

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TIM PASCASARJANA**

Melec
KK
LP.27/19
Berk
P



**PUSTAKA METAGENOMIK KELENJAR DIGESTIF SIPUT:
RESERVOIR BAGI KLONING GEN UNTUK OVER-PRODUKSI
KONSORSIA HIDROLASE KANDIDAT ANTIBIOFILM**

Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun

TIM PENGUSUL:

**Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S. 0010145603
Dr. Sri Sumarsih, M.Si. 0001106010**

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**


HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pustaka Metagenomik Kelenjar Digestif Siput: Reservoir
Bagi Kloning Gen Untuk Over - Produksi Konsorsia
Hidrolase Kandidat Antibiofilm

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Dra AFAF BAKTIR, M.S
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0014105603
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 085731084324
Alamat surel (e-mail) : afafe2001@yahoo.com


Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Dra SRI SUMARSIH M.Si
NIDN : 0001106010
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 110,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 565,000,000

Mengetahui,
Dekan

(Win Darmanto, Ph.D.)
NIP/NIK 196106161987011001

Kota Surabaya, 15 - 11 - 2018
Ketua,


(Dr. Dra AFAF BAKTIR, M.S)
NIP/NIK 195610141983032001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

(Prof. H. Ferry Purnobasuki, Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

Keoptimalan terapi infeksi yang berkaitan dengan biofilm mono- maupun polimikroba, misal pada kandidiasis intestinal, vaginal maupun pada implant dan infeksi peritonitis, ditentukan oleh keberhasilan melakukan eradikasi polimer matriks ekstra sel (EPS/extracellular polymeric substances) yang menyelimuti sel-sel polimikroba yang tertanam (*embedded*) dalam struktur biofilmnya. Pada penelitian sebelumnya biofilm *Candida albicans* berhasil dieradikasi secara *in vitro* dan *in vivo* menggunakan biomaterial novel/baru yang sedang dalam proses pengajuan HKI (ekstrak konsorsia hidrolase dari siput *Achatina fulica* dan bahan nutrasetikal ligan Bgl2), yang efeknya ditunjukkan dengan peningkatan aktivitas fluconazole sebanyak 68% pada dosis belum dioptimasi (Baktir *et al.*, 2013).

Konsorsia enzim hidrolase dari kelenjar digestif *A. fulica* efektif menghidrolisis polimer matriks ekstraseluler pada biofilm jamur, khususnya *Candida albicans*. Polimer matriks ekstraseluler pada biofilm *Candida* dan biofilm mikroorganisme lain menghalangi penetrasi obat-obatan anti jamur dan antibiotika, sehingga obat tidak dapat mencapai sasaran kerja dan tidak bekerja dengan baik, yang berakibat resistensi maupun resistensi ganda obat (*multi drug resistance*). Konsorsia enzim hidrolase dari *A. fulica* telah dibuktikan dapat menghidrolisis makromolekul penyusun biofilm *Candida albicans* secara *in vitro* dan *in vivo*, serta menjadi kandidat obat antibiofilm untuk mengeradikasi biofilm *Candida* untuk semua tipe patologi kandidiasis (Baktir, 2016). Berdasarkan ragam aktivitas enzim hidrolase yang telah dilaporkan (Baktir, *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2012), enzim ini juga berpotensi menghidrolisis polimer matriks ekstraseluler maupun dinding sel mikroorganisme, baik bakteri maupun fungi.

Pada penelitian tahun pertama telah dikonstruksi pustaka ekspresi metagenomik cDNA dari sampel kelenjar digestif *A. fulica*. Skrining pustaka metagenomik cDNA kelenjar digestif siput *A. fulica* menggunakan substrat laminarin menunjukkan banyak plak dengan aktivitas beta 1,3-glukanase (halo di sekitar). Penelitian tahun kedua bertujuan untuk mendapatkan klon gen novel (baru) dan uji ekspresi beberapa enzim beta-1,3-glukanase eukaryotik yang berguna untuk mengoptimalkan terapi berbagai infeksi dengan antifungi maupun antibiotika. Klon yang didapat dari pustaka ekspresi metagenomik dikarakterisasi. Urutan fragmen DNA yang didapat dari salah satu plak dengan aktivitas β -1,3- glukanase merupakan gen novel, diberi nama *MKAFGlul*, dengan homologi berkisar 40% terhadap gen-gen β -glukanase lain yang sudah dilaporkan. Sekuen *MKAFGlul* telah mendapat paten dari GeneBank dengan kode akses No. MH206587. Gen penyandi β -glukanase metagenomik *MKAFGlul* dapat diekspresikan dan menghasilkan aktivitas hidrolisis terhadap substrat laminarin. Hasil karakterisasi menunjukkan enzim β -glukanase metagenomik *MKAFGlul* memiliki BM sekitar 27,82 kDa, pH dan suhu optimum masing-masing 7 dan 40°C.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah mengaruniai kesehatan dan memberi kemudahan sehingga penelitian dengan judul,

**“PUSTAKA METAGENOMIK KELENJAR DIGESTIF SIPUT:
RESERVOIR BAGI KLONING GEN UNTUK OVER-PRODUKSI
KONSORSIA HIDROLASE KANDIDAT ANTIBIOFILM”**

dapat dilaksanakan dan memberikan hasil baik walaupun pelaksanaan belum selesai.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dirjen RISTEK dan DIKTI yang telah memberi dana bagi penelitian ini.
2. Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat yang telah mempercayai kami untuk melakukan penelitian ini.
3. Dekan FST dan Ketua Departemen yang mendukung penelitian ini.
4. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

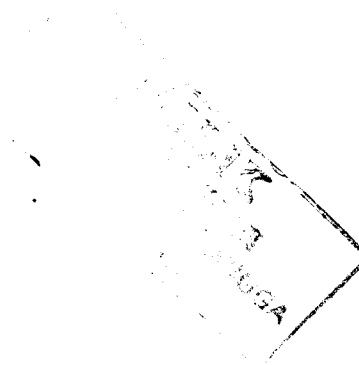
Semoga dukungan semua pihak pada penelitian ini menjadi amal ibadah yang tak akan putus, aamiin.

Surabaya, Nopember 2018

Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	1
HALAMAN PENGESAHAN	2
RINGKASAN	3
PRAKATA	4
DAFTAR ISI	5
DAFTAR LAMPIRAN	6
BAB I. PENDAHULUAN	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	15
BAB IV. METODE PENELITIAN	16
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	25
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	44
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN (BUKTI LUARAN YANG DIDAPATKAN)	47



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Publikasi artikel pada jurnal ilmiah terindex Scopus**
- Lampiran 2. Keynote speaker pada seminar internasional**
- Lampiran 3. Pemakalah pada Seminar Nasional**
- Lampiran 4. Paten gen 1,3- β -glucanase *A. fulica* pada Gene Bank dengan nama *MKAFGlu1* dan kode akses MH206587**

BAB I PENDAHULUAN



Latar Belakang

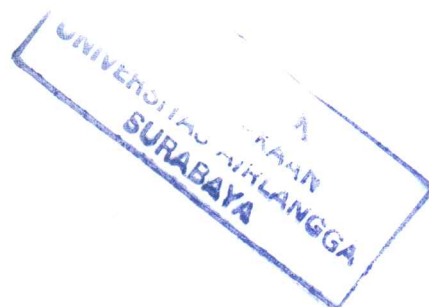
Siput *Achatina fulica* merupakan salah satu spesies molusca. Sistem digestifnya mampu menghancurkan sumber makanan dari tanaman lunak maupun keras. Enzim-enzim hidrolase yang terdapat di saluran digestif *A. fulica* dapat menghidrolisis makromolekul kompleks seperti berbagai jenis alpha- maupun beta-glukan, lignin, kitin, manoprotein menjadi molekul monomer sederhana. Terdapat banyak aktivitas enzim hydrolase dalam kelenjar digestif *A. fulica*, antara lain β -1,3-glukanase, β -1,6-glukanase, β -1,4-glukanhidrolase, endo β -1,4-glukanase, kitinase, xilase, selulase, lichenase, inulase, hemiselulase, amilase, maltase dan sukrase (Hanum dkk., 2013). Analisis metagenomik kelenjar digestif *Achatina fulica* melalui pendekatan berbasis DNA sequence menunjukkan keanekaragaman spesies mikrobiota, dengan filum bakteri dominan Prcteobacteria, Bacteriodetes dan Firmicutes, serta ditemukan pula keberadaan virus, fungi dan archaea (Cardoso et al., 2012). Juga dilaporkan aktivitas berbagai enzim glikosida hidrolase dari kelenjar digestifnya (Cardoso et al., 2012; Pawar et al., 2012).

Enzim-enzim hidrolase yang terdapat di saluran digestif *A. fulica* telah dibuktikan dapat menghidrolisis makromolekul penyusun biofilm *C. albicans*. Konsorsia enzim ini juga berpeluang untuk mengeradikasi biofilm mikroorganisme lain maupun mix biofilm, karena bermacam-macam makromolekul kompleks seperti berbagai jenis alpha- maupun beta-glukan, lignin, kitin, manoprotein dapat dihidrolisis menjadi molekul monomer sederhana.

Terdapat banyak aktivitas enzim hydrolase dalam kelenjar digestif *A. fulica*, antara lain β -1,3-glukanase, β -1,6-glukanase, β -1,4-glukanhidrolase, endo β -1,4-glukanase, kitinase, xilase, selulase, lichenase, inulase, hemiselulase, amilase, maltase dan sukrase (Hanum dkk., 2013). Enzim-enzim ini perlu diproduksi secara besar-besaran untuk dimanfaatkan sebagai antibiofilm, terutama biofilm polimikroba yang menjadi persoalan besar dalam terapi penyakit infeksi.

Sebagian besar enzim yang diaplikasikan di industri maupun di bidang kesehatan berasal dari mikroba yang dikultur (Houde et al., 2004). Eksplorasi enzim dengan metode

kultur di laboratorium sukar mendapatkan seluruh varian enzim yang memberikan ragam aktivitas hidrolase yang luar biasa pada kelenjar pencernaan *A. fulica*. Lebih dari 99% mikroorganisme tidak dapat dikultur di laboratorium (Handelsman et al., 1998) akibat kondisi pertumbuhannya belum diketahui atau pertumbuhannya memerlukan konsorsia mikroba dalam bentuk mikroekosistem. Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, maka digunakan strategi pustaka metagenomik (Lämmle et al., 2007; Liaw et al., 2010; Steele et al., 2009). Pendekatan secara metagenomik merupakan aplikasi dari genomik molekular untuk konsorsia mikroba yang tidak dapat dikultur. Pendekatan ini ampuh untuk mengeksplor enzim baru dari sampel dengan tingkat keragaman materi genetik yang tinggi (JunGang et al., 2010; Kakirde et al., 2010; Lämmle et al., 2007; Lorenz and Eck, 2005; Steele et al., 2009), sebagaimana pada kelenjar digestif siput *A. fulica*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Biofilm Polimikrobial

Model *in vivo* infeksi sistemik intra-peritoneal ko-inokulasi *C. albicans* dan salah satu bakteri (*S. aureus*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*) pada peritonitis eksperimental menunjukkan **efek sinergis** terhadap kematian tikus. Infeksi bakteri pada dosis sublethal satu spesies saja tidak mengakibatkan kematian, sedangkan ko-infeksi bakteri tersebut pada dosis yang sama dan *Candida* mengakibatkan mortalitas 100% (Carlson, E., 1982; Carlson, E., 1983; Klaerner *et al.*, 1997). Hal ini berkaitan dengan keberadaan wujud biofilm polimikroba, yang di dalamnya beberapa spesies hidup dalam bentuk konsorsia yang menginduksi virulensi. Fenomena ini juga menyulitkan manajemen terapi penyakit infeksi. Antimikroba yang diarahkan pada satu spesies dalam biofilm ini justru memfasilitasi pertumbuhan, infeksi sinambung dan virulensi organisme non-target (Lopes *et al.*, 2012).

Candida adalah patogen pada manusia dan hewan yang berkontribusi pada berjangkitnya penyakit infeksi polimikroba (Harriott and Noverr 2011). Hal ini berkaitan dengan kemampuan *Candida* spp. membentuk biofilm multi-spesies. Sebenarnya *Candida* spp, terutama *Candida albicans*, adalah mikroflora normal pada kulit manusia, namun akhir-akhir ini seringkali ditemui menjadi virulen dan pathogen di membran mukosa saluran pencernaan dan vagina. Mikroba ini memiliki kemampuan melekat pada berbagai posisi di inangnya, yang menyebabkan ragam penyakit pada individu *immunocompromised* maupun *immunocompetent*. *C. albicans* sigap membentuk biofilm pada jaringan mukosa serta peralatan medical yang tertanam dalam tubuh, yang berperan sebagai *infectious reservoir* yang sulit di-eradikasi. *Reservoir infectious* atau biofilm ini dapat berkembang menjadi infeksi sistemik yang mematikan inang.

Biofilm tersusun atas sel mikroorganisme yang tertanam dalam matriks polimer ekstrasel (EPS) yang dihasilkannya. Biofilm yang sudah berkembang sempurna tersusun berlapis-lapis termasuk di dalamnya sebuah matriks EPS dengan struktur vertical (Donlan, R.M., 2002). EPS adalah senyawa dengan berat molekul tinggi yang disekresi oleh mikroorganisme ke lingkungannya (Staudt *et al.*, 2004). EPS mempertahankan

fungsi dan integritas struktur biofilm. EPS merupakan komponen fundamental yang menentukan sifat fisikokimia biofilm (Flemming *et al.*, 2000). Kebanyakan EPS terdiri dari polisakarida (ekso-polisakarida) dan proteins, juga terdapat makromolekul lain seperti DNA, lipid dan senyawa humat. EPS diperlukan dalam pembentukan biofilm mikroorganisme untuk perlindungan sel maupun virulensinya, serta untuk perlekatan antar sel mikroorganisme dan perlekatan sel pada permukaan (Donlan RM, 2002; Donlan R.M. dan Costerton J.W., 2002).-Selain *Candida*, EPS dihasilkan oleh mikroorganisme patogen, antara lain galactoglucopolysaccharides (*Pseudomonas marginalis*, *Rhizobium spp.* and *Zooglea' spp.*), galactosaminogalactan (*Aspergillus spp.*), N-acetylglucosamine (*Staphylococcus epidermidis*), N-acetyl-heparosan (*Escherichia coli*), hyaluronic acid (*Streptococcus equi*).

Pendekatan Metagenomik

Metode eksplorasi mikroorganisme dari alam melalui kultur mikroorganisme di laboratorium mulai ditinggalkan sejak munculnya teknik untuk mengekstrak DNA langsung dari sampel lingkungan, seperti tanah dan air laut. Cara konvensional tersebut banyak ditinggalkan setelah terungkap bahwa spesies bakteri asal lingkungan yang bisa dikultur sangat sedikit, hanya kurang dari 1% dari total spesies (Handelsman *et al.*, 1998). Oleh sebab itu, diperlukan metode yang tidak bergantung pada pertumbuhan bakteri di laboratorium pada penemuan gen baru untuk penelitian dasar dan terapan dengan menggunakan. Hal ini penting, mengingat diversitas gen yang tersedia di alam sangat tinggi sedangkan protein yang telah diperoleh dari mikroorganisme yang dapat dikulturkan relatif sedikit.

