Gambar 5.7. Elektroforesis DNA hasil amplifikasi dengan PCR-6**

Pada Gambar 5.7 terlihat adanya pita pada kolom A1, A2, A3 dan A5 dengan berat molekul sekitar 250 bp, sedangkan kolom A4 tidak terlihat adanya pita. Untuk percobaan selanjutnya pasangan A4 tidak digunakan, sedangkan A1, A2, A3 dan A5 dilakukan sekuensing.

Hasil sekuensing menggunakan primer EGX-F dihasilkan sekuen nukleotida dengan panjang nukleotida 351, sebagai berikut :

```
TAGAACATCTAGTCCCACACACACAGTTTCTGCCCCCTTGTCCCAGACCGCATTG
AACTGTTGCTTCACGTGACCCGCCTCGGGCTAGTGACTCGTCCGACAAAGAGA TT
AGTGCCTACCAACTTGTCTCTCAAGACAAACATGAACGGGTGGTTCACTCAGAAGT
TCTCCGTGTACTGGCGCGTGGGAATCCGCTTGGCTGAGGCCGCAGCCACTGTTCC
GTTCTCGTTGACCTCAATGAGCGCGAGGTGGGTTATGTCCCTCACGTGGGCCGTG
TGGTCTTTGCCACAAGACACGAGAAGCTGGCTTCTCCCTACAGAAACATGCGCTT
GACTGGAACCCTCGG - 351
```

**Gambar 5.8. Sekuensing nukleotida dengan menggunakan primer EGX-F**

Hasil sekuen tersebut selanjutnya di-*alignment* dengan sekuen nukleotida yang ditemukan oleh Imjongjirak dkk., namun ternyata tidak ada yang sesuai. Demikian juga ketika di-*alignment* dengan primer EGX-F (CGACGCTTCACAGTC AAGCGCATG) maupun EGX-01R (GG(A/G)TC(A/T/G/C)GC(A/T/G/C)GC (A/G)TG(A/T/G/C)GC(A/G)AT) ternyata tidak ada yang sesuai.

Selanjutnya dilakukan sekuen dengan menggunakan primer EGX-01R. Hasil percobaan tersebut menghasilkan sekuen dengan panjang nukleotida 349, sebagai berikut :

```
GACGTTTCATTCAAGGGGCAGGGTTTCTGTCTGGGAGAAACCCAGTTCTTGTGTCAC
TGGTCAAAGACCACGCGGCCAGTTGAGGGACATGACCCACCTAGGGTTAGTGGA
GGTCAACGAGAACGGAACCGTGGCAATGGGGCCTCAGCCTAGCGGATTCCCACGC
GGCAGTACACGGAGAAGTACTCAGTCAACCACCCGTGGATGTTTGTCTAGAGAGAC
AAGGCAGCAGGCATTGTTCTTTGTCGTTGACAGTCAATTAGCCCGAGGCAGGTC
ACGTGAATAACAGGTCAATGCGGTCTTTGCCCAAGTGGGACAGAAACTGTGTGTG
TGTGTTTTAAAAAAA - 349
```

**Gambar 5.9. Sekuensing nukleotida dengan menggunakan primer EGX-01R**

Hasil sekuen tersebut selanjutnya di-*alignment* dengan sekuen nukleotida yang ditemukan oleh Imjongjirak dkk., namun ternyata tidak ada yang sesuai. Demikian juga ketika di-*alignment* dengan primer EGX-F (CGACGC TTCACAGTCAAGCGCATG) maupun EGX-01R (GG(A/G)TC(A/T/G/C)GC (A/T/G/C)GC(A/G)TG(A/T/G/C)GC(A/G)AT) ternyata juga tidak ada yang sesuai.

*Alignment* selanjutnya menggunakan BLAST ditemukan kesesuaian yang sangat rendah pada beberapa organisme, sebagai berikut :



**Sequences producing significant alignments:**  
(Click headers to sort columns)

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
<a href="#">NW_001838589.2</a>	Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_1103279188310)	<a href="#">46.4</a>	46.4	9%	0.020	90%	
<a href="#">NT_032977.8</a>	Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, reference assembly	<a href="#">46.4</a>	46.4	9%	0.020	90%	
<a href="#">NW_001839140.1</a>	Homo sapiens chromosome 8 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_1103279186723)	<a href="#">39.2</a>	39.2	6%	3.0	100%	
<a href="#">NT_008046.15</a>	Homo sapiens chromosome 8 genomic contig, reference assembly	<a href="#">39.2</a>	39.2	6%	3.0	100%	

Dari data *alignment* tersebut terlihat bahwa kemiripan sekuen nukleotida keong emas yang diperoleh hanya mencapai 6-9% pada *Homo sapiens*, dan tidak ada kemiripan sama sekali dengan selulase asal keong emas yang ditemukan oleh Imjongjirak dkk. Oleh sebab itu perlu dilakukan desain ulang terhadap primer yang akan digunakan. Dengan demikian penelitian tahap selanjutnya yang meliputi pemetaan gen selulase dengan enzim restriksi endonuklease, ligasi dengan vektor pPIC9K, transformasi hasil ligasi pada *P. pastoris* dan pengamatan ekspresi selulase yang dilakukan dengan teknik SDS-PAGE dan Western Blot belum bisa dilakukan sebelum gambaran sekuen DNA selulase yang tepat dapat ditemukan.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

Dari penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa :

1. Gambaran RNA dari sel-sel pada saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) adalah 28 S dan 18 S.
2. Hasil amplifikasi DNA enzim selulase asal saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*) pada potongan atas menunjukkan panjang nukleotida 349 - 351 bp.
3. Hasil sekuen nukleotida tidak menunjukkan kemiripan dengan sekuen nukleotida asal keong emas temuan Imjongjirak dkk.