Pendekatan metagenomik merupakan aplikasi dari genomik molekular untuk konsorsia mikroba yang tidak dapat dikulturkan, guna menemukan enzim industri baru sebagaimana yang telah dikerjakan oleh Jun Gang *et al.* (2010), Kakirde *et al.* (2010), Lämmle *et al.* (2007), Lorenz and Eck (2005) dan Steele *et al.* (2009). Tujuan utama dari proyek metagenomik adalah untuk membangun sebuah pustaka DNA komprehensif dari semua mikroorganisme dari ekosistem atau lokasi tertentu. Klon metagenomik dapat diidentifikasi dengan berbagai cara. Salah satu strategi memerlukan sekuensing seluruh pustaka menggunakan strategi *shotgun sequencing* dengan tujuan perakitan urutan DNA

yang bersebelahan (*contigs*) dari sebanyak genom yang mungkin berbeda dan mengidentifikasi kedua *novel* dan urutan gen homolog.

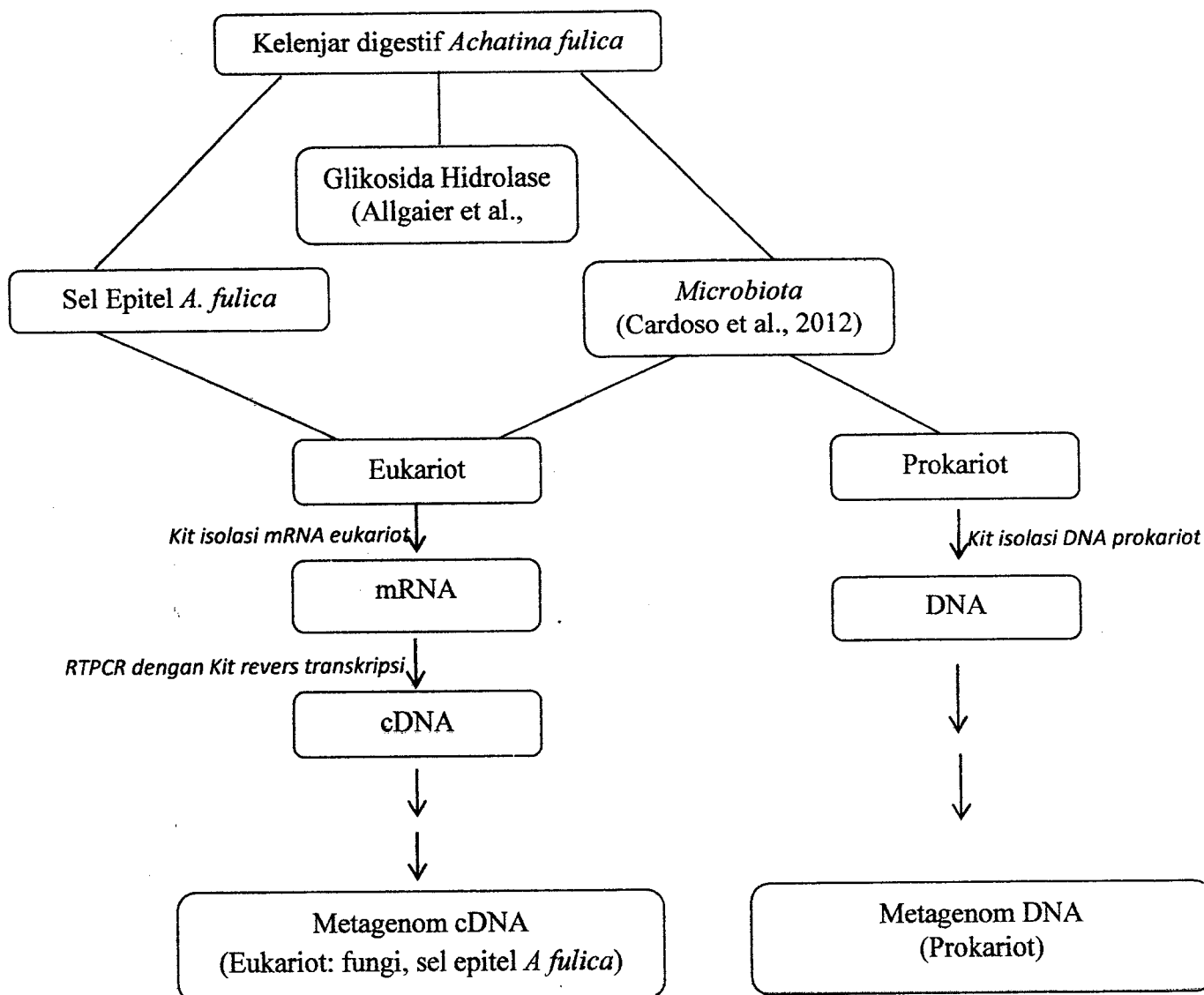
State of the art bidang yang diteliti

Lam:mea, K., *et al.* (2007) berhasil mengisolasi sejumlah besar gen novel (terbaru) yang mengkode enzim-enzim dengan fungsi berbeda melalui penapisan pustaka metagenomik berdasarkan aktivitas, yang dikonstruksi langsung dari DNA asal kompos. Analisis urutan nukleotida menunjukkan bahwa semua produk gen yang berhasil diidentifikasi adalah terbaru dan menunjukkan hubungan kekerabatan yang lemah dengan dua enzim yang telah dikenal; di samping itu, ada satu duplikat telah diidentifikasi.

Jenis sampel yang telah diaplikasikan sebagai sumber pustaka metagenomik meliputi sampel lingkungan seperti kotoran insekta, manusia dan tikus, lahan bekas tambang logam dan batu bara, air sungai dan danau, air laut, plankton arktik, spons laut, segala jenis tanah dan sedimen (Glick *et al.*, 2012). Berdasarkan laporan bahwa *A. fulica* menunjukkan keberadaan bakteri dan mikroorganisme lain dengan biodiversitas yang sangat tinggi dalam kelenjar digestifnya (Cardoso *et al.* 2012), maka pendekatan metagenomik sangat perlu diaplikasikan terhadap sampel non-lingkungan pada usulan penelitian ini, guna mengeksplor enzim-enzim hidrolase novel dari sampel kelenjar digestif *A. fulica*.

Aktivitas enzim hidrolase dalam kelenjar digestif *A. fulica* yang telah dilaporkan oleh Baktir, *et al.* (2012) dan enzim ini telah dibuktikan mampu menghidrolisis polimer matriks ekstraseluler maupun dinding sel *Candida*, dan berpeluang pula terhadap sel mikroorganisme lain, baik bakteri maupun fungi. Berdasarkan kebutuhan akan konsorsium hidrolase dari *A. fulica* sebagai kandidat antibiofilm yang dapat mengatasi virulensi mikroorganisme patogen dan resistensi terhadap antibiotika dan antifungi, maka mengeksplor gen penyandi enzim-enzim hidrolase novel (terbaru) menggunakan metagenomik sangat penting dilakukan.

Terobosan metagenomik untuk mendapatkan gen yang terkandung dalam sampel kelenjar digestif secara komprehensif adalah dengan memisahkan proses metagenomik prokariot (pustaka DNA) dan metagenomik eukariot (pustaka cDNA) seperti pada Gambar 1.

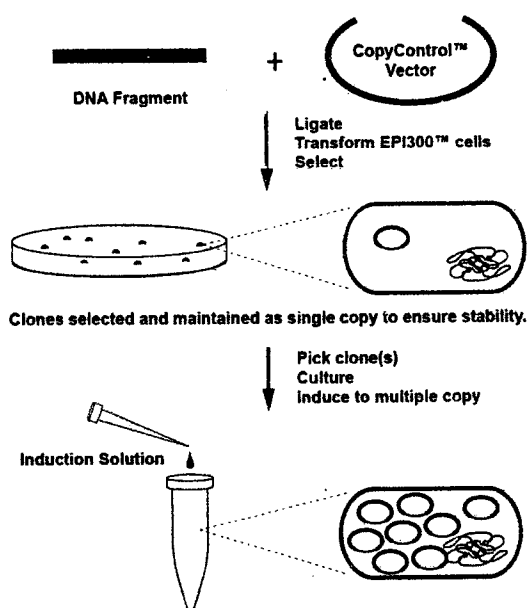


Gambar 1. Dasar pemilahan metagenom DNA dan cDNA dari kelenjar digestif *A. fulica*

Membangun pustaka DNA dan cDNA dari sampel melibatkan metode isolasi DNA dan mRNA yang berkualitas agar DNA dan mRNA diperoleh terbebas dari kontaminan yang dapat mengganggu proses enzimatik selanjutnya. Proses berikutnya fragmentasi DNA dengan enzim restriksi, penyisipan fragmen DNA ke dalam sistem vektor yang sesuai, dan transformasi vektor rekombinan dalam inang yang sesuai. Adapun mRNA, selanjutnya diproses reverse transkripsi untuk menghasilkan cDNA, yang kemudian difragmentasi dan dikonstruksi pustaka menggunakan vektor pCC1BAC™ CopyControl™.

Meskipun secara konseptual membangun pustaka metagenomik DNA dan cDNA ini sederhana, namun ukuran metagenomnya yang besar dan klon yang dihasilkan sangat banyak. Terobosan besar dalam metagenomik adalah konstruksi pustaka DNA dan cDNA dari sampel kelenjar digestif *A. fulica* (Gambar 1) serta penapisan pustaka dengan pendekatan fungsional dan urutan nukleotida sebagaimana yang telah dilaporkan Daniel (2005).

Vektor pCC1BAC™ CopyControl™ merupakan teknologi inovasi yang mula-mula dikembangkan di laboratorium Waclaw Szybalski (Wild, J. et al., 2002), kemudian dioptimasi oleh Epicentre. Vektor tersebut memiliki 2 buah *origin of replication*, yaitu a single-copy *E. coli* F-factor replicon dan “*oriV*” (origin of replication kopi tinggi). Replikasi klon CopyControl dapat dikendalikan oleh replikon F-factor sehingga dalam setiap sel terdapat sebuah kopi vektor. Mempertahankan klon dalam kopi tunggal dapat menjamin stabilitas insert dan memungkinkan proses kloning gen dengan produk toksik tetap berlangsung (Gambar 2).

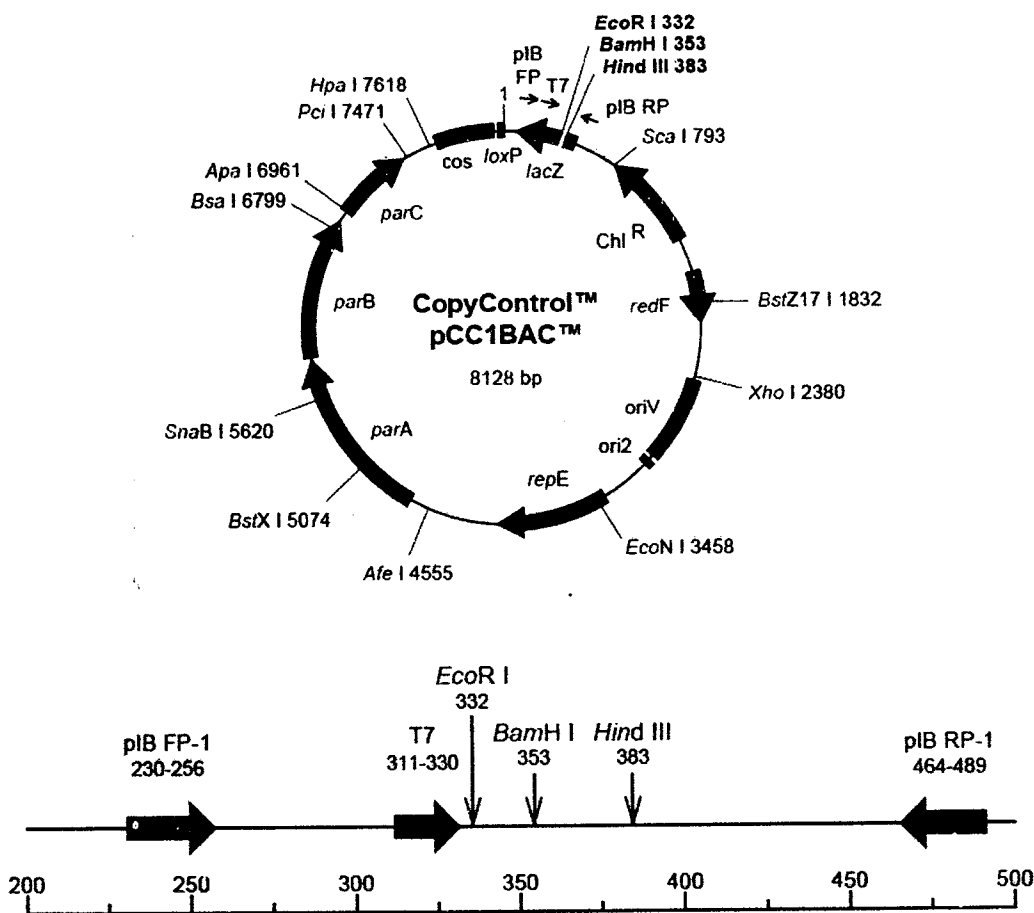


Gambar 2. Overview sistem CopyControl

Inisiasi replikasi dari *oriV* memerlukan produk gen *trfA*, yang disiapkan dari strain inang *E. coli* TransforMax™ EPI300™, yang mengandung mutan gen *trfA* dibawah kontrol

promoter kuat. Penambahan larutan induksi CopyControl ke dalam medium pertumbuhan akan menginduksi ekspresi *trfA* dan amplifikasi klon dengan jumlah kopi tinggi. Induksi klon BAC CopyControl dari kopi tunggal menjadi 10-20 kopi per sel akan meningkatkan perolehan dan kemurnian DNA BAC untuk kebutuhan sequencing, fingerprinting dan aplikasi lain.

Vektor pCC1BAC CopyControl adalah turunan pBeloBAC113 dan pIndigoBAC-5 Epicentre. Vector tersebut telah dibuat linier sisi rekognisi *BamH I*, *Hind III* atau *EcoR I*, defosforilasi, dan dimurnikan.



Gambar 2. Peta genetic vector pCC1BAC™

Chloramphenicol-resistance sebagai marker (antibiotic selectable marker); F factor berbasis *partitioning* dan sistem regulasi jumlah kopi tunggal dari *E. coli*; *oriV*= *origin of replication* kopi tinggi, Sisi pengikatan Primer untuk BAC-end sequencing; Sisi *Not* I yang dikelilingi dengan sisi kloning *Bam*H I, *Hind* III and *Eco*R I; Sisi P1 *loxP* Bacteriophage untuk pembelahan Cre-recombinase.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Umum

Mendapatkan klon gen penyandi enzim hidrolase novel dari seluruh komunitas mikroorganisme pencernaan siput maupun klon gen dari mRNA sel epitel siput, yang terdapat di pustaka metagenomik DNA dan cDNA. Klon gen novel ini menjadi temuan yang sangat berguna untuk dikarakterisasi lebih lanjut terkait kinerjanya yang luar biasa dalam melumat bahan makanan asal tanaman.

Metode metagenomik yang dipilih menghasilkan reservoir **hampir seluruh gen** (99%) dari komunitas mikroorganisme prokariota dan eukariota di saluran digestif siput, maupun gen yang berasal dari sel epitel kelenjar digestif siput. Sebagai pembandingan: metode konvensional dengan cara kultur hanya dapat mengeksplor < 1% dari semua spesies bakteri yang tersedia.

Tujuan Khusus

1. Skrining plak dengan aktivitas β -1,3- glukonase dari pustaka metagenomik cDNA kelenjar digestif siput *A. fulica*.
2. Seleksi dan karakterisasi klon gen eukariotik penghasil enzim β -1,3- glukonase.
3. Uji ekspresi klon gen eukariotik penghasil enzim β -1,3- glukonase

Manfaat Penelitian

1. Konsorsia enzim hidrolase rekombinan dengan aktivitas antibiofilm yang akan diproduksi sangat diperlukan sebagai agen yang membuka akses bagi obat antibiotika maupun antifungi untuk mencapai target kerja obat di membran, dinding maupun di dalam sel, agar infeksi dapat disembuhkan tuntas.
2. Enzim hidrolase rekombinan yang akan diproduksi juga sangat diperlukan untuk bidang selain kesehatan, antara lain enzim ini diperlukan untuk produksi:
 - i. bioenergy dari limbah jerami maupun limbah tanaman lain,
 - ii. pakan yang mudah diserap oleh system pencernaan hewan ternak,
 - iii. pupuk organik.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Sampel Penelitian

Pustaka ekspresi metagenomik saluran pencernaan dan digestive gland *A. fulica* (Kurniawaty, 2018).