#### **6.2. Saran**

Dari hasil penelitian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan desain primer yang baru untuk mendapatkan pemetaan gen selulase yang mempunyai kemiripan dengan salah satu gen selulase temuan Imjongjirak dkk., serta kemungkinan untuk dikloning dan dijadikan sebagai bahan probiotik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adesogan, A.T., 2005. Improving Forage Quality and Animal Performance with Fibrolytic Enzymes. Florida Ruminant Nutrition Symposium.
- Al-Arif, M.A., H. Setyono dan Tri-Nurhajati, 2004. Isolasi dan Karakterisasi Ensim Selulase dari Keong Emas dan Rayap Sebagai Bahan Pendegradasi Selulosa. FKH Unair, Surabaya.
- Baker, G., 2000. Golden Apple Snail. Earthbeat, Csiro, Canberra.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto, D.P. Morgavit and W.Z. Yang, 2003. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminant. J. Anim. Sci. 81(E.Suppl.2): E37-E47
- Bidin, Z., 2002. Use of Rotten Jackfruit to Control Golden Apple Snail. Food and Fertilizer Technology Center.
- Bronson, C.H., 2002. Apple Snail: A Common Aquarium Product. Techn. Bulletin 3.
- Castro-Vazquez A., E.A. Albrecht, I.A. Vega, E. Koch and C. Gamarra-Luques, 2002. Pigmented Corpuscles in The Midgut gland of *Pomacea canaliculata* and Other Neotropical Apple-snails (Prosobranchia, Ampullariidae) : A Possible Symbiotic Association. Biocell. 26 (1) : 101-109.
- Charoenrat, T., 2005. Process Design for Production of Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidase in *Pichia pastoris*. PhD-Thesis, School of Biotechnology, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden.
- Charrier, M. and A. Brune, 2003. The Gut Microenvironment of Helicid Snails (Gastropoda: Pulmonata) In-situ Profiles of pH, Oxygen and Hydrogen Determined by Microsensors. Can. J. Zool. 81: 928-935
- Doyle, P.T., C. Devendra and G.R. Pearce, 1986. Rice Straw as A Feed for Ruminant. International Development Program of Australian Universities and Cologes Limited (IDP), Canberra.
- Drake, D.D., G. Nader and L. Forero, 2002. Feeding Rice Straw to Cattle. ANR Publication 8079. [www.anrcatalog.ucdavis.edu](http://www.anrcatalog.ucdavis.edu)
- Dwiyanto, K., A. Priyanti and I. Inounu, 2005. Animal Production (Poultry, Cattle and Goat-Sheep) in Indonesia : Prospect and Strategic Development. Wartazoa 15(1):11

- Ekinci, M.S., N. Oscan, E. Oskose and H.J. Flint, 2001. A Study on Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes of Anaerobic Rumen Bacterium *Ruminococcus flavefaciens* Strain 17. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 25: 703-7019
- Ensminger, M.E., J.E. Oldfield and W.W. Heinemann, 1990. Feeds and Nutrition. 2<sup>nd</sup> ed. The Ensminger Publishing Co.
- Farrel, R.E. Jr., 1993. RNA Methodologies : A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Academic Press., San Diego.
- Hadjipanayiotou, M., L. Verhaeghe, T. Goodchild and B. Shaker, 1993. Ammoniation of Straw Using Urea, Ammonia Gas or Ammonium Hydroxide. Livestock Research for Rural Development 5(3).
- Henrissat, B. and A. Bairoch, 1996. Updating The Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases. Biochem. J. 316: 695-696
- Hino, T., T. Miwa, N. Asanuma, K. Shiraishi, H. Kitamura and H. Mizoguchi, 2000. Effect of Addition of Cellulase Preparation on Fiber Digestion in Beef Cattle. Animal Science Journal, 71(7): J46-J50.
- Imjongjirak, C., P. Amparyup and S. Sittipraneed. 2006. Cloning, Genomic Organization And Expression Analysis Of Cellulase Gene From Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) [www.scisoc.or.th/stt/32/sec\\_b/paper/stt32\\_B5\\_B0039.pdf](http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec_b/paper/stt32_B5_B0039.pdf)
- Invitrogen, 2000. Invitrogen Catalogue. Nederland.
- Irawan, B., 2006. Genetika Molekuler. 1. Diktat Bahan Ajar. Jurusan Biologi MIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Irwin, D.C., S. Zhang and D.B. Wilson, 2000. Cloning, Expression and Characterization of A Family 48 Exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. Eur.J.Biochem. 267: 4988-4997
- Jackson, M.G., 1978. Treating Straw for Animal Feeding. FAO Animal Production and Health Paper 10. Food and Agriculture Organisation of The United Nation, Rome.
- Jahic, M., 2003. Process Techniques for Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris*. PhD-Thesis, Royal Institute of Technology, Department of Biotechnology, Stockholm, Sweden.

- Jeong, K.H., Y.S. Lee and Y.B. Shim, 1999. Cellulase Activity in the Accessory Glands of the Digestive System of the Oriental Land Snail, *Nesiohelix samarangae* snail, *N. samarangae*. Korean J.of Malacology, 15(2): 81-92
- Ji, W., D. Ming, L. Yan-Hong, C. Qing-Xi, X. Gen-Jun and Z. Fu-Kun, 2003. Isolation of a Multi-functional Endogenous Cellulase Gene from Mollusc, *Ampullaria crossean*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 35(10): 941-946
- Kenji, I., 2003. Expansion of Golden Apple Snail, *Pomacea canaliculata* and Features of Its Habitat. Food and Fertilizer Technology Center.
- Kim, D.W., Y.K. Jeong, Y.H. Jang, J.K. Lee, K.S. Kim and H.I. Ryu, 1995. Kinetic Mechanism of Cellulose Hydrolysis by Endoglucanase I and Exoglucanase II Purified from *Trichoderma viride*. Bull. Korean Chem. Soc. 16: 742-747
- Knowlton, K.F., J.M. McKinney and C. Cobb, 2002. Effect of Direct-Fed Fibrolytic Enzyme Formulation on Nutrient Intake, Partitioning and Excretion in Early and Late Lactation Holstein Cow. J. Dairy Sci. 85: 3328-3335
- Komar, A., 1994. Teknologi Pengolahan Jerami Sebagai Makanan Ternak. Yayasan Dian Grahita.
- Kompas, 2006. Kendala Membangun Peternakan Sapi Potong. Kamis, 10 Agustus.
- Krehbiel, C.R., S.R. Rust, G. Zang and S.E. Gilliland, 2003. Bacterial Direct-fed Microbials in Ruminant Diets: Performance Response and Mode of Action. Jour.Animal Sci. 81: E120-E132
- Ljung, L.G. and K.E. Eriksson, 1985. Ecology of Microbial Cellulase Degradation. Adv. Microb. Ecol. 8: 237-299.
- Lo, N., H. Watanabe and M. Sugimora, 2003. Evidence for The Presence of A Cellulase Gene in The Last Common Ancestor of Bilaterian Animals. Proc. R. Soc. Lond. B (Supp) 270 : S69-S72.
- Miyamoto, K., 1997. Renewable Biological System for Alternative Sustainable Energy Production (FAO Agricultural Service Bulletin – 128). Osaka, Japan.
- Mohan, N., 2002. Introduced Species Summary Project Apple Snail (*Pomacea canaliculata*). [www.columbia.edu](http://www.columbia.edu)

- Murashima, K., A. Kosugi and R.H. Doy, 2002. Synergistic Effects on Crystalline Cellulose Degradation between Cellulosomal Cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol.* 184(18): 5088-5095
- Nakashima, K., H. Watanabe, H. Saitoh, G. Tokuda and J.I. Azuma, 2002. Dual Cellulase-digesting System of The Wood-feeding Termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(7): 777-784.
- NCBI, 2007. Found 4 nucleotide sequences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&cmd=search&term=cellulase+Pomacea>
- Nitis, I.M., 1994. Forage Production System for Sustainable Environment. In: Sustainable Animal Production and The Environment. Proceedings of the 7<sup>th</sup> AAP Animal Science Congress held in Bali, Indonesia.
- Nsereko, V.L., K.A. Beauchemin, D.P. Morgavi, L.M. Rode, A.F. Furtado, T.A. McAllister, A.D. Iwaasa, W.Z. Yang and Y. Wang, 2002. Effect of A Fibrolytic Enzyme Preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on The Rumen Microbial Population of Dairy Cows. *Can. J. Microbiol.* 48: 14-20.
- Ogimoto, K. and S. Imai, 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Society Press, Tokyo.
- Orskov, E.R., 1998. Feed Evaluation With Emphasis on Fibrous Roughages and Fluctuating Supply of Nutrients. A review. *Small. Rum. Res.* 28, 1-8.
- Osbrink, W.L.A., K.S. William, W.J. Connick, M.S. Wright and A.R. Lax, 2001. Virulence of Bacteria Associated with the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in New Orleans, LA. *Environment. Entomol.* 30(2): 443-448
- Rusfrida, A., 2005. Potensi sapi pesisir sebagai penghasil daging. *Pikiran-Rakyat*, Kamis 12 Mei.
- Preston, T.R., 1986. Better Utilization of Crop Residues and By-products in Animal Feeding: Research Guidelines. 2. A Practical Manual for Research Workers. Food and Agriculture Organisation of The United Nation, Rome.
- Schneider, B.H., and W.P. Flatt, 1975. The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments. The University of Georgia Press, Athens.