4.1.2 Bahan dan peralatan

Strain bakteri yang digunakan yaitu *E. coli* BM 25.8 (TaKaRa, Clontech) untuk konversi plamid. Bahan untuk media meliputi bacto tryptone (himedia), bacto yeast extract (BD Bioscience), natrium klorida (himedia), bacto agar (BD bioscience), kanamisina (Meiji), kloramfenikol (Sanbe), laminarin (Sigma Aldrich), isopropyl-L-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG; TaKaRa, Clontech) dan congo red (Sigma Aldrich). Selain itu juga digunakan kit konstruksi pustaka cDNA SMART (Clontech), kit isolasi dan purifikasi plamid GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), PCR mastermix (Promega), gel-red (Biotium), agarosa dan buffer TAE 50x (Bio-Rad), alkohol 95% (One-med), alkohol 70% (One-med), loading-dye blue orange (Promega), marker lambda DNA/HindIII (Promega), TEMED (Sigma Aldrich), tris base (Bio-rad), akrilamid (Bio-rad), bis-akrilamid (Bio-rad), glisin (Bio-rad), amonium persulfat (Merck), SDS (Bio-rad), gliserol (Sigma Aldrich), coomassie brilliant blue G-250 (Sigma Aldrich), bromophenol blue (Sigma Aldrich).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain inkubator (Mempert), spektrofotometer UV-Vis (Pharmaspec UV-1800 Shimadzu), autoklaf (Tomy SX-700),

shaker (IKA KS-3000i control), sentrifus (Tomy Kitman-T24), laminar air flow (safe FAST top), dry block (BioTDB-100 Biosan), vortex (BioCote), hotplate (Boeco), termocycler (Biometra), gel dock (Biostep), electrophoresis chamber (MUPID-exu advance), inkubator (Mettler), kulkas (Dairei), freezer -80°C (Dairei), freezer -20°C (Dairei), timbangan analitik (Sartorius stedim), genetic analyzer (Applied Biosystem), mikropipet (Fischer scientific), tip mikropipet (Nesco Lab), tabung sentrifus 15 mL (NEST), tabung sentrifus 50 mL (IWAKI) dan peralatan gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium. Adapun program online dan perangkat lunak (software) yang digunakan untuk analisis homologi adalah BioEdit, Clone Manager 9 dan NCBI BLAST-N dan BLAST-P.4.2 Cara Kerja.

4.2. Prosedur

4.2.1 Pembuatan medium

Medium agar LB

Medium ini dibuat dari campuran 1% *Bacto tryptone*, 0,5% *Bacto yeast extract*, 1% natrium klorida lalu ditambahkan 1,5% *Bacto agar* dan dilarutkan dalam akuades, disterilkan dengan autoklaf, dituang dalam cawan petri sebanyak kurang lebih 10 mL per cawan petri.

Medium pertumbuhan *E. coli* BM 25.8

Medium rutin untuk *E. coli* BM 25.8 adalah medium agar LB dan ditambahkan kanamisin (Kan) 50 µg/mL dan kloramfenikol (Chl) 34 µg/mL.

Medium LB broth

Medium LB broth dibuat dari campuran 1% *Bacto tryptone*, 0,5% *Bacto yeast extract*, 1% natrium klorida dilarutkan dalam akuades lalu disterilkan dengan autoklaf.

4.2.2 Kultivasi *E. coli* BM 25.8

Regenerasi *E. coli* BM 25.8 dari larutan stok gliserol

Larutan stok gliserol bakteri *E. coli* BM 25.8 diambil sebanyak 5 μ L dengan mikropipet dan diletakkan di atas agar *plate* LB/Kan/Chl. Cairan tersebut kemudian disebar (spread) di atas medium padat tersebut secara aseptik dan diinkubasi dalam oven selama 24 jam pada suhu 37°C.

Inokulasi koloni tunggal *E. coli* BM 25.8

Koloni tunggal hasil regenerasi *E. coli* BM 25.8 pada media LB/Kan/Chl diambil secara aseptik dengan kawat ose dan dimasukkan dalam media LB *broth* sebanyak 10 mL. Media LB *broth* ini kemudian dikocok dengan *shaker* berkecepatan 150 rpm pada suhu 31°C selama 12-16 jam hingga OD-nya mencapai 1,2. Ditambahkan MgCl₂ sebanyak 100 μ L pada hasil inokulasi ini pada tahap konversi vektor.

4.2.3 Konversi fag λ TriplEx2 menjadi plasmid pTriplEx2

Plak λ TriplEx2 yang menunjukkan hasil positif aktivitas β -glukanase (menunjukkan *halo*) diambil dari pustaka ekspresi metagenomik sistem pencernaan *A. fulica*. Plak λ TriplEx2 diperoleh dari pemecahan koloni sel *E. coli* XL 1 Blue hidup karena aktivitas litik bakteriofag. Plak tersebut dilarutkan dalam 350 μ L 1x buffer pelarut λ TriplEx2. Larutan dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 200 μ L kultur (inokulan) sel *E. coli* BM 25.8 ditambahkan dalam tabung sentrifus 15 mL. Ditambahkan sebanyak 150 μ L plak λ TriplEx2 terlarut yang telah diinkubasi, kemudian campuran diinkubasi lagi pada suhu 31°C selama 30 menit. Ditambahkan sebanyak 400 μ L media LB *broth* dan diinkubasi lebih lanjut selama 1 jam pada suhu 31°C dengan pengocokan berkecepatan 225 rpm. Hasil kultur yang diperoleh diambil sebanyak 1-10 μ L dan disebar dalam media LB mengandung ampisilina konsentrasi 100 μ g/mL. Biakan padat *E. coli* BM 25.8 rekombinan yang diperoleh dari proses konversi fag λ TriplEx2 menjadi plasmid pTriplEx2 diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37°C.

4.2.4 Inokulasi koloni *E. coli* BM 25.8 rekombinan dalam media LB broth

Koloni tunggal dari biakan padat *E. coli* BM 25.8 rekombinan diambil secara aseptis menggunakan kawat ose kemudian dimasukkan ke dalam 10 mL media LB broth mengandung antibiotik ampisilina (100 µg/mL). Media LB broth yang telah diinokulasi dengan koloni tunggal kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan pengocokan berkecepatan 200-250 rpm selama 12-16 jam. Kultur bakteri dipanen dengan sentrifugasi berkecepatan 8000 rpm selama 2 menit pada temperatur ruang. Supernatan dipisahkan dengan dekantasi dan sisa medium diambil menggunakan mikropipet. Pelet sel digunakan dalam tahap isolasi plasmid pTriplEx2.

4.2.5 Isolasi plasmid pTriplEx2

Isolasi plasmid pTriplEx2 dilakukan menurut instruksi dari kit purifikasi plasmid GeneJET Plasmid Miniprep. Pelet sel yang diperoleh dari tahapan inokulasi diresuspensi menggunakan 250 µL *nuclease free water* dan dipindahkan pada tabung ependorf steril. Suspensi sel diberi buffer lisis sebanyak 250 µL dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung ependorf sebanyak 4-6 kali. Tahapan lisis sel ini dilakukan dengan cepat dalam waktu kurang dari 5 menit. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 350 µL larutan asam untuk netralisasi dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung ependorf sebanyak 4-6 kali. Pada tahapan ini larutan yang awalnya berwarna bening akan berubah menjadi suspensi keruh. Suspensi ini disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang diperoleh dari tahapan ini kemudian dipindahkan ke dalam minikolom, disentrifugasi kembali selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Filtrat yang keluar dari minikolom (*flowthrough*) dibuang dan kolom diletakkan kembali di atas tabung penampung. Larutan pencuci ditambahkan sebanyak 500 µL ke dalam minikolom, dilakukan sentrifugasi selama 30-60 detik kemudian supernatan dibuang. Tahapan pencucian kolom ini dilakukan sebanyak 2 kali. Minikolom diletakkan kembali di atas tabung penampung dan dilakukan sentrifugasi selama 1 menit untuk memisahkan sisa larutan pencuci. Elusi plasmid dilakukan dengan penambahan sebanyak 50 µL *nuclease free water* ke dalam minikolom (tepat di atas membran), inkubasi pada suhu ruang selama 2 menit, sentrifugasi dilakukan selama 2 menit pada kecepatan 12000 rpm setelah minikolom dipindahkan pada tabung ependorf penampung

yang baru. Konsentrasi plasmid hasil isolasi diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop. Dilakukan visualisasi plasmid pTriplEx2 menggunakan elektroforesis gel agarosa.

4.2.6 Verifikasi gen sisipan pada plasmid pTriplEx2

Keberadaan gen sisipan pada plasmid pTriplEx2 diverifikasi menggunakan PCR. Primer yang digunakan adalah primer universal SP6 (*forward*) dan T7 promoter (*reverse*) (1st BASE Laboratories). Adapun program yang digunakan dalam PCR adalah sebagai berikut:

Pra-denaturasi: 95 °C (2 menit)

Denaturasi: 95 °C (30 detik)

Annealing: optimasi 47,48,49,50 dan 51 °C (30 detik)

Ekstensi (pemanjangan): 72 °C (1 menit)

Ekstensi tahap akhir: 72 °C (5 menit)

Tahap denaturasi hingga ekstensi dilakukan sebanyak 35 siklus. Visualisasi gen sisipan dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa.

4.2.7 Elektroforesis gel agarosa

Gel agarosa untuk elektroforesis (1%) dibuat dengan menimbang sebanyak 0,4 g agarosa, kemudian dilarutkan dalam buffer TAE 1x. Campuran ini kemudian dipanaskan dengan *hotplate* atau *microwave* hingga agarosa benar-benar terlarut. Sebanyak 4 µL gel red ditambahkan dalam larutan gel agarosa tersebut ketika suhu larutan sekitar 50-60 °C. Larutan dituang ke dalam cetakan plastik dan diberi cetakan sumuran di atas gel yang belum memadat. Ketika gel agarosa telah memadat, gel dipindahkan ke dalam tangki elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan menambahkan 5 µl sampel isolat plasmid dengan 1 µl *loading dye* kemudian campuran ini dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa yang telah disiapkan dalam tangki elektroforesis kemudian direndam dalam buffer TAE 1x. Sumuran yang lain (di tepi) diberi sampel marker berupa Lambda/HindIII. Waktu running elektroforesis adalah 30 menit dengan voltase sebesar 100V. Hasil elektroforesis ditinjau menggunakan UV transluminator dan difoto.

4.2.8 Perunutan gen dan analisis bioinformatik

Perunutan gen β -glukanase dilakukan dengan prinsip perunutan Sanger menggunakan Applied Biosystem Genetic Analyzer dan *BigDye terminators* v1.1 dan v3.1 (Macrogen, Korea). Perunutan dilakukan secara bidireksional dan primer yang digunakan untuk perunutan adalah primer universal SP6 (*forward*) dan T7 promoter (*reverse*). Sekuens yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program BioEdit. *Multiple alignment* dan analisis kekerabatan enzim dilakukan dengan program Clone Manager 9 dan NCBI BLAST.

4.2.9 Uji ekspresi β -glukanase metagenomik

Pembuatan ekstrak kasar enzim yang mengandung β -glukanase untuk analisis SDS-PAGE dan *native*-PAGE

Ekstrak kasar enzim diperoleh dari lisis sel biakan bakteri *E. coli* BM 25.8 rekombinan yang telah diinduksi dengan IPTG. Koloni tunggal *E. coli* BM 25.8 rekombinan diambil secara aseptis dan dimasukkan dalam media cair LB. Media cair LB dikocok dengan kecepatan 200 rpm dalam temperatur 31°C selama 12-16 jam. Sebanyak 0,1% (w/v) IPTG ditambahkan dalam biakan tersebut setelah pengocokan selama 12-16 jam dan dilakukan pengocokan kembali selama 4 jam untuk menginduksi produksi enzim. Biakan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus steril. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Pelet sel dan supernatan dipisahkan dengan dekantasi. Resuspensi pada pelet sel dilakukan dengan penambahan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak 1/10 dari volume awal biakan (pemekatan 10x). Sel dilisis dengan sonikasi selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim β -glukanase yang digunakan dalam uji aktivitas β -glukanase secara kualitatif (*halo*) dan kuantitatif (penentuan kondisi optimum ekstrak kasar enzim β -glukanase), analisis SDS-PAGE dan *native*-PAGE.

Uji aktivitas β -glukanase secara kualitatif terhadap sel *E. coli* BM 25.8 rekombinan

Koloni tunggal yang mengandung gen sisipan β -glukanase diambil dengan kawat ose steril dan digores pada medium agar LB mengandung 0,3% (w/v) laminarin dan 0,1% (w/v) IPTG. Cawan diinkubasi dalam pada 37°C semalam, kemudian diamati

pembentukan *halo* (zona bening) di sekitar koloni. Kontrol yang digunakan adalah koloni *E. coli* BM 25.8 yang mengandung gen sisipan kontrol dari kit *Library Construction*.

Uji aktivitas β -glukanase secara kualitatif terhadap ekstrak kasar enzim

Uji aktivitas β -glukanase yang kedua dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim β -glukanase. Agar LB yang mengandung 0,3% (w/v) laminarin dan 0,1% (w/v) IPTG dilubangi untuk membentuk sumuran yang akan diisi sampel uji. Sebanyak 20 μ L sampel uji berupa ekstrak kasar enzim β -glukanase dimasukkan dalam sumuran. Cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam dan diamati pembentukan *halo* di sekitar koloni. Kontrol yang digunakan adalah ekstrak kasar enzim dari pemecahan sel koloni *E. coli* BM 25.8 yang mengandung gen sisipan kontrol dari kit *Library Construction*.

Penentuan temperatur optimum ekstrak kasar enzim β -glukanase

Temperatur optimum ditentukan dengan menguji aktivitas enzim β -glukanase terhadap substrat laminarin 0,1% dengan metode DNS. Sebanyak 10 μ L ekstrak kasar enzim β -glukanase ditambahkan dengan 100 μ L laminarin 0,1% kemudian diinkubasi pada temperatur 31, 37, 40, 45, 55 dan 60 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan DNS hingga larutan mencapai 1 mL, lalu tabung ependorf direndam dalam air mendidih selama 15 menit. Tabung ependorf kemudian direndam dalam air es selama 20 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm.

Penentuan pH optimum ekstrak kasar enzim β -glukanase

pH optimum dari enzim β -glukanase ditentukan dengan menguji aktivitas enzim β -glukanase terhadap substrat laminarin 0,1% dengan metode DNS. Sebanyak 10 μ L ekstrak kasar enzim β -glukanase ditambahkan dengan 100 μ L laminarin 0,1% dalam variasi buffer sitrat-fosfat pH 3-7 kemudian diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan DNS hingga larutan mencapai 1 mL, lalu tabung ependorf direndam dalam air mendidih selama 15 menit. Tabung ependorf selanjutnya direndam dalam air es selama 20 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm.