- Selinger, L.B., C.W. Forsberg and K.J. Cheng, 1996. The Rumen: A Unique Source of Enzymes for Enhancing Livestock Production. *Anaerobe*, 2 (5): 263-284
- Soejono, M., 1995. Perubahan Struktur dan Kecernaan Jerami padi Akibat Perlakuan Urea Sebagai Pakan Sapi Potong. Disertasi. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Staudenbauer, W.L. and W.H. Schwarz, 2004. Hydrolysis of Crystalline Cellulose by Bacterial Enzyme Systems. In: *Fachgebiet Mikrobielle Biotechnologie*.
- Suara Merdeka, 2004. Keong Emas Menyerang Padi Muda. *Harian Umum Suara Merdeka*, 16 Januari.
- Sundstol, F and E. Owen, 1984. Straw and Other Fibrous By-products as Feed. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.
- Suzuki, K., T. Ojima and K. Nishita, 2003. Purification and cDNA cloning of a Cellulase from Abalone *Haliotis discus hannai*. *Eur.J.Biochem.* 270: 771-778
- Tawaf, R., 2006. Kendala membangun peternakan sapi potong. *Kompas* 10 Agustus.
- Tokuda, G., L.O. Nathan, H. Watanabe, G. Arakawa, T. Matsumoto and H. Noda, 2004. Major Alteration of the Expression site of Endogenous Cellulases in Members of an Apical Termite Lineage. *Molecular Biology*, 13: 3219-3228
- Trach, N.X., 2001. Treatment and Supplementation of Rice Straw for Ruminant Feeding in Vietnam. *Proceeding : Workshop on Improved Utilization of By-products for Animal Feeding in Vietnam - NUFU Project*.
- Umezurike, G.M., 1976. The Beta-glukosidase in The Gut Contents of The Snail *Achatina achatina*. *Biochem. J.* 157(2): 381-387.
- Van Soest, P.J., 1994. *The Ruminant*. 2<sup>nd</sup> ed. Nutritional Ecology of Cornell University Press, Ithaca and London.
- Varga, G.A and E.S Kolver, 1997. Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. *The Journal of Nutrition*, 127: 8198-8238
- Wang, N.S., 2004. Cellulose Degradation. Biochemical Engineering Laboratory (ENCH 485), University of Maryland.

Warren, R.A.J., 1996. Microbial Hydrolysis of Polysaccharides. Annual Review of Microbiology. 50: 183-212

Xu, B., U. Hellman, B. Ersson and J. Jan-Christer, 2000. Purification, Characterization and Amino-acid Sequence Analysis of A Thermostable, Low Molecular Mass Endo- $\beta$ -1,4-glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. Eur.J.Biochem. 267: 4970-4977



Lampiran 1. Kemiripan asam amino selulase *Pomacea canaliculata* dengan *Ampullaria crossean*

tr Q7Z1V6 Cellulase EGX [*Ampullaria crossean*] 395 AA  
Q7Z1V6\_9CAEN align

Score = 827 bits (2136), Expect = 0.0  
Identities = 390/395 (98%), Positives = 395/395 (100%)

```
Query: 1 MPAGAAGAGVTSIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKKKAFPFPGTCVAAWAYN 60
      MP+GAAGAGVTS+IDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSTIRVLQK+KAFPFPGTCVAAWAYN
Sbjct: 1 MSPGAAGAGVTSEIDRLRRSDITVHVNVGGNINHGQVSIRVLQKRKAFPFPGTCVAAWAYN 60

Query: 61 DGSKGAYRDFIHQHYNWAVPENSLKWASIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGIKVRGHNL 120
      DGSKGAYRDFIHQHYNWAVPENSLKWASIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGIKVRGHNL
Sbjct: 61 DGSKGAYRDFIHQHYNWAVPENSLKWASIEPNRGQKNYQPGLNMLHGLRNHGIKVRGHNL 120

Query: 121 VWSVDNTVQNWVKALHGDELKRVVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLHGQWYQHQLND 180
      VWSVDNTVQNWVKALHGDELKRVVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLHGQWYQHQLND
Sbjct: 121 VWSVDNTVQNWVKALHGDELKRVVVDHIVETINTFKGLVEHWDVNNENLHGQWYQHQLND 180

Query: 181 NGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNNVVSNSYSTNDYLRQGQQFKAANVGLYGLGAQCHF 240
      NGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNNVVSNSYSTNDYLRQGQQFKAANVGLYGLGAQCHF
Sbjct: 181 NGYNLELFRIAHAADPNVKLFLNDYNNVVSNSYSTNDYLRQGQQFKAANVGLYGLGAQCHF 240

Query: 241 GDEADPEPGTKQRLDTLAQVGVPIWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGIL 300
      GDE+PPEPGTKQRLDTLAQVGVPIWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGIL
Sbjct: 241 GDES DPEPGTKQRLDTLAQVGVPIWATELDVVASDENRRADFYEHALTVLYGHHAVEGIL 300
```

---

Query: 301 MWGFWDKAHWRGARAALVVGDNLQLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFH 360  
MWGFWDKAHWRGARAALVVGDNLQLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFH

Sbjct: 301 MWGFWDKAHWRGARAALVVGDNLQLTAAGRRVLELFEHRWMTDETHNLAAGTQFTVRGFH 360

Query: 361 GDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNINIS 395  
GDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNIN+S

Sbjct: 361 GDYEVQVIVQGQEHTNLRQTFSLGNGPHTVNINVS 395

Lampiran 2. Sekuen nukleotida selulase endogen keong emas

**Pomacea 1300**

aggaccagaggagggcatcagttttgttgtcga**cgacgcttcagtcaagcgcatgcccgc** EGX-F  
**tggtgctgctggtgctggggtgaccagcgacatcgacagactgagaagaagcgacataac** 11F  
ggttcacgtgaatggtggtgtaacatcaaccacggtcaagtgagcattcgtggttaca  
aaagaaaaaggcattcccgttcgggacatggtggtggccgctgggctacaacgatgggtc  
caaaggagcataccgggatttcatccaccagcactacaactgggcccgtgccagaaaactc  
actcaagtgggctagcatcgaacctaacaggggacaaaagaattatcagcctggcctaaa  
catgcttcacggactgagaaatcacgggattaagggtgagaggtcacaacctgggtggtc  
tgtcgacaatacgggtgcagaactgggtgaaggctctgcatggggatgagctgcgaaagg  
tgtccatgaccacatcgtggaaacctcaacacatttaaggccctagtggagcactggga  
tgtgaacaacgagaacctgcatggccagtggt**accagcatcaactgaatgacaatggcta** 04F, 03F  
**caacctggaactggtccgta**tcgcacacgcccgcgacccc**aacgtcaaactcttctcctcaa** 01R  
cgactacaacggttgtgtccaacagttattcaacaaacgactatcttcgacaaggccaaca  
gtttaaggccgctaattgtgggtctttacgggttgggtgctcaatgccactttggcgacga  
agccgaccagaaccggtaactaagcaacgtctggatactttagctcaagtggcgctgcc  
catctgggcccactgagttggatgtggttagcttcggatgagaacagacgagcggatttcta  
cgagcacgctgacagtcctgtacggccatcatgccgtggagggcatcctgagtgggg  
cttctgggacaaggcccactggcgtgggtgcccagagctgctctgttgtcggagacaacct  
gcagctgacggcggccggacgtcgcgtgctggagctctttgagcacaggtggatgacaga  
cgagacgcacaacctggcagcgggacccagttcacagtacgcggttccatggcgacta  
cgaggtgcaagtcctcgtccagggccaagagcacaccaacctgaggcagacgctctcgtt  
ggc**caacggtccccacacgctcaacattaacattagctagagcgacactcagagggcaat** 11R, EGXR  
**aaagttgaatgatgacacaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa** 10R

**Pomacea 1277**

ttgtcga**cgacgcttcagtcaagcgcatgcccgcgggtgctgctgctgctgatgtgagca** EGX-F  
gdcagatcgacagactgagaagaagcaacatagtggttcacgtgacagctggtggttaaca 11F  
tcagccacgggtgaagtaaacatacgggtggtacaaaagaagaagtcgttcccgttcggaa  
ccgctgtggccgctgggctacaacaatgattccaagacaaaaataccgggatttcatcc  
accagcactacaactgggcccgtgcccagaaaacgaactcaagtggcgcaccatcgaaccta  
ccaggggacataagaactatcagcctgcccctgacctgattcagggactgaaaagtcacg  
ggattaagggtgagaggtcacaacctgggtggtctgtcaattcaacgggtgcagagctggg  
tcaagctctgcatggggatgagctgcgaaagggtgtccatgaccacattgtggaaccg  
tcaacacatttaagggttagtgagcactgggacgtgaacaacgagaacctgcatggcc  
agtggtaccagcaacaactgaatgacccgaactacaacatagaactggtcccgt**atcgcaac** 04F  
**acgctgcccgaacccc**aacgtcaaactcttctcctcaacgactacaacgtggtggcttacgggtg 01R  
ccgcaaccaatgcctatcttcagcaaggccaacagtttaaggccgctaattgtgagctctt  
acggtttgggtgcccagtgccactttggcgatgaagctaaccxaaacgtcgcctgggatga  
agcaacatctggatattttagctcaagtgggggtgcccactctgggcccactgagttggatg  
tgttagctacggacgagaacaaacgagcggacttctacgagcacgcgctgacagccctgt  
acagccatcatgccgtggagggcatcctgatgtggggcttctgggacaaggcccactggc  
ggcatgaacgagctgctcttctgtcggagacaacctgcagctgacggcggccggacgtc  
gctgctggagctctatgagcacaggtggatgacagacgagacgcacaacctggcagcgg  
gca**cccagttcacagtacgcggttccatggcgactacgaggtgcacgtgatctaccaag**  
gtcaggagcgcaccaacctgaagcagacggttcacgttgggcaacgcagcccaaccgctca  
aca**ccaacattagctagagcgacactcagagggcaataaagtgaat**gatgacacaacaa EGXR  
**aaaaaaaaaaaaaaaa** 10R