Pembuatan kurva standar glukosa

Kurva standar untuk mengukur aktivitas sampel ekstrak kasar enzim β -glukanase dibuat dengan menggunakan glukosa konsentrasi bervariasi. Variasi kadar glukosa yang digunakan yaitu 0,2-0,4 mg/mL. Penentuan kurva standar glukosa dilakukan dengan menggunakan metode DNS. Sebanyak 100 μ L masing-masing larutan glukosa ditambahkan dengan reagen DNS hingga mencapai volume 1 mL dalam tabung ependorf bersih. Tabung ependorf direndam dalam air mendidih selama 15 menit. Tabung ependorf kemudian direndam dalam air es selama 20 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm.

Penentuan kadar protein total ekstrak kasar enzim β -glukanase

Pengukuran kadar protein dari ekstrak kasar enzim β -glukanase dilakukan dengan metode Bradford. Sebanyak 100 μ L sampel (pengenceran 20x) ditambah dengan 1000 μ L reagen Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex. Inkubasi dalam suhu ruang dilakukan selama 5 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm.

Pembuatan kurva standar BSA

Kurva standar untuk mengukur konsentrasi protein dilakukan dengan metode Bradford. Larutan standar yang digunakan adalah BSA (*Bovine Serum Albumine*). Variasi kadar BSA yang digunakan adalah 5-40 μ g/mL. Sebanyak 100 μ L larutan BSA ditambah dengan 1000 μ L reagen Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex. Inkubasi dalam suhu ruang dilakukan selama 5 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm.

Analisis SDS-PAGE

Analisis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*) dilakukan dengan meletakkan sebanyak 5-10 μ L sampel ekstrak kasar enzim β -glukanase yang telah didenaturasi dengan SDS dan dicampur dengan buffer sampel pada sumuran *stacking gel*. Adapun gel yang digunakan sebagai gel pemisah adalah gel poliakrilamid 12%. Pemisahan sampel protein dengan elektroforesis SDS-

PAGE dilakukan dengan voltase konstan 100 V selama 3 jam, atau hingga buffer sampel mencapai bagian bawah gel. Pewarnaan protein (*staining*) dilakukan selama 2 jam dan penghilangan pewarna (*destaining*) dilakukan hingga gel berubah menjadi bening sehingga pita-pita protein tampak jelas.

Analisis *native*-PAGE

Analisis *native*-PAGE (*Native Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) dilakukan tanpa menggunakan agen denaturan SDS. Sebanyak 5-10 μ L sampel ekstrak kasar enzim β -glukanase yang telah dicampur dengan buffer sampel diletakkan pada sumuran *stacking gel*. Adapun gel yang digunakan sebagai gel pemisah adalah gel poliakrilamid 12% yang mengandung 0,2% substrat laminarin. Pemisahan sampel protein dengan elektroforesis dilakukan dengan voltase konstan 100 V selama 3 jam, atau hingga buffer sampel mencapai bagian bawah gel. Inkubasi gel dilakukan untuk memunculkan aktivitas enzim β -glukanase. Inkubasi dilakukan pada kondisi optimum ekstrak kasar enzim β -glukanase (pH 6; 37°C) selama 2 jam. Pewarnaan dilakukan dengan *congo red* 0,1% selama 30 menit. *Destaining* dilakukan dengan larutan NaCl 0,1% hingga tampak zona bening.

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Hasil Penelitian

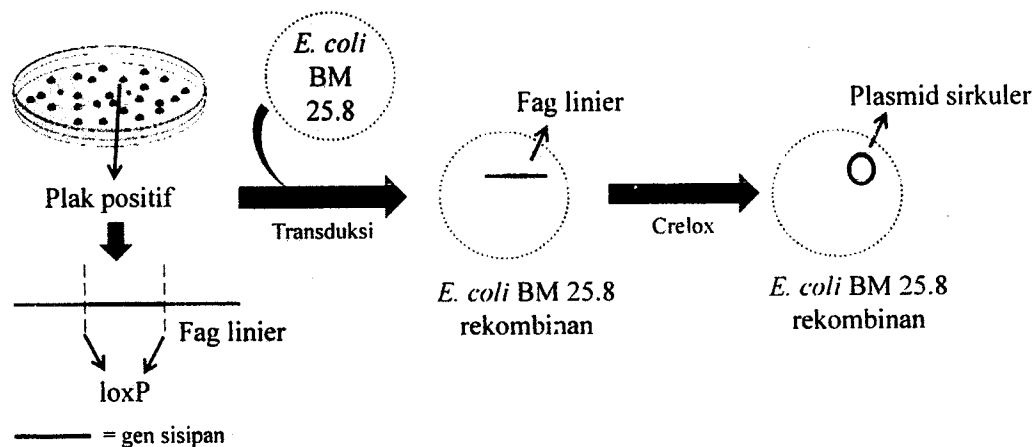
5.1 Seleksi Pustaka Ekspresi Metagenomik Saluran Pencernaan & *Digestive Gland A. fulica*

Sampel pustaka ekspresi metagenomik saluran pencernaan dan *digestive gland A. fulica* diperoleh dari penelitian Kurniawaty (2018). Penapisan dilakukan terhadap pustaka ekspresi metagenomik ini dengan penambahan X-Gal sebagai seleksi putih-biru dan laminarin sebagai substrat seleksi plak positif yang memiliki aktivitas hidrolisis (visualisasi dengan *congo red*). Plak diperoleh dari pemecahan koloni sel *E.coli* XL 1 Blue karena aktivitas lisis dari bakteriofag. Sebanyak 17 plak yang menunjukkan penampakan positif dari keseluruhan plak pada pustaka ekspresi metagenomik tersebut diambil secara acak. Plak positif adalah plak berwarna putih yang memiliki daerah zona bening (*halo*) di sekitar plak tersebut.



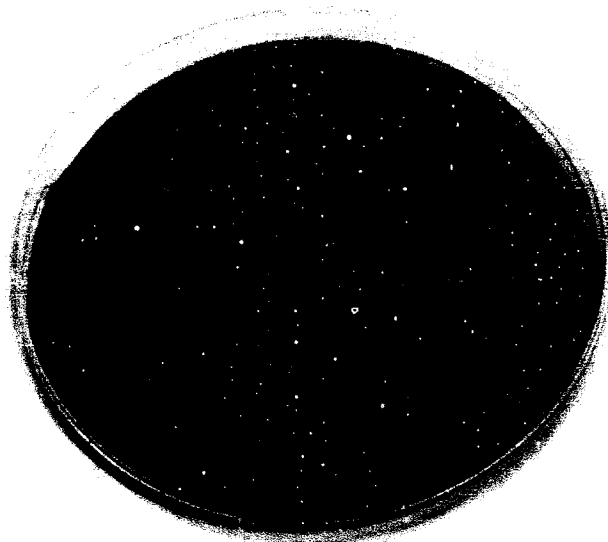
Gambar 5.1 Pustaka penapisan biru putih (X-gal) dan laminarin metagenomik saluran pencernaan dan *digestive gland A. fulica*. Panah hitam (→) menunjukkan dugaan plak positif Kurniawaty (2018)

Plak positif mengandung vektor lambda TriplEx2 yang disisipi gen β -glukanase. Vektor yang masih berbentuk linier dalam plak dilarutkan dalam buffer pelarut fag. Konversi vektor linier menjadi sirkuler terjadi dalam strain *E. coli* BM 25.8. Proses transduksi λ TriplEx2 ke dalam strain *E. coli* BM 25.8 dapat menyebabkan pelepasan Cre-rekombinase dan sirkularisasi dari p λ TriplEx2 pada sisi loxP (Soren et al., 2012). Skema perolehan plak positif dari pustaka ekspresi metagenomik hingga konversi fag linier menjadi plasmid sirkuler ditunjukkan dalam Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Skema penapisan plak positif hingga konversinya menjadi plasmid sirkuler

Pengujian aktivitas β -glukanase dilakukan terhadap 6 klon positif (klon 1, klon 2, klon 3, klon 5, klon 8 dan klon 17) dari pustaka ekspresi metagenomik. Ekstrak kasar enzim dari ke-6 klon tersebut diuji aktivitasnya terhadap substrat laminarin 0,3% (b/v), dan menghasilkan 5 hasil positif (menghasilkan *halo*), sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Aktivitas hidrolisis ekstrak kasar enzim dari ke-6 klon terhadap substrat laminarin 0,3% (b/v). A= klon 1; B=klon 2; C=klon 3; D=klon 5; E= klon 8; F= klon 17; K= kontrol negatif.

Penelitian ini menggunakan plak ke-5 (selanjutnya disebut sebagai klon 5) yang menunjukkan *halo* positif dalam uji aktivitas hidrolisis terhadap substrat laminarin. Hasil uji

aktivitas hidrolisis (uji ekspresi) klon 5 ini akan dibahas lebih lanjut pada sub bab uji ekspresi enzim β -glukanase.

5.2 Isolasi dan Visualisasi Plasmid pTriplEx2 Rekombinan

Plasmid adalah molekul DNA berbentuk sirkuler yang biasanya terdapat pada sel bakteri dan memiliki kemampuan untuk bereplikasi. Plasmid hampir selalu membawa 1 atau lebih gen, yang dapat memberikan karakteristik tertentu pada sel (Brown, 2010). Pada penelitian ini plasmid yang digunakan adalah plasmid pTriplEx2. Plasmid ini memiliki ukuran 3589 pb (~3,6 kb). Plasmid pTriplEx2 adalah plasmid yang berasal dari fagemid λ TriplEx2. Fagemid λ TriplEx2 mengalami proses konversi menjadi plasmid ketika dimasukkan ke dalam sel inang *E. coli* BM 25.8. Sel inang ini memfasilitasi proses sirkularisasi fagemid menjadi plasmid oleh aktivitas cre-rekombinase.

Plasmid pTriplEx2 berfungsi sebagai vektor kloning dalam penelitian ini. Plasmid pTriplEx2 rekombinan membawa gen sisipan β -glukanase dan melalui kemampuannya bereplikasi, maka molekul DNA sisipan dapat diproduksi dan diturunkan juga pada sel anak dari sel induk inang (*E. coli* BM 25.8). Peta plasmid pTriplEx2 secara umum ditunjukkan pada Gambar 2.7.

Plasmid pTriplEx2 memiliki gen resisten ampisilina (Amp^r) yang membuat sel inangnya memiliki resistensi terhadap antibiotik ampisilina (~100 $\mu\text{g/mL}$). Oleh karena itu, dalam proses inokulasi sel *E. coli* BM 25.8 untuk mengisolasi plasmid rekombinan digunakan antibiotik ampisilina sebagai marker seleksi. *E. coli* BM 25.8 yang tidak memiliki plasmid tersebut dalam selnya atau mikroba lain yang dapat menjadi kontaminan tidak akan tumbuh dalam media LB cair mengandung ampisilina sebanyak 100 $\mu\text{g/mL}$.

Isolasi plasmid adalah langkah yang dilakukan untuk memperoleh ekstrak plasmid murni dari sel *E. coli* BM 25.8. Penelitian ini menggunakan prinsip metode isolasi plasmid Birnboim dan Doly (1979). Plasmid DNA diperoleh dari sel *E. coli* BM 25.8 dengan lisis. Perlakuan lisis menggunakan larutan lisis sel yang mengandung *sodium dodecyl sulphate* (SDS) dan natrium hidroksida (NaOH) yang mendenaturasi DNA kromosom dan plasmid. Campuran ini kemudian dinetralkan dengan larutan netralisasi yang mengandung sodium asetat, menyebabkan DNA plasmid mengalami renaturasi. Sebagian besar DNA kromosom dan protein bakteri terpresipitasi,

dan dipisahkan dari larutan plasmid DNA dengan sentrifugasi. Plasmid DNA dapat diekstraksi dari supernatan dengan presipitasi etanol.

Konsentrasi serta kemurnian isolat plasmid yang diperoleh dapat diukur dengan spektrofotometri serapan UV menggunakan alat nanodrop. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 280, 260 dan 230 nm. Rasio A_{260/280} digunakan untuk melihat kemurnian sampel DNA terhadap pengotor berupa protein. Panjang gelombang 280 nm digunakan untuk mengukur pengotor protein karena protein memiliki residu asam amino aromatis (triptofan, fenilalanin dan tirosin). Suatu sampel DNA dikatakan memiliki kemurnian yang tinggi apabila rasio A_{260/280} sekitar 1,8-2,0. Rasio dibawah 1,8 menandakan masih terdapat kontaminan pada sampel berupa protein. Rasio A_{260/230} digunakan untuk melihat kemurnian sampel DNA terhadap kontaminan berupa molekul yang menyerap pada panjang gelombang 230 nm seperti EDTA, karbohidrat dan fenol. Rasio A_{260/230} yang diharapkan dari suatu sampel DNA adalah 2,0-2,2 (Lehninger, 1975). Pada penelitian ini, konsentrasi, rasio A_{260/280} dan rasio A_{260/230} yang diperoleh dari sampel isolat plasmid pTriplEx2 rekombinan klon 5 ditunjukkan pada Tabel 5.1.

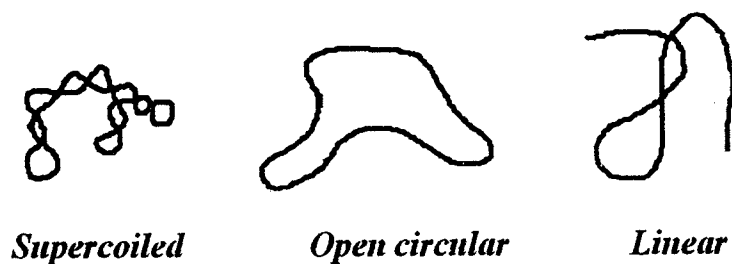
Tabel 5.1 Konsentrasi, rasio A_{260/280} dan rasio A_{260/230} yang diperoleh dari sampel isolat plasmid p TriplEx2 rekombinan klon 5

Klon 5	30,08	2,06	1,66
--------	-------	------	------

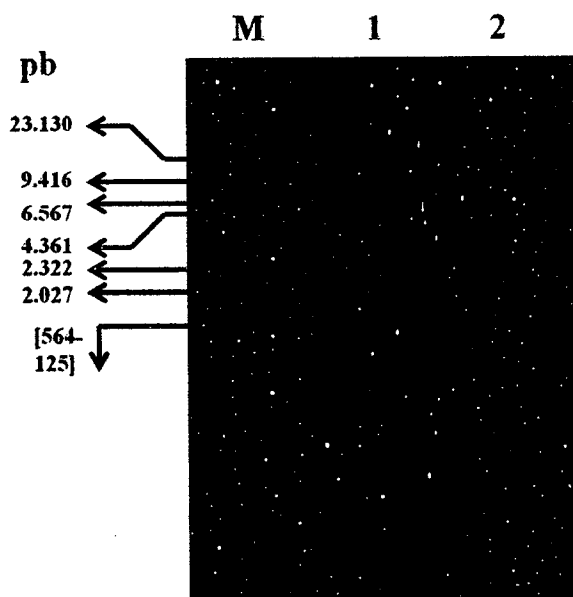
Berdasarkan data pada Tabel 5.1 dapat dilihat bahwa nilai rasio A_{260/280} sedikit lebih dari 2,0. Hal ini dapat diartikan sampel isolat plasmid pTriplEx2 rekombinan klon 5 memiliki sedikit kontaminan berupa protein, masih mendekati kisaran nilai plasmid murni. Selanjutnya, rasio A_{260/230} menunjukkan nilai 1,66. Hal ini dapat berarti bahwa sampel masih mengandung impuriti seperti reagen fenol maupun karbohidrat yang memiliki serapan pada sekitar 230 nm.

Hasil isolasi plasmid pTriplEx2 rekombinan divisualisasi menggunakan elektroforesis agarosa. Elektroforesis agarosa ini bertujuan untuk mengamati keberadaan plasmid (dalam bentuk pita DNA). Elektroforesis agarosa adalah teknik yang umum digunakan dalam pemisahan sampel DNA maupun RNA. Molekul asam nukleat akan bergerak mengikuti arus listrik dimana molekul bermuatan negatif akan bergerak menuju kutub positif (anoda).

Dalam elektroforesis DNA, kecepatan migrasi molekul DNA bergantung pada ukurannya. Namun pada DNA non linier seperti plasmid, bentuk plasmid juga mempengaruhi kecepatan migrasi. Plasmid pTriplEx2 tanpa sisipan memiliki ukuran sekitar 3,6 kb. Sisipan cDNA dalam penelitian sebelumnya memiliki ukuran sekitar 700-1100 pb (Kurniawaty, 2018). Sehingga, dengan mempertimbangkan kisaran ukuran, seharusnya pita plasmid DNA ditambah dengan sisipan akan berada pada sekitar 4,3-4,7 kb. Namun, pada penelitian ini hasil yang diperoleh adalah pita plasmid yang berada pada ukuran sekitar 23 kb. Hal ini dapat disebabkan oleh plasmid pTriplEx2 rekombinan yang diperoleh berada pada konformasi *open circular* yang mengalami pergerakan dalam pori gel agarosa lebih lambat dibandingkan plasmid dalam bentuk linier atau *supercoiled*. Visualisasi plasmid pTriplEx2 rekombinan dari analisis elektroforesis agarosa ditunjukkan pada Gambar 5.5.



Gambar 5.4 Macam isoform plasmid DNA (Voß, 2007)



Gambar 5.5 Visualisasi plasmid pTriplEx2 rekombinan menggunakan analisis elektroforesis gel agarosa 1%. M = Marker lambda/HindIII; kolom 1 = klon 5; kolom 2 = klon 5 (duplikat)

5.4 Konstruksi Pustaka Ekspresi Metagenomik cDNA *Digestive Gland Achatina fulica*

5.4.1 Analisis hasil ligasi cDNA *digestive gland Achatina fulica* terhadap vektor lambda

Pustaka metagenomik dikonstruksi dari sampel *digestive gland Achatina fulica* yang diambil dari Kabupaten Blitar, Jawa Timur, Indonesia. Konstruksi pustaka metagenomik diawali dengan proses ligasi cDNA pada vektor. Vektor yang digunakan adalah phage λ TriplEx2. Rasio jumlah cDNA:vektor pada reaksi ligasi berpengaruh terhadap efisiensi transformasi dan jumlah klon independen yang terbentuk pada pustaka tidak teramplifikasi (*unamplified library*). Rasio optimal cDNA:vektor dalam reaksi ligasi harus ditentukan secara empiris. Pustaka cDNA terbaik diperoleh pada reaksi ligasi dengan rasio cDNA:vektor 2:3; 1:1; dan 3:2.

Hasil perhitungan efisiensi ligasi *unamplified library* dengan berbagai rasio cDNA:vektor tersaji dalam Tabel 5.5.

Tabel 5.5. Data penentuan efisiensi ligasi.

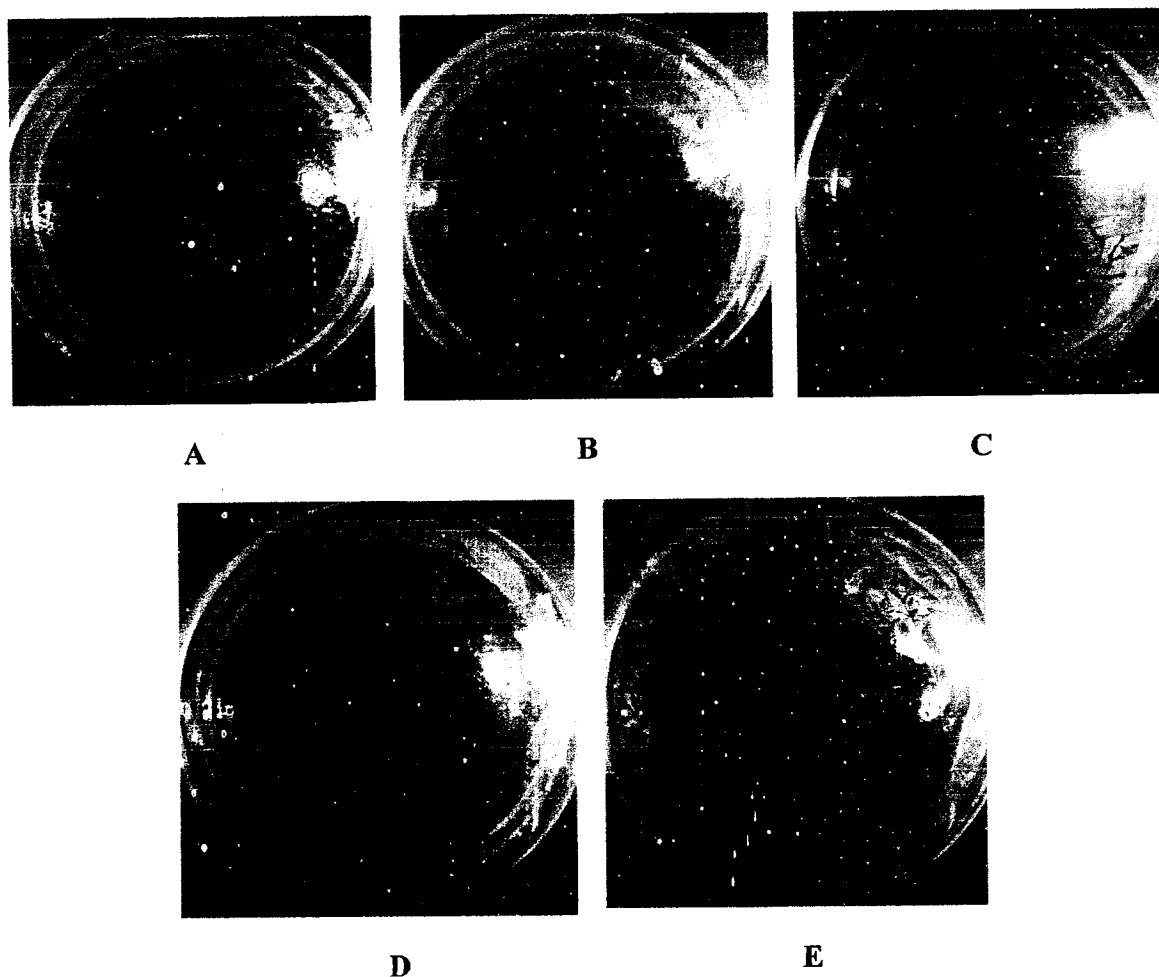
No	Inisial/Lambang	cDNA : Vektor	Plak (Pfu/ml)
1.	L1	3 : 2	$9 \cdot 10^7$
2.	L2	1 : 1	$15 \cdot 10^7$
3.	L3	2 : 3	$28 \cdot 10^7$

Ligasi optimal diperoleh pada proses ligasi dengan perbandingan cDNA:vektor adalah 2:3 dengan jumlah pustaka yang diperoleh adalah $28 \cdot 10^7$. Jumlah ini telah memenuhi standar minimal yaitu di atas $1 \cdot 10^6$.

5.4.2 Titering Pustaka Metagenomik

Lambda lisat packaging dengan rasio ligasi (cDNA:vektor) 2:3 diamplifikasi dengan pengenceran 1:1.000.000. Hasil titering plak adalah $1,1 \cdot 10^{10}$ pfu/ml. Hasil ini menunjukkan keberhasilan konstruksi pustaka cDNA dari *digestive gland Achatina fulica* dibandingkan dengan penelitian lain (Tabel 5.6).

Pustaka cDNA seharusnya terdapat minimal $1,7 \times 10^5$ klon (Sambrook and Russell, 2002). Jumlah klon dari beberapa hasil penelitian yang menggunakan metode cDNA *construction library* tersaji pada Tabel 5.6. Pada pustaka cDNA *digestive gland Achatina fulica* terdapat $1,10 \cdot 10^{10}$ pfu/ml, sehingga diperoleh pustaka cDNA yang terbaik.



Gambar 5.8 Plak rekombinan, selanjutnya: **A.** Kontrol negatif (*E. coli*); **B.** Kontrol positif (plak rekombinan); **C.** Plak rekombinan hasil ligasi cDNA:vektor = 3:2; **D.** Plak rekombinan hasil ligasi cDNA:vektor = 1:1; **E.** Plak rekombinan hasil ligasi cDNA:vektor = 2:3 (→ = plak)

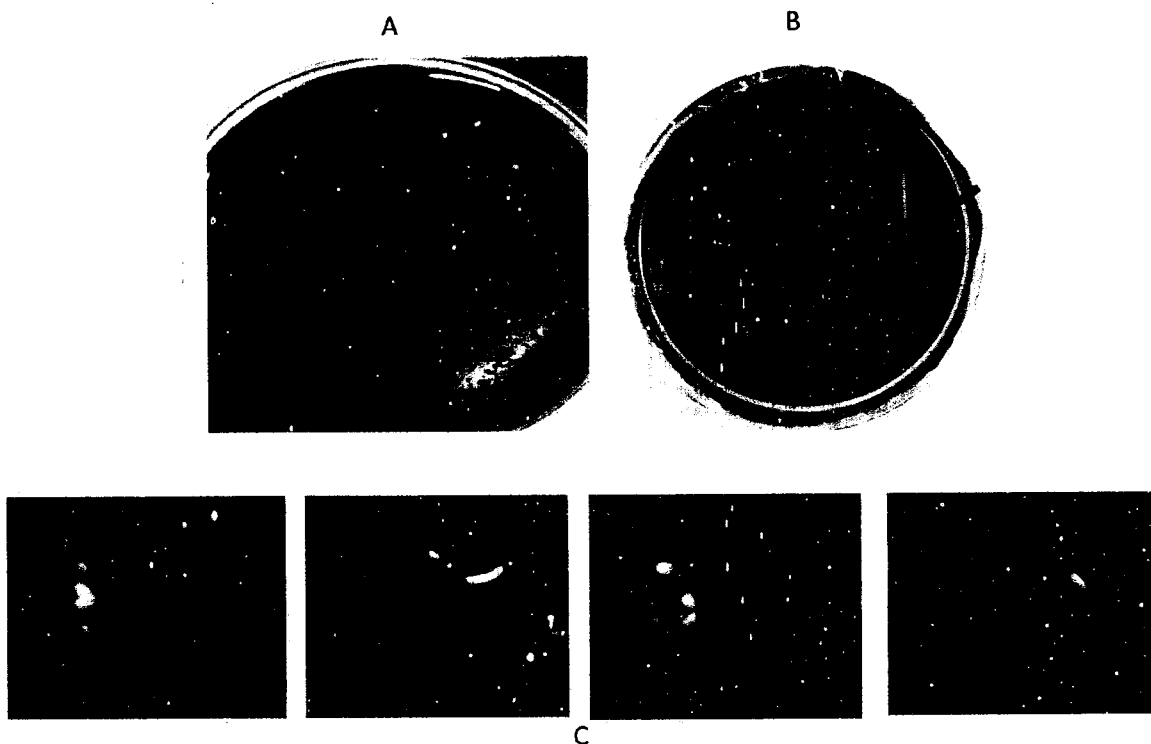
Tabel 5.6 Jumlah klon dalam beberapa pustaka cDNA.

No.	Samples	Jumlah klon	Referensi
1.	Jaringan tumbuhan <i>Populus hopeiensis</i>	1.69×10^9	Wang <i>et al.</i> , 2005
2.	<i>Human liver</i>	1.49×10^9	Chen <i>et al.</i> , 2005
3.	Sampel lingkungan	$8,00 \times 10^9$	Grant <i>et al.</i> , 2006
4.	Hu sheep	1.09×10^{10}	Hu <i>et al.</i> , 2014
4.	Digestive gland <i>Achatina fulica</i>	1.10×10^{10}	Laporan penelitian disertasi (Kurniawati, 2018)

5.5 Penapisan Plak Rekombinan dengan Aktivitas Glikosida Hidrolase

Penapisan plak rekombinan gen penyandi β -Glukanase dilakukan menggunakan metode pewarnaan Congo Red (Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; & Teng *et al.*, 2010) dalam media LB agar yang mengandung IPTG dan substrat laminarin (Aires *et al.*, 2012; Zakharenko *et al.*, & Pinheiro *et al.*, 2015). Hasil penapisan plak rekombinan disajikan pada Gambar 5.9.

Eksresi gen insert penyandi 1,3- β -Glukanase dalam suatu vektor rekombinan dipengaruhi oleh kondisi kultur dan tipe substrat yang digunakan untuk pertumbuhan sel inang (Aires *et al.*, 2012). Dalam penelitian ini sel inang *E. coli* XL1 Blue rekombinan ditumbuhkan dalam media yang mengandung IPTG dan laminarin. IPTG merupakan agen penginduksi ekspresi gen insert, sedangkan laminarin merupakan substrat dari 1,3- β -Glukanase. Setelah *E. coli* XL1 Blue mengalami siklus litik, plak rekombinan yang mengekspresikan glukonase terutama 1,3- β -Glukanase atau laminarinase akan menunjukkan halo warna putih di sekelilingnya.



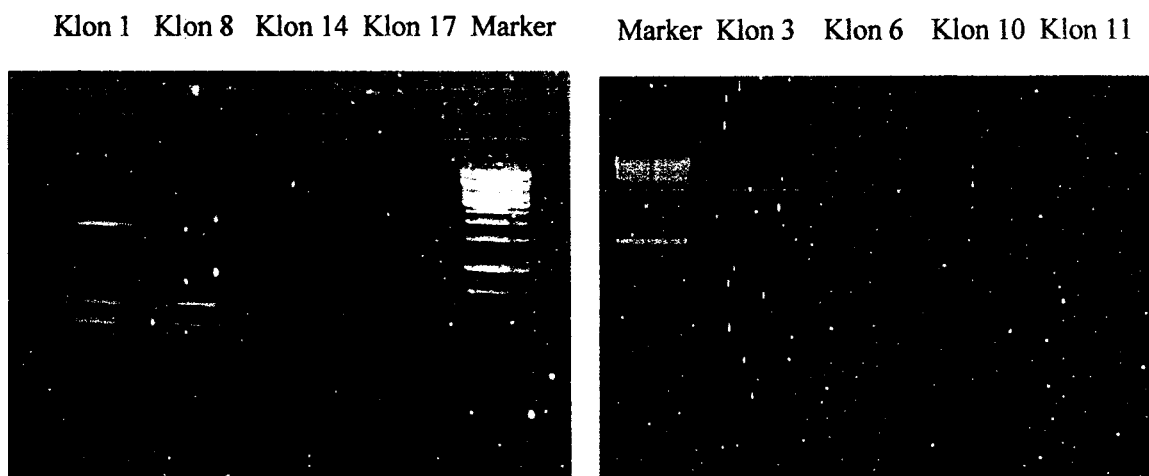
Gambar 5.9 Penapisan plak rekombinan menggunakan substrat laminarin dengan pewarnaan *Congo Red*. A. Plak rekombinan pasca kultur selama 18-24 jam pada media LB agar. B. Plak rekombinan pasca kultur selama 5-7 hari. C. Gambar plak diperbesar 400X.

Penapisan dengan substrat laminarin menggunakan pustaka ekspresi yang diencerkan 1:1.000.000, menghasilkan 17 plak dengan zona halo di sekitarnya. Masing-masing plak

selanjutnya dikonversi dari lambda linier menjadi plasmid pada sistem inang yang berbeda (*E. coli* 25.8) dan selanjutnya diberikan kode klon 1, klon 2, klon 3 dan seterusnya hingga klon 17.