Pomacea 4512

cgacgcttcagtcgaagcgcacatgcccggggtgctgctgctgctgatgtgagcagcgagat EGX-F  
cgacagactgagaagaagcaacatagtggttcagtgctgctgcttcaatatatacaa 11F  
cctcacttagttctgcattgataaaatatctcgtcagtagtgaccaattctgtgtgat  
caataaagtaacactgttggtataaccatttttaaaattaaagcgaatttaactgactatt  
acaatattgtatgtaatcatatataaattcattatTTTTTTattaataatTTTataatTTT  
aacataaatggatagtatattaataacaatcttatttcacggcttatttcaagtttgac  
gatgttctttaatcaagaacttaaatatTTTTTcaaatcagaatggtgctgctgataaaag  
cgttttcagcctgtcattggatggtactactagacaaacacaataacatcttcaccttc  
gttaaatgtgtaaaatctgacctgaaatccattcacgacctgctgattttgttttcagc  
gtgacagctggtggttaacatcagccacgggtgaagtaaacatacgggtaagtcatagttga  
tatcatcatccgctgaggacagagtacaacaaactaaagagctactttaccgcaagctc  
cacctgggtgtcacccccgatttgccttcggttatggcttagtagttatttgaatattctt  
tgtcactttgtcactagagacatctgtagcgcacaagaccaaattcagcactactcttatg  
ttgaaacataatcatttcaattctaatacatgtgtaaaactgtgttgtagggcacatttga  
ccacgtgaacagtttagtagagaagagatacacaaaataaaagatacagtagaagatttgg  
ggttaataattaattttaataacttattttataatttttaataattaatgtataaaaatcacc  
agactaagtctttgttcttcaagctaactgtcgttgattacaggtggtacaaaagaagaa  
gtcgttcccgttcggaaccgtgtggtccgctggcctacaacaatgattccaagacaaa  
ataccgggatttcatccaccagcactacaactgggctggtccagaaaacgaactcaagtg  
gctcaccatcgaacctaccaggtacactttttattaatatgatttataatTTTtaacata  
aattgatagcataatgataacaatcttatttcaactgtttacttccagtttgcacatgatg  
cttcaatcaagaacttaaatatTTTTTcaatgctgaatggtgctgctgacataaaaatcgtgtg  
cagccgtctttgtatggtactactaaagaaatacattaacatacattgaaatgatgttta  
aggggtcttgatgtttgcatgttgcaggtaatatagttttaaagggtacagattaatTTT  
attaagactatactaaaaactgggtagtttctgctagccaagaaatggggttttggggg  
catttgataatcgcacgtgtgtcttcttctgtaataaaataaacaagtaaaaattctgga  
gaaaataacttttgatgcaactcgacattgaggcttccgttatgatcgccatttaatgctt  
acctctctcttgggtcacatcactccacaaatagaggaggaaaatataacagttgatgtg  
ggttttcaggacataagaactatcagcctgccctgacctgattcacggactgaaaagt  
cacgggttagtaaacattaagatttagcaaccacatcaccgacattataatcatcctct  
tcgacttcattattgtatgataatgaaagaattggtgaatTTTtagttataaaacatttat  
taaataaagagagtttagcgttccagagattgctcctccccatgtattttactatTTT  
tcgtacttcgttaaaagcaagtcgcagactcagttctgactttttgataattccttaaag  
tagtcctacaaatgaaatagtaactgcaaatgtctcactgatacgaatgaagaaaat  
attcgcttacactaagagtcagcacatgtcgtgtacagaggtgtttgtagagatgtttgt  
tatagttttcttgcatcactcgagatgtttaaaataggattaaggtgagaggtcacaac  
ctggtgtggtctgtcaattcaacgggtgcagagctgggtcaaagctctgcatggggatgag  
ctgcaaaagggtgtccatgaccacattgtggaaaccgtcaacacatttaagggttgtaa  
gtttatttcatTTTatttctttctaaaatgtcagtagttatttgtttatgTTTTgtattg  
ttgogttatgtggagaaacaaaatttactattctacatacaccacacagatgataccag  
ttacaatactgaatTTTatgttgtaaaaatagtttgaaccttttagcaatagactgcc  
ctaataaagaagtcacgttgtgaagtgttagtttttaactcattcatcaacacatcaag  
taagagtgtttctgttttgaccagagtgagcactgggacgtgaacaacgagaacctgc  
atggccagtggtaccagcaacaactgaatgacccgaactacaacatagaactgttccgta 04F  
tcgcacacgctgccgacccaacgtcaaacctcttctcaacgactacaacgtgggtgctt 01R  
acggtgccgcaaccaatgtcagtggtgagaaaacttgcttctatatcactgagaacaa  
atgttccaagcatagtatgcttcatTTTctgcataaaatatactctgttgtcttttagca  
ttatagtcttctgtgccttgctatgttcccgaacaatgcaactgtactgctccatacta