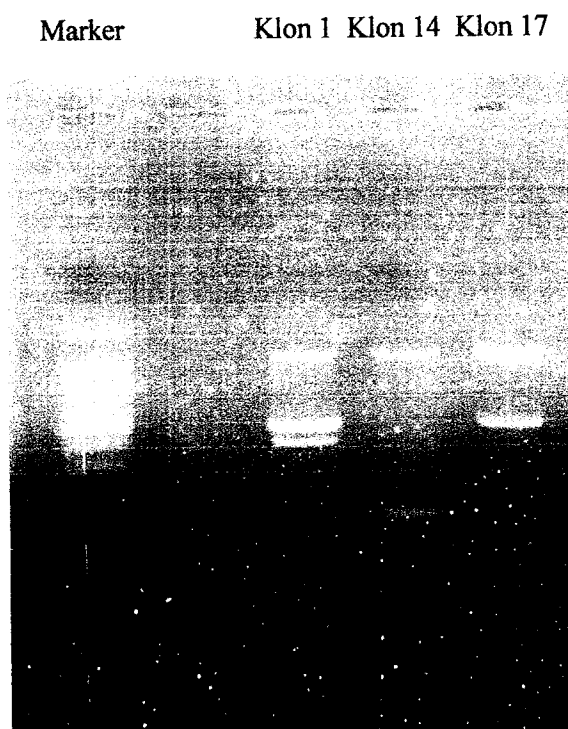
Pembentukan plasmid rekombinan terjadi secara otomatis ketika phage rekombinan ditransduksikan ke dalam inang *E. coli* BM 25.8. Proses ini disebut Cre-rekombinase (Cre-lox). Dalam sistem ini, *E. coli* 25.8 memiliki aktivitas Cre-lox. Pada proses Cre-lox phage lisogenik terhadap phage lambda sehingga tidak mengalami lisis pada saat proses transduksi menjadi klon plasmid rekombinan. Proses selanjutnya adalah isolasi plasmid rekombinan dari *E. coli* 25.8 rekombinan positif dari sejumlah 8 klon yang dipilih, meliputi klon 1, klon 3, klon 6, klon 8, klon 10, klon 11, klon 14 dan klon 17 (8 klon).

Pembuktian bahwa plasmid dari 8 klon yang diperoleh mengandung insert, maka dilakukan analisis restriksi dan PCR Hasil analisis restriksi dengan HindIII terhadap DNA insert klon dari 8 klon terpilih terlihat pada Gambar 5.10. Klon 1 dan klon 6 diperkirakan merupakan DNA insert yang sama, karena muncul 3 band yang sama dari hasil restriksi. Klon 8 dan klon 10 juga diprediksikan merupakan DNA insert yang sama. Klon 3 dan klon 11 menghasilkan 1 band saja tapi pada ukuran yang berbeda. Sedangkan klon 14 dan 17 tidak terlihat adanya band. Klon 14 dan 17 bisa terjadi karena konsentrasi yang kecil dari DNA insertnya. Proses restriksi dilakukan terhadap DNA insert dari masing-masing plasmid rekombinan yang telah diisolasi. Berdasarkan hasil analisis restriksi, proses sekuensing dilakukan terhadap DNA insert yang diperkirakan berbeda, yaitu DNA insert dari klon 1, 14 dan 17.



Gambar 5.10 Analisis restriksi DNA insert klon 1, 3, 6, 8, 10, 11, 14 dan 17.

Hasil analisis PCR untuk pembuktian keberadaan insert tersaji pada Gambar 5.11. Produk PCR dari klon 1, 14 dan 17 diperoleh dengan PCR yang menggunakan primer sekuensing dari cDNA Kit dari Clontech. Sepasang primer yang digunakan merupakan bagian dari plasmid pTriplEx2 dengan gen yang diperoleh merupakan gen utuh. Primer forward adalah 5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3' dan primer reverse adalah 3'-GCCCTATAGTGAGTCGTAT-5'. Hasil elektroforesis produk PCR klon 1, 14 dan 17 terlihat pada Gambar 5.11.



Gambar 5.11 Hasil elektroforesis PCR product klon 1, 14 dan 17

Klon 1 terdapat 3 band dengan prediksi ukuran masing-masing 1100 bp, 500 bp dan 400 bp. Klon 14 terdapat 2 band dengan ukuran 1100 bp dan 200 bp. Band dengan ukuran 200 bp diperkirakan dimer dari primer sehingga tidak dilakukan sekuensing. Klon 17 terdapat 2 band dengan ukuran 1100 bp dan 500 bp.

Berdasarkan analisis restriksi dan PCR, terbukti bahwa setiap klon dari 8 klon yang diperoleh dari pustaka ekspresi metagenomik mengandung insert dengan ukuran yang berbeda. Selanjutnya penulis lebih spesifik melakukan eksplorasi terhadap klon 1 sebagai salah satu klon positif terhadap substrat laminarin.

5.6 Sekuensing dan Analisis Gen 1,3- β -Glukanase

Sebuah klon gen teridentifikasi memiliki aktivitas positif sebagai 1,3- β -glukanase, *mkafGlu1*, dari 17 klon positif terhadap 1,3- β -glukan. Selanjutnya dilakukan sekuensing dan analisa *mkafGlu1*. Sekuensing terhadap plasmid DNA *mkafGlu1* dilakukan dengan menggunakan *forward primer* SP5 (5'-CTTCTGCTCTAAAAGCTGCG-3') dan *backward primer* T7 promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Sekuen DNA MKAFGLU1 tersaji pada Gambar 5.12. Sekuen ini telah terdaftar pada GeneBank dengan kode akses No. MH206587.

```

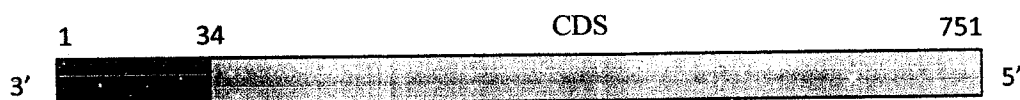
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AAAGGGGGGACTGAAGAAAAATACCTAGTCTAATGCGACGTTCTTCTCAAATGTCGTTTGTACTTGTCAGGAAGTTGTAGCTTCCAAGTCCAG 100
K G G T E E K I P S L M R R S F S N V V L Y L S R K F V A S N C Q 33
TCCATGGTCCAAGGACTTCTAGGTGGCCTCTCGCTCTTCTCTGGGCTGCACTGCTGCTGCGATTGTTGCTTATGCTTTTGTATTACTGTGGCTTTG 200
S M V Q G L P R W P P R S S L G L H C C C D C C L C F C Y Y C G F G 67
GGTCACATTCTTGTGGGGCAGTGGGCATGGAGATGGTCTTCTCCATGATGAGCGGAGTGGATTCAITCCATTATCTAAGCAGGGGGTCATCTCACTCAC 300
S H S C A G S R H G D G L L H D E R S G F I P L S K Q G L I S L T 100
ACACTCGCACCAGCCCATATCCATTGGGCTGGCTCATTCAITTCATTCAITTCATTCAITTCATTAAATGTTTTCACITTCGCTCGCTCTCATTTCGCTGCCA 400
H S H Q P I S I W A G S F I H S F I H S L I V P T S L A L I S L P 133
GCTTATCTATATATTTGTGGAAGTGGGCCAAGTACTTGAGTGTACTCGTAGTATTGCCAGATGCCAGATACTCGGAATGCATTCTCATGCCTGTGCT 500
A Y L Y I C R S G P K Y L S V L V L P R C P D T R N A F S C L C S 167
CTGGCTTATCTGATGAAGTGAAGTCTGGCTGGTGGTCTCTCTTCCAAAGCCATTTCCAGCTGTACGTTTCCATGCTGACTTCTTGGGTTTTAGTTT 600
G L S D E V E L W L V V L L S K P F S S C T F S M L T S W V F S L 200
ATTTTCTTAGTTCAAAATCCACTTCAATTTGTTGATTTCTCGCTCCAAAATTCGATGTTGCTTAAACTTCACTGCAAAATGCATGTTTTCTCGCCAGG 700
F P L V Q N P L Q L F D F S L Q N S M L L K T S L Q M H V F P A T 233
AAGTCGGGGTCCCAAAAAAACAGACTAACCCAGGAAACCTCGCCATCC 751
K S G S P K K N R L T R K P S P S 250

```

Gambar 5.12 Sekuen nukleotida dan deduksi asam amino afmkglu1.

mkafGlu1 terdiri atas urutan basa nukleotida 717 bp (Gambar 5.12). *Open Reading Frame* (ORF) *mkafGlu1* dimulai dari urutan basa 35 hingga 751. ORF sekaligus sebagai *coding sequence* (CDS) tanpa keberadaan intron dalam urutan gen karena gen insert berasal dari cDNA hasil RT-PCT mRNA sel eukariot *digestive system A. fulica*. Sebanyak 34 bp dari awal sekuen diperkirakan merupakan 5'-*untranslated region* (5'UTR) gen *mkafGlu1* (Gambar 5.13).

Sekuen asam amino (AA) deduksi MKAFGlu1 hasil translate 751 nukleotida disajikan pada Gambar 5.14. Sekuen protein tersusun atas 250 AA termasuk 60 sekuen N-terminal *signal peptide* (60 AA berdasarkan prediksi *SignalP online program*).



Gambar 5.13 Struktur *mkafGlu1* penyandi 1,3- β -glucanase *A. fulica*, terdiri dari *untranslated regions* (UTR), (merah) dari urutan nukleotida 1-34 dan *coding sequence* (CDS), (biru) dari urutan nukleotida 35-751.

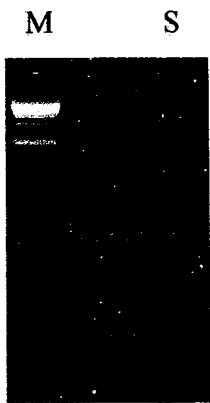
1	KGTEEKIPSLMRRSFSNVVLYLSRKFFVASNCQ	33
34	SMVQGLPRWPPRSSLGLHCCDCCLCFCYYCGF	66
67	GSHSCAGSRHGDGLLDERSGFIPLSKQGLISL	99
100	THSHQPISIWAGSFIHSFIHSLIVFTSLALISL	132
133	PAYLYICRSGPKYLSVLVVLPRCPDTRNAFSCS	165
166	CSGLSDEVELWLVVLLSKPFSSCTFSMLTSWVF	198
199	SLFFLVQNPLQLDFSLQNSMLLKTSLQMHVFP	231
231	ATKSGSPKKNRLTKPSPS	250

Gambar 5.14 Urutan asam amino deduksi MKAFGlu1

Verifikasi terhadap sekuen *mkafGlu1* ditempuh dengan melakukan PCR terhadap plasmid rekombinan [pTriplEx2-*mkafGlu1*] dan elektroforesis hasil PCR. Elektroforesis terhadap hasil PCR gen insert *mkafGlu1* diperoleh band tunggal dengan ukuran kurang lebih 700 pb. Hasil verifikasi ini menguatkan data ORF *mkafGlu1* dengan komposisi nukleotida sebanyak 717 bp (elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 5.15).

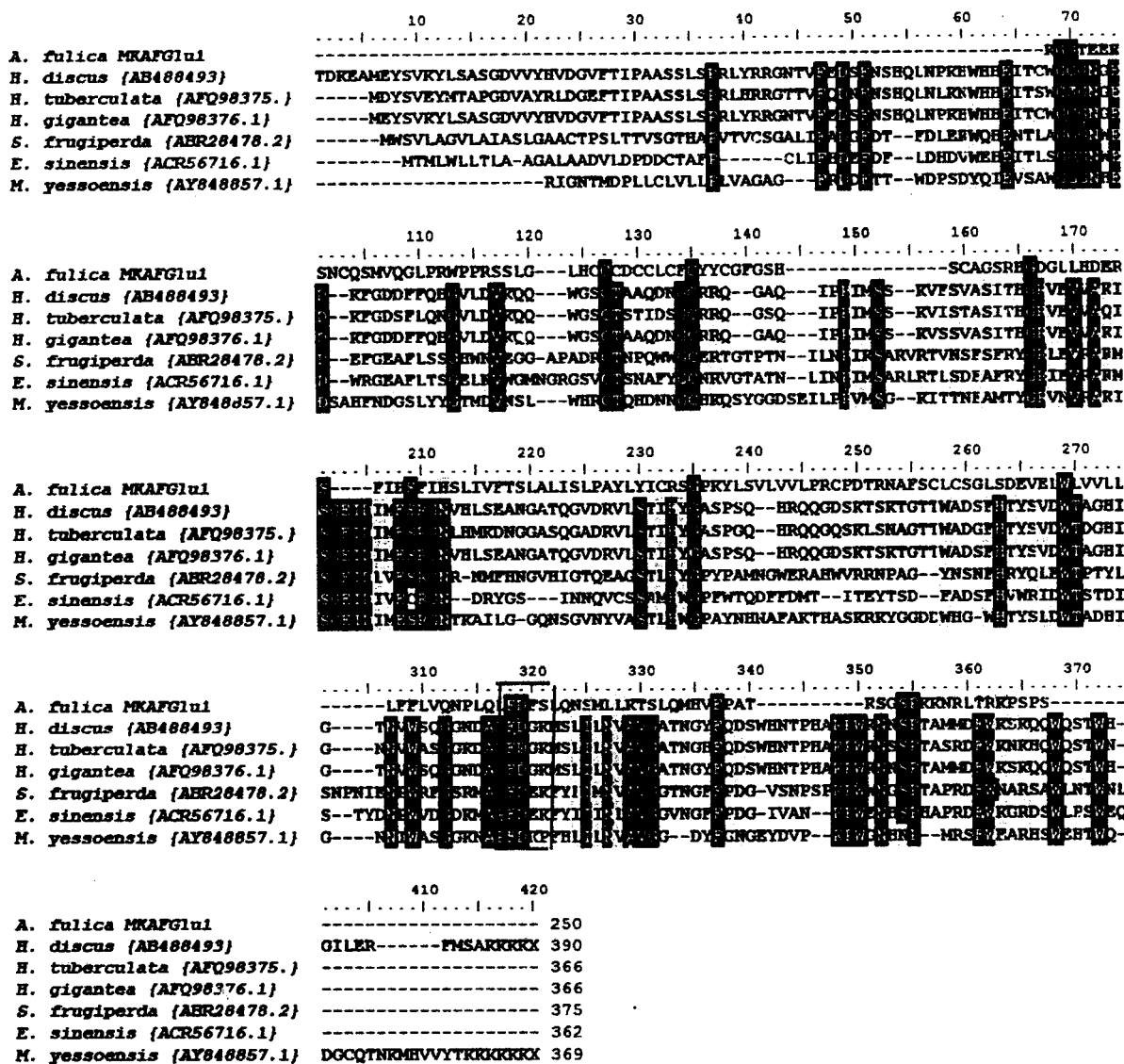
Hasil *alignment* sekuen AA MKAFGlu1 dengan data BLAST (PSI BLAST) menunjukkan bahwa MKAFGlu1 memiliki kemiripan tertinggi berturut-turut 45% dan 46% dengan 1,3- β -glucanase dari *H. discus hannai* (kode akses GenBank No. AB488493) dan *P. Sachalinensis* (kode akses Genbank No. AY308829). Kedua protein 1,3- β -glucanase dari *H. discus*

hannai dan *P. Sachalinensis* merupakan anggota dari glikosida hidrolase famili 16 (GH16). *Alignment* MKAFGlul dengan sekuen AA dari beberapa anggota GH16 yang lain tersaji pada Gambar 5.16.



Single band

Gambar 5.15 Verifikasi gen insert *mkafGlul* dengan PCR menghasilkan single band berukuran 700 bp



Gambar 5.16 Sekuen asam amino deduksi 1,3-β-Glucanase MKAFGlul disejajarkan dengan sekuen 1,3-β-Glucanase family 16 dari spesies lain. Daerah konservasi total berwarna hitam dan daerah konservasi sebagian berwarna abu-abu.

Sekuen MKAFGlul memiliki homologi yang rendah jika dibandingkan dengan daerah yang pertahankan (*conservation region*) pada sekuen anggota GH16 seperti *H. tuberculata* (kode akses GenBank No. AFQ98375.1), *H. gigantea* (kode akses GenBank No. AFQ98376.1), *S. Frugiperda* (kode akses GenBank No. ABR28478.2), *E. sinensis* (kode akses GenBank No. ACR56716.1) dan *M. Yessoensis* (kode akses GenBank No. AY646657.1). Hasil ini menunjukkan bahwa MKAFGlul merupakan sebuah 1,3-β-glucanase baru.

5.7 Analisis Filogenetik Gen 1,3- β -Glukanase

Urutan *mkafGlu1* disejajarkan dengan urutan nukleotida beberapa gen terkait dari data NCBI menggunakan Clustal W. Sekuen nukleotida *mkafGlu1* mempunyai kemiripan 45% terhadap endo-1,3- β -glukanase from *Gossypium hirsutum* (kode akses D88416), 40% kemiripan terhadap β -glukanase dari *Paenibacillus mucilaginosus* (kode akses JN225155), 38% kemiripan terhadap β -glukanase dari *Verticillium alfalfa* (kode akses XM_003009564) dan 37% kemiripan terhadap β -glukanase *Bacillus amyloliquefaciens* (kode akses EU169123) dan *Cryptopygus antarcticus* (kode akses EU559744). Data prosentase kemiripan yang rendah menunjukkan bahwa AFMKGlu1 merupakan sebuah gen novel 1,3- β -glukanase.

Analisis filogenetik dari sekuen nukleotida dikonstruksi dengan tujuan melakukan verifikasi keterkaitan antara *mkafGlu1* dan gen β -glukanase yang lain. Pohon *phylogenetic* sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 5.17, *mkafGlu1* merupakan anggota dari 1,3- β -glukanase.

Gambar 5.17 Analisis filogenetik gen *mkafGlu1*

5.8 Ekspresi *mkafGlu1* di *E.coli*

Klon gen *afmkglu1* diekspresikan di *E. coli* BM 25.8 dengan induksi IPTG dimaksudkan untuk melakukan investigasi sifat-sifat biokimia *mkafGlu1*. Ekspresi *mkafGlu1* dibuktikan dengan tiga macam uji, antara lain *halo plate assay* terhadap *E. coli* BM25.8 rekombinan pada kultur agar LB-laminarine (Gambar 5.18a), *enzyme assay* terhadap lisat sel pada *well* agar-laminarine (Gambar 5.18b), dan penentuan aktivitas enzim dengan metode DNS.

Gambar 5.18 Enzymatic essay. A. *Enzymatic plate assay* klon positif; B. *Enzymatic plate assay* klon negatif; C. *Enzymatic activity assay*; D. Kontrol negatif (tidak ada aktivitas enzim)

Gambar 5.18A, *E. coli* BM 25.8 rekombinan yang membawa pTriplEx2-*mkafGlu1* menunjukkan *halo* pada LB agar-laminarin. Gambar 5.16b, lisat sel rekombinan dituangkan ke dalam *well* laminarin agar, menunjukkan suatu halo di sekitar well sebagai gambaran adanya aktivitas enzim substrat (1,3- β -glukanase-laminarin). Aktivitas enzim dari lisat sel *E. coli* BM25.8 rekombinan juga ditentukan secara kuantitatif dengan metode DNS, diketahui aktivitas 1,3- β -glukanase sebesar 1.07 U/mL terhadap substrat laminarin. Aktivitas 1 U dari 1,3- β -glukanase adalah jumlah enzim yang mereduksi 1 mmol gula sebagai glukosa per menit per mL pada kondisi eksperimental.

5.9 Penentuan Berat Molekul 1,3- β -Glukanase Rekombinan

Karakteristik berat molekul 1,3- β -Glukanase rekombinan MKAFGlu1 ditentukan menggunakan SDS-PAGE (Gambar 5.19A) dan zymogram (Gambar 5.19B).

A B

Gambar 5.19 Analisis SDS-PAGE dan zymogram crude enzim 1,3- β -Glukanase rekombinan. A. Analisis SDS-PAGE dengan pewarna comasie blue; B. Analisis zymogram dengan pewarna congo red

Hasil SDS-PAGE *crude* enzim 1,3- β -Glukanase rekombinan MKAFGlu1, terdapat beberapa *band* dengan berbagai ukuran. *Band* MKAFGlu1 ditentukan berdasarkan hasil analisis zymogram dengan pewarnaan Congo Red. Analisis zymogram menunjukkan hanya ada satu area zona bening yang menandai adanya reaksi enzim-substrat (1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 terhadap substrat laminarin). Satu zona bening memberikan gambaran bahwa tidak ada enzim lain yang bekerja selain 1,3- β -Glukanase MKAFGlu1 berukuran 26,61 kDa. Menurut prediksi menggunakan online tools dari promega (<http://www.promega.com/a/apps/biomath/?calc=dnaprotein>) berat molekul dari MKAFGlu1 adalah 26,29 kDa. Sedangkan prediksi dengan menggunakan *online tool Protein Molecular Weight* (https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html) adalah 27,82 kDa.

5.10 Karakterisasi 1,3- β -Glukanase Rekombinan MKAFGlu1

Karakterisasi enzim MKAFGlu1 ditentukan berdasarkan aktivitas ekstrak enzim yang dipengaruhi oleh faktor suhu (Gambar 5.20) dan pH (Gambar 5.21) dalam U/ml.

Gambar 5.20 Profil pengaruh suhu terhadap aktivitas ekstrak enzim 1,3- β -Glucanase rekombinan

Aktivitas ekstrak enzim MKAFGlu1 diukur pada rentang suhu antara 30-80°C. Aktivitas enzim meningkat dari suhu 30 hingga 40°C dan mengalami penurunan dari suhu 45 hingga 80°C. Aktivitas tertinggi terjadi pada suhu 40°C.

Gambar 5.21 Profil pengaruh pH terhadap aktivitas ekstrak enzim 1,3- β -Glucanase rekombinan

Aktivitas ekstrak enzim MKAFGlu1 diukur pada rentang pH antara 4-7. Aktivitas enzim menurun dari pH 3 hingga 5 dan meningkat kembali pada dari pH 6-7. pH optimum adalah pH 7. Profil serupa juga terjadi pada aktivitas 1,3- β -glukanase dari *Trichoderma asperellum* (Aires *et al.*, 2012).

Luaran Penelitian

- 1) Publikasi artikel pada jurnal ilmiah terindex Scopus (Lampiran 1)
 Nama jurnal: Iranian Journal of Pharmaceutical Research (Q2, impact factor 1,9).
 Judul artikel: A novel 1,3- β -glucanase gene from metagenomic expression library of *Achatina fulica*'s digestive gland.
- 2) Keynote speaker (Lampiran 2)
 Topik ceramah : Metagenomic Technology Uncover Novel Genes Encoding Anti Biofilm Enzymes.
 Nama konferensi: THE 2nd International Conference, " Collaboration Seminar of Chemistry and Industry (COSCI)" , Surabaya, October 9TH 2018.
- 3) Pemakalah pada Seminar Nasional Sains dan Teknologi (Senastek) Unikama tgl 21 Juli 2018 (Lampiran 3).
- 4) Paten gen 1,3- β -glucanase *A. fulica* pada Gene Bank dengan nama *MKAFGlu1* dan kode akses MH206587 (Lampiran 4).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

- 1) Klon gen penyandi β -glukanase dapat diperoleh dari pustaka ekspresi metagenomik sistem pencernaan *A. fulica*.
- 2) Urutan basa gen penyandi β -glukanase dari pustaka ekspresi metagenomik sistem pencernaan *A. fulica* merupakan gen novel, diberi nama *mkafGlu1*, dengan homolog berkisar 40% dengan gen-gen β -glukanase lain yang sudah dilaporkan.
- 3) Sekuen *mkafGlu1* telah mendapat paten dari GeneBank dengan kode akses No. MH206587.
- 4) Gen β -glukanase metagenomik dari klon 5 dapat diekspresikan dan menghasilkan aktivitas hidrolisis terhadap substrat laminarin.
- 5) Hasil karakterisasi menunjukkan β -glukanase metagenomik memiliki BM sekitar 27,82 kDa, pH dan suhu optimum masing-masing 7 dan 40°C.

Saran

- 1) Enzim β -glukanase novel yang ditemukan pada penelitian ini perlu dikarakterisasi lebih lanjut, diproduksi dan dikembangkan sebagai enzim anti biofilm.

- 2) Melakukan karakterisasi β -glukanase lain yang didapat dari pustaka metagenom.

DAFTAR PUSTAKA

- Baktir, A., Indrayudi T., Zamakhsyari, Primasari, K, Nofianti,A., Kriswandini, I.L.** (2010) *New glucanase enzyme acting as inhibitor toward S. Mutans and Candida albicans biofilm formation.* The second The 2nd ICCS.
- Baktir, A., Suwito, H., Safinah, M., Rahimah, Kamiliyah, H., Sumarsih, S., Pudjiastuti, P.** (2011) *The new strategies destroying the biofilm extracell matrix of Candida albicans.* Proceeding of The 3rd International Conference on Basic and Applied Sciences.
- Baktir, A., Suwito, H., Safinah, M. And Kunsah, B.** (2012) *Novel materials for eradication of biofilm extracell matrix of pathogenic Candida,* Journal of Materials Science and Engineering B 2: 650-658.
- Baktir, A., Masfufatun, Hanum, GR., Amalia, KR., Purkan** (2014) *Construction and characterization of the intestinal biofilm model of Candida spp.,* Res. J. Pharm., Biol. 5: 204-211.
- Anggarani, M.A., A. Baktir, dan S.P.A., Wahyuningsih, 2014, **Identifikasi Protein Spesifik Biofilm Candida Albicans sebagai Target Penentuan Protein Spesifik Antigenik,** Prosiding Seminar Nasional Kimia, hal. B49-B60, September 2014, Universitas Negeri Surabaya.



- Aswidinnoor, A., Suwanto, A., Haris, N., dan Purwantara, A., 2003, **Konstruksi Pustaka cDNA dan Analisis Ekspresi Gen pada Klon Karet Resisten terhadap Penyakit Gugur Daun *Corynespora cassiicola***, IPB, Bogor.
- Auler, M.E., D. Morreira, F.F.O. Rodrigues, M.S. Abrao, P.F.R. Margarido, F.E. Matsumoto, E.G. Silva, B.C.M. Silva, R. P. Schneider & C.R. Paula, 2010, **Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis**, *Medical Mycology*, 40, 211-216.
- Ausubel, F.M et al., 2003, **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: John Wiley & Sons.
- Baktir, A., Arum NA, Suyanto, Suprijanto B., 2016, Enhancing Stability and Purity of Crude Chitinase of *Achatina fulica* by Crystallization, **Procedia Chemistry** 18 (2016) 26-30.
- Bender, A., and Glen, C.R., 2005, A discussion of measure of enrichment in virtual screening: Comparing the information content of descriptors with increasing levels of sophistication. *J. Chem. Inf. Model.* 2005. Vol 45. pp. 1369-1375
- Berniyanti, T., dan Suwarno, 2007, Karakteristik Protein Lendir Bekicot (*Achatina*) Isolat Lokal sebagai Faktor Antibakteri, **Media Kedokteran Hewan**, Vol. 23, No. 3.
- Brown, T., 2010, **Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction**, 5th ed, Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.
- Buss, L., 2011, **Giant African Land Snail *Achatina fulica***, Department of Entomology and Nematology, University of Florida.
- Cardoso, A.M., J.J.V. Cavalcante, M.E. Cantao, C.E. Thompson et al., 2012, Metagenomic Analysis of the Microbiota from the Crop of an Invasive Snail Reveals a Rich Reservoir of Novel Genes, **PLoS ONE**, November 2012, Volume 7:e48505.
- Carman WF, Wallace LA, Walker J, McIntyre S, Noone A, Christie P, Millar J, Douglas DJ. 2000. **Rapid Virological Surveillance of Community Influenza Infection in General Practice**. *BMJ*. 321:736-737.
- Chu, C.Y., Tseng, C.W., Yueh, P.Y., Duan, C.H., and Liu, J.R., 2011, Molecular Cloning and Characterization of a β -Glucanase from *Piromyces rhizinflatus*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol 111, No. 5: 541-546.
- Hanum., G.R., A. Baktir, Purkan, 2013, Pengaruh Ekstrak Enzim *Achatina fulica* dan Ligan Bgl2 terhadap Peningkatan Kinerja Flukonazol untuk Eradikasi Biofilm *Candida albicans* in Vitro, **Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**, Vol 16 No. 2, Juli 2013.
- Handelsman J., 2004, Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 68(4):669-685.

- Haris, N., H. Aswidinnoor, A. Suwanto, M.T. Suhartono, N.T. Mathius dan A. Purwantara, 2005, **Konstruksi Pustaka cDNA dari Daun Klon Karet AVROS 2037 yang diinfeksi Patogen *Carynespora casiipora*, *Menara Perkebunan*, 2005, 73(2), 44-62.**
- Hewajuli, D.A dan Dharmayanti, 2014, **Perkembangan Teknologi *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* dalam Mengidentifikasi Genom *Avian Influenza* dan *Newcastle Diseases*, *WARTAZOA*, Volume.24, Nomor 1.**
- Indah, M., 2004, ***Enzim*, Digitized by USU digital library**, Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara.
- IPHS (Animal and Plant Health Inspection Service), 2011, **Giant African Snails: A Foreign Threat to U.S Agriculture, Pest Alert, Plant Protection and Quarantine, April 2011.**
- Kantawong, F., P. Thaweenan, S. Mungkala, S. Tamang et al., 2016, **Mucus of *Achatina fulica* Stimulates Mineralization and Inflammatory Response in Dental Pulp Cells, *Turkish Journal of Biology* (2016) 40: 353-359.**
- Kleinsmith, L.J. & V.M. Kish (2005). ***Principles of Cell and Molecular Biology*. Second Edition. New York, Harper Collins College Publish. 810 p.**
- Komariah dan R. Sjam, 2012, **Kolonisasi *Candida* dalam Rongga Mulut**, *Majalah Kedokteran FK UI*, Vol XXVIII No. 1: 39-47.
- Kuleta, J.K., M.R. Kozik dan A. Kozik, 2009, **Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates***, vol 56: 211-224, *Acta Biochimica Polonica*, Krakaw
- Kusumaningtyas, E., 2005, **Mekanisme Infeksi *Candida albicans* pada Permukaan Sel**, *Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis 2005*, Balai Penelitian Veteriner, hal. 304-313.
- Linton, S.M., Cameron, M.S., Gray, M.C., Donald, J.A., Saborowski, R., Bergen, M.V, Tomm, J.M., and Allardyce, 2015, **A Glycosyl Hydrolase Family 16 Gene is Responsible for the Endogenous Production of β -1,3-Glucanases within Decapod Crustaceans, *Gene* 569: 203-217.**
- Lyrwati, D., 2004, ***DNA Recombination and Genetic Techniques, Transmission of Human Disease and Computer Resources for the Clinical and Molecular Geneticist***, Unibraw Publ., Indonesia, ISBN 9795085433.
- Malhotra S., Nirmaljit K., Bhatia MS., Kumar P., Hans C., 2010, **Yeast Infection and Psychiatric disorders, *Psychomicrobiology, Delhi Psychiatry Journal* Vol. 13 No. 2**
- Nobile C.J & Mitchell A.P., 2005, **Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p, *Curr Biol.*, 15(12): 1150-5.**

- Oroh, C.H., D.H.C Pangemanan dan C.N. Mintjelungan, 2015, Efektivitas Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) terhadap jumlah sel fibroblas pada Luka Pasca Pencabutan Gigi Tikus Wistar, **Jurnal e-Gigi**, Volume 3, Nomor 2.
- Purnasari, P.W., D. Fatmawati dan I. Yusuf, 2012, **Pengaruh Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Penyembuhan Luka Sayat**, *Sains Medika*, 4(2): 195-203.
- Ramage G., Vandewalle K., Wickes B.I. & Lopez R., 2001, Characteristics of biofilm formation by *C. albicans*, *Rev Iberoam Micol.*, 18(4): 163-70.
- Riesenfeld CS, Schloss PD, and Handelsman J. 2004. **Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities**. *Annu. Rev. Genet.* 38:525–52.
- Sakamoto, K., and Toyohara, H., 2009, Molecular Cloning of Glycoside Hydrolase Family 45 Cellulase Genes from Brackish Water Clam *Corbicula japonica*, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 152: 390-396.
- Sambrook, J., and Russel, DW., 2001, **Molecular Cloning A Laboratory Manual**, Thrid Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanjaya, D.M.R., Darmada, I.G.K., dan Rusyati, L.M.M., 2014, **Kandidiasis Vagina yang Mendapat Terapi Sistemik dan Tropikal: Sebuah Laporan Kasus**, e-Jurnal Madika Udayana, 2014; 3(6)
- Santos, C.F.D, V.T. Sakai, M.A.A.M Machado, D.N. Schippers, A.S Greene, 2004, Reverse Transcription And Polymerase Chain Reaction: Principles And Applications In Dentistry, **J Appl Oral Sci** 2004; 12(1): 1-11
- Santoso, H.B., 1989, **Budidaya Bekicot**, Cetakan ke-14, Kanisius, Yogyakarta.
- Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. 2006. **Protein-Ligand Docking : Current Status and Future Challenges**. Wiley InterScience. 65 : 15-26
- Schapira, M., *et al.*, 2003, Making virtual screening a reality. *PNAS*. Vol. 100.pp.7354–7359
- Schmeisser, C., H. Steele and W.R. Streit, 2007, **Metagenomics with non-culturable microbes**, *Application Microbiology and Biotecnology* 75: 955-962.
- Seidman, J.G., 2004, **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons, Inc
- Shoichet, B.K., 2004, Virtual screening of Chemical Libraries. *Nature*. Vol.432. pp. 862-865
- Silverman, S., 2001, **Essential of Oral Med**, BC. Decker Inc, Hamilton, London, 170-177.

- Struble, J.M., Handke P, and Gill RT, 2009, **Genome Sequen Databases: Genomic, Construction of libraries**, The Desk Encyclopedia of Mirobiology, Oxford: Academic Press.
- Soekarno, M.T., 2011, **Kloning dan Ekspresi Gen tilapia Growth Hormone (tiGH) untuk memproduksi Protein Rekombinan Hormon Pertumbuhan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758)**, Universitas Indonesia, Depok.
- Subekti, D.T, W.T. Artama, E. Sulistyaningsih, S.H. Poerwanto, Y. Sari dan F. Bagaskoro, 2008, **Kloning Dan Analisis Hasil Kloning Gen *Gra1* Dari Takizoit *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal**, *JITV Vol. 13 No.1*.
- Teng, Y, Yin Q, Ding M, Zhao F, 2010, Purification and Characterization of a Novel Endo- β -1,4-Glucanase, AfEG22, from the Giant Anail, *Achatina fulica frussac*, *Acta Biochim Biophys Sin*, 42: 729–734.
- Teodoro, M.L., Phillips Jr, G.N., Kavraki, L.E. 2001. Molecular Docking : A Problem With Thousand of Degrees of Freedom
- Toenjes, K.A, et.al., 2009, ***Inhibitors of cellular signalling are cytotoxic or block the budded-to-hyphal transition in the pathogenic yeast Candida albicans***, *J Med Microbiol*, 2009 June; 58(Pt 6): 779–790.
- Ueda, M., A Ito, A., Nakazawa, M., Miyatake, K., Sakaguchi, M., and Inouye, K., 2014, Cloning and Expression of The Cold-Adapted endo-1,4- β -Glucanase gene from *Eisenia fetida*, *Carbohydrate Polymers*, 101:511-516.
- Uria AR, Fawzya YN, dan Chasanah E., 2005, **Eksplorasi Enzim Mikroba dari Lingkungan Laut Melalui Pendekatan Metagenomika**, *WPPI* 11(7):17-24
- Xu, H., Nobile C.J., Dongari-Bagtzoglou A., 2013, ***Glucanase Induces Filamentation of the Fungal Pathogen Candida albicans***, *PloS ONE*, 2013 May; 8(5): e63736.
- Yoon, MY, KM Lee, Y Yoon, J Go et al., 2013, Functional Screening of a Metagenomic Library Reveals Operons Responsible for Enhanced Intestinal Colonization by Gut Commensal Microbes, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 79, No. 12: 3829-3838.
- Yun, J. and S. Ryu, 2005, Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it, *Microbial Cell Factories* 4 (8): 1-5.
- Yuwono T., 2006, **Teori dan aplikasi *polymerase chain reaction***. Yogyakarta (Indonesia): Penerbit Andi.

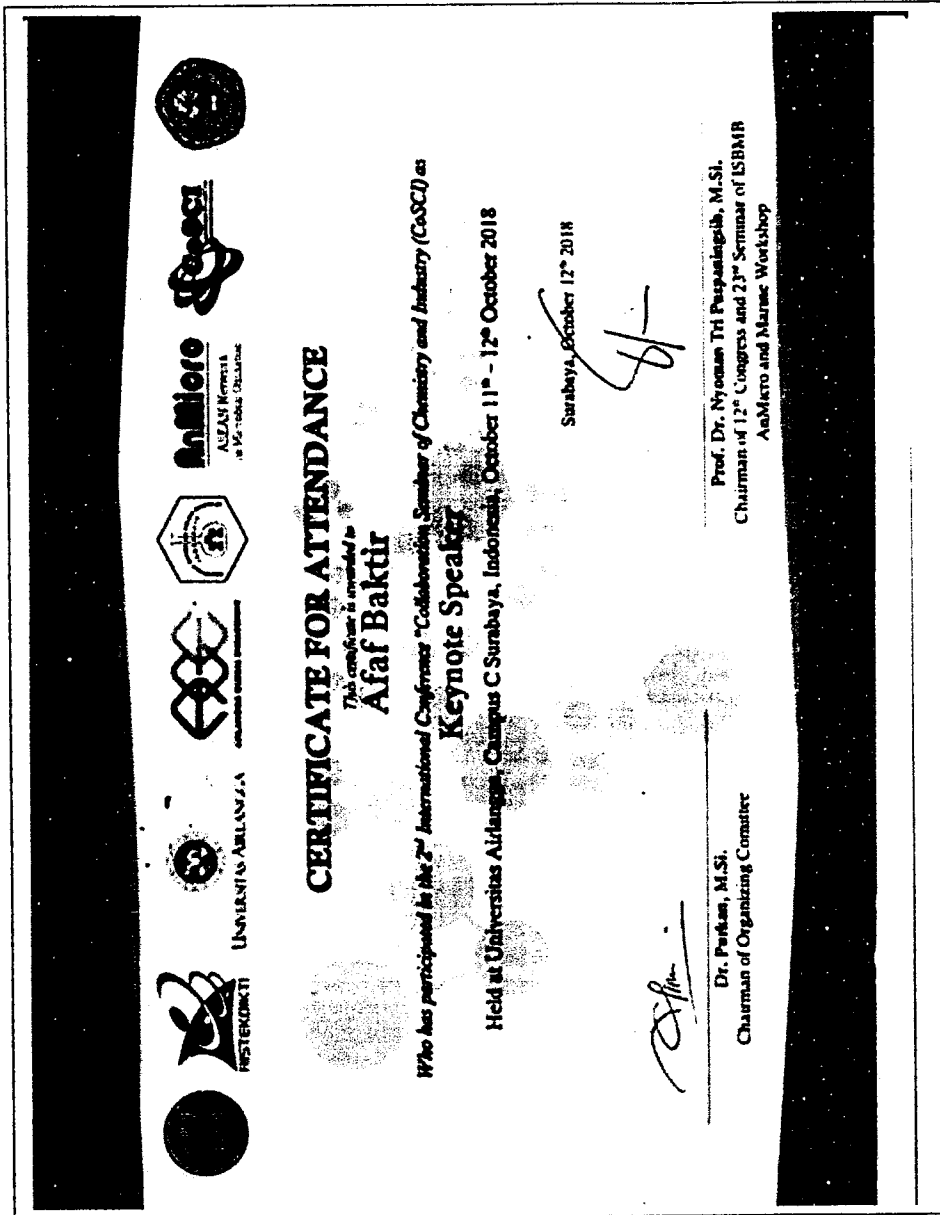
Lampiran 1. Publikasi jurnal internasional (Scopus, Q2)

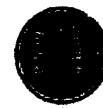
Iranian Journal of Pharmaceutical Research - Author - Manuscript Inform...

http://ijpr.sbmu.ac.ir/author?_action=info&manuscript=14277

Manuscript ID	IJPR-1805-12262							
Manuscript Title	A novel 1,3- β -glucanase gene from the metagenomic expression library of <i>Achatina fulica</i> 's digestive gland							
Manuscript Type	Research article							
Running Title	A novel 1,3- β -glucanase gene from the metagenomic of <i>Achatina fulica</i> 's digestive gland							
Main Subjects	Pharmaceutical biotechnology - Offered Subjects: enzymology							
Abstract	To construct a metagenomic expression library from <i>Achatina fulica</i> 's digestive gland to screen for 1,3- β -glucanase genes whose enzymes are active against a specific substrate of laminarin. A cDNA expression library was constructed using the λ TriplEx2 vector in the <i>E. coli</i> strain XL1-Blue. Cre-recombinase circularization was used to convert λ TriplEx2 to pTriplEx2 in the <i>E. coli</i> strain BM 25.8; then IPTG induction was used to express 1,3- β -glucanase. After the high-efficiency cDNA library of <i>A. fulica</i> 's digestive gland was constructed, seventeen halo positive plaques for the sequence of a novel 1,3- β -glucanase gene, designated MikafGlu1 was obtained. Its nucleotide sequence has similarities to the endo-1,3- β -glucanase from <i>Gossypium hirsutum</i> , as well as the β -glucanases from <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> , <i>Verticillium alfalfa</i> , and <i>Cryptopygus antarcticus</i> of 45%, 40%, 38%, and 37% respectively. An open reading frame of 717 bp encoded a protein of 239 amino acids. A novel 1,3- β -glucanase gene called MikafGlu1 was successfully expressed in <i>E. coli</i> BM 25.8 with activity of 1.07 U ml ⁻¹ .							
Keywords	1,3- β -glucanase; <i>Achatina fulica</i> ; Digestive gland; Metagenomic; Expression library							
Suggested Reviewers	Zhao, Fukun Meng, Mengshiao							
Comments								
Authors								
#	Name	Email Address	Degree	Position	Phone	Mobile	Country	Affiliation
1	Baktir, Afaf	afaf2001@yahoo.com	MSc	Professor	+6285731084324	+6285731084324	Indonesia	Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya, Indonesia
2	Kurniawati, Maris	maris@unikama.ac.id	MSc	Other	+6285755774377		Indonesia	Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya, Indonesia Department of Physics Education, Faculty of

Lampiran 2. Keynote speaker di international conference "Collaboration Seminar of Chemistry and Industry (CoSCI)





CERTIFICATE FOR ATTENDANCE

This certificate is awarded to

Afaf Bakhtir

Who has participated in the 23rd Seminar of Indonesian Society for Biochemistry and Molecular Biology as

Keynote Speaker

Held at Universitas Airlangga, Campus C Surabaya, Indonesia, October 11th - 12th October 2018

Surabaya, October 12th 2018

Dr. Rahmawati Ridwan, Apt., MS.
President of ISBMB

Prof. Dr. Nyones Tri Puspitasari, M.Si.
Chairman of 12th Congress and 23rd Seminar of ISBMB
AnMicro and Marine Workshop

**Program of 23rd Seminar of PBBMI and 2nd CoSCI
At Universitas Airlangga, October 2018**

Wednesday, October 10th 2018		Room:
13.00 - 13.30	Registration and Lunch	Meeting room of TDC
13.30 - 16.00	Congress	Meeting room of TDC
Thursday, October 11th 2018		Room
07.30 - 08.30	Registration Poster Handing and Setting Submission of file presentation (ppt)	Garuda Mukti, fifth floor
	Opening Remarks :	Garuda Mukti, fifth floor
08.30 - 08.40	- Singing Indonesia Raya and Doa	
08.40 - 08.45	- Report of chairman of the organizing committee	
08.45 - 08.55	- Report of the general chairman of congress A seminar	
08.55 - 09.05	- Speech of president of PBBMI	
09.05 - 09.15	- Speech of Rector Unair and Opening ceremony	
09.15 - 09.30	Welcome Dance	Garuda Mukti, fifth floor
09.30 - 10.00	Coffee Break/ Poster Session/ Exhibition	Unair Management Building, fourth floor
Moderator : Prof. dr. Soetjipto, M.S., Ph.D.		
10.00 - 10.30	Keynote Speaker 1 : Prof. Sheila Nathan (UKM): "FAOBMB and How it Benefits ISBMB Members"	Garuda Mukti, fifth floor
10.30 - 11.00	Keynote Speaker 2 : Prof. Antonius Sawanto (TPB) : "Metagenome and Functional Analysis: Tempah Is An Excellent Source of Probiotics"	Garuda Mukti, fifth floor
11.00 - 11.30	Keynote Speaker 3 : Prof. Rendy Kartika (Louisiana State University): "The Art of Organic Synthesis and Its Impacts on Society"	Garuda Mukti, fifth floor
11.30 - 12.00	Keynote Speaker 4 : Prof. Afaf Bakir (Universitas Airlangga): "Functional Metagenomic Technology Uncover Novel Genes Encoding Anti Biofilm Enzymes"	Garuda Mukti, fifth floor
12.00 - 12.30	Photo Session	Garuda Mukti, fifth floor
12.30 - 13.30	Lunch break & prayer time Poster Session / Exhibition	Unair Management Building, fourth floor
Moderator : Tjiptik Srie Tjahjandarie, Ph.D.		
13.30 - 13.50	Invited Speaker 1 : Prof. Feelik Abdul Rantam (Universitas Airlangga): "Recent Development of Omics Technology for Human Prosperity"	Garuda Mukti, fifth floor
13.50 - 14.10	Invited Speaker 2 : Dr. Sehanat Prasongsuk (Chulalongkorn University): "Bioproducts From Tropical Strains of Black Yeast Aureobasidium and Their Applications"	Garuda Mukti, fifth floor
14.10 - 14.30	Discussion	Garuda Mukti, fifth floor

xi | The 23rd Seminar of Indonesian Society for Biochemistry and Molecular Biology in Conjunction with International Conference: "Collaboration Seminar of Chemistry and Industry (CoSCI)" Surabaya, October 11 - 12th, 2018.



UNIVERSITAS AIRLANGGA



AnMioero

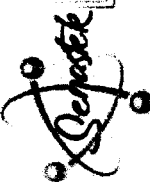


The 23rd Seminar and 12th Congress of Indonesian Society
for Biochemistry and Molecular Biology
in Conjunction with the 2nd International Conference
"Collaboration Seminar of Chemistry and