gtctgtagtctttgtttaatctgtaaaaacgaatatcatcttcacacagtctttatggt  
gtgtgacaggcctatcttcagcaaggccaacagtttaaggccgctaagtgtgagctttac  
ggtttgggtgcccagtgccactttggcgatgaagctaaccacacgctcgctgggatgaag  
gtaagaaaaataatatacacaacatccttcgcctttctcattttccttctcctattatta  
ttattctaaaaaatgaaacaaatgtacgcacaacaatgaagtagttctacaatacagtaa  
gataaaagatttttagattttgtctgtatcattttttcttttttagttatctgcattttta  
ccattttactttacatggaataacatatcttta gttgagaaatcagaagctcttcattt  
tatagctgtggatttaaaaaatattcttctcacttcttctatactccataagctgttta  
gtgacatctgggttttttctaactcagcaacatctggatatttttagctcaagtgggggt  
gccatctgggccaactgagttggatgtgttagctacggacgagaacaaacgagcggactt  
ctacgagcagcgctgacagccctgtacagccatcatgccgtggagggcatcctgatgtg  
gggcttctgggacaaggcccactggcgcatgaacgagctgctcttcttctgtagagaca  
cctgcaggtgtgttgggttacaattaaccaaataaggatcttacaggcattatagcacag  
ccagtatccagacagacgttttgtaatcactgtcatgatgagaacacattggattcttct  
tctattagaatttctaccagaactatccttgacttcaacattttttttctataagaga  
aatccgacaaatgcttactgagtgacctatggttaytccaaattatgcgggcatgcttt  
ttccattctagaattacttttagcacaatacagaccaaatagattaccatctaagtctca  
acattagtttttacatttttcatcaacgcttaaacactttaaaagacttttaaatgtgaag  
aatcaagcttttcacagcgataaggattcttttagatgtaaccagctggtaagtaaaac  
agcttaaaatactattggtagaggcaaaggagttagatgttgaaggaacattgtctta  
cataaggaatgcttcattcaagtaacttctgatagtgatgcaaacacatttcattaat  
aaataaaaaataagatatgagaattgttactaaaatagtctgttttagtctccatgatta  
ataaaatgtttgcttcgttaaaagttcatgaaacaccgggtgtttgtgtagacataaaat  
aaacggttgattgtatagctgacggcgccggacgctcgcgtgctggagctctatgagcac  
aggtggatgacagacgagacgcacaacctggcagcgggacccagctcacagtacgcgt  
ttccatggcactacgaggtgcacgtgatctaccaaggctcaggagcgcaccaacctgaag  
cagacgttcacgttgggcaacgcagcccaaccgtcaacatcaacattagctagagcgcac  
actcagaggga

EGXR

**Pomacea 4937**

cgacgcttcagtcgaagcgcagcccgctgggtgctgctgggtgctggggtgaccagcgcacat  
cgacagactgagaagaagcgacataacggttcagtgctgctgctttcaatatatacaa  
cctcacttagttctgcattgataaaatatctcgtcagtagtgtaaccaattctgtgtgtat  
caagaaagtaacaccggtgttataccatttttaaaagtaagcgaatttaactctggaatag  
tacaatacttgtagtaatgcatatataattcatgattttggtagtaataataagataa  
ttgtaacataaacggatagaatattaataacaatcttatgtcacgggtcatttcaagtt  
gcacgatatcctggaatcaagaaccgaaatagtaattaaggccgaacgcttgcggcgtaga  
aaatcgtgtgcagcccgtcatgggatgttaataactaaagaaacacaataacatccggcag  
ccgtcgtcaagtggtgtaaaatctgacctgaaatccattcacgaagttgatgatttcttat  
atcagcgtgaatgttgggtgtaacatcaaccacggtcaagtgagcattcgtgtaagtcac  
agatgagagcatcatccgctgaggacagggggcaataaaaagagcaagctcatcaaagg  
tgtcaacctcgagaatgtgccttaagtaaaacttgattgagaggtacagttgaccacgtga  
acagataggagagaagagagacaaaaatgaaggatacaatagaagatgtaggaataata  
ttaattttaatacttattttatattttaatgttaatgtataaaagccaccagactaaat  
ctttgttcttcaaggtaactgtcgttgattacaggtgttacaaaagaaaaggcattccc  
gttcgggacatgtgtggccgctgggcttacaacgatgggtccaaaggagcataaccggga  
ttcatccaccagcactacaactgggcccgtgccagaaaactcactcaagtgggctagcàt  
cgaacctaacagggtagattttttattaatgagattataaatttaacataaattgatag

EGX-F  
11F

tatattaataaaaaatcttctttaacggtttacttccagtttgacgatagtcctttaatca  
agaactgaaatatttttcaatactgaatggtgctgcgcataaaaatcgtttgacgcctgtc  
atgtgatgttactactaaagaaatacaataacataatgaaatgatgtttaaggggtct  
cttgatttatactctgttcagggagagaatagtttaaaggtactccattcacagcaagga  
aagacaaagttaccggtgtcatattcatagttttactttctaaatcggtgtgtgtgtg  
tatataatattatgtctgagcgcgttgaaatgcttaagtcgacaacttaatgtaacagat  
tagttttattaagagtatactaaaaactgggtgttctctgctagccaagaaatgggggt  
ttgggggtatttgataatcgacgtgtgtcttctctgtgaataaaataacaagtaaaaa  
ttctggagggaacatacttttgaggcactcgacattgaggcttccgttatgatcgccatt  
taatgcttgcctctctcttgacatatagaaggggaaaatataatgactgttgattgtg  
tttttcagggacaaaagaattatcagcctggcctaaacatgcttcacggactgagaaatc  
adgggttagtaaacattaggatactgcaacccccatcacggacattataatcatcatcgt  
cgacttcattatcgtataataatgaaagaattggcgaattttaattatthaagaattatt  
aacataaaatthaattaacatttaataaatcaaagaaagtttagcgttccagagattgtc  
ctccccatgtattttactatttctatcacttctgttaaagcaagtctcagactcagttc  
tgtcttttgataattccttaaaatagtcctacaaatgaaatagtaactgaaatgtctca  
cattgatacgaatthaagaaaatattcacttacactaagagttaacacatgtcgtgtaca  
gaggtgtttagtaaaatgtttgttatagttttcttgcatccactcgagatgtttaaaca  
ggattaaggtgagaggtcacacactgggtgtgggtctgtcgacaatacgggtgcagaactgg  
tgaaggtctgcatggggatgagctgcgaaaggtgtccatgaccacatcgtggaaacca  
tcaacacattthaagggcctgtaagtttatatcattgttactttctttctaaaatgtcag  
tagtttattttttattttttatcttgttattttggagaacaaaatthactgttctacata  
capcaaacagatgataccagttacaatactgaattttatgtttgtaaaaatagtttgaa  
ccttatagcaatagactgccactaattthaagaagtcacgttgtcaagtgttagttttaa  
ctcactcatcaacagatcaagcaagaggtttttctgttttgaccagagtgggagcactgg  
gatgtgaacaacgagaacctgcatggccagtggtaccagcatcaactgaaatgacaatggc  
tacaacctggaactgttccgtatcgacacagccgcgacccccaacgtcaaactcttctc  
aacgactacaacgttgtgtccaacagttattcaacaaacgtgagtgaaatgagaaaacttg  
cttctacatcacctgagaacaaatgtttgcaagcatcgtatgctttatttctgcctaaaa  
tactactctgttgtcttttagcattatagctctctgtgccttgctatgttgccgaacaatg  
caactgtactgctccatactagtctgtagtgtctatttttttatctgtaaaaacgaat  
atcatcttcacaagctcttgcggtgtgtgacaggactatcttcgacaaggtcaacagttt  
aaggccgctaagtgtgggtctttacggttgggtgtcaatgccacttggcgacgaagcc  
gaccagaaaccggtaactaaggttaagaaaaataataaacaatccttcgcctttctcatt  
cccattttattattttctaaaaataaaaacaaaggtacgcacaacaatgaattagttc  
tacaatgcagtaagatacaagatttcagcttctgtccgtatcctttttctatttagtta  
tttgcattttttactattttgttaatttacgttaaattggaataacatatctttatgt  
tgagaaatcaaaaagtcttcattttatagctgtggatgtaaaaaatactcatctaacgtc  
ttctatactccaaaagctgttttagctacatgtgggtttttttctaatctcagcaacgtc  
tggatactttagctcaagtgggctgcccactctgggcccactgagttggatgtggtagctt  
cggatgagaacagacgagcggatttctacgagcacgcgctgacagtcctgtacggccatc  
atgccgtggagggcatcctgatgtggggcttctgggacaaggcccactggcgtggtgcca  
gagctgctctgttgtcggagacaacctgcaggtgtgttgggttacaattaacctaatgg  
gaaatcttacaggtattatagcacagccagcatccagacagacatttaggaatcactgtca  
tgatgagaacacattggattcttcttttattagaatttctaccagaactacccttgact  
tcaactttttcttttcttataagagacatctgacaaatgcttactcagtgacctatgg  
ttagtccagattatgctgtatgtttttccatttttagaattacttttagcacaacacgcac  
caaaacgattaccatctatgtgaggacaaagatacgtgttctgcttgtttataatgaaat  
atattgttatgataaaaactgcaaaaactcagtttgaagtagacattttttccatgaaaa

04F, 03R  
01R

ttcgcaaaaaaagaaagaccggaaatgaaccatttgaacgagtttaaaaaattgttta  
cagcaaagtcctttatctctgctataaatgtggtgaaggtaaattgtatattcacatcagt  
attatttgactgagaatgttttcggctgttttcttcatatataatcaaaagtatcacaat  
gttcattgaagaaacgaggacacctgggtgtagccaacgacattgtttgacattaatgca  
aataataacgtgttacaacaatctaagcgggtactttgacagaagtgtaaaaattaatatt  
gagacttcatcaacgcttaaacaattccaagactttaaaattgcaagaatcaagcttgcg  
cgctttttttcacatcgataaggatgatgttataatgtaaccagctggtaaagtgaaca  
ctgtttaaattactattgggtgcggcagaagagttagacggtgtaaaggacattgtctt  
acttaaggattgcttcattcgaaatacttctgatagtgatgcaaacgcacattccatc  
aataataaaagtataagatatgagaattggtactgaaatagtctgttttagtctccatg  
attagccaaatgattgctttcgttaaagttcatgaaacaccgggtgtttgtggtagacat  
aaataaatgtttgattctatagctgacggcggccggacgtcgcggtgctggagctctttg  
agcacaggtggatgacagacgagacgcacaacctggcagcgggcacccagttcacagtac  
gcggtttccatggcgactacgaggtgcaagtcacgtccaggggtcaagagcacaccaacc  
tgaggcagacgttctcgttgggcaacggtccccacacggtcaacattaacattagctaga **11R**  
**gcgacactcagagggca** **EGX-R**

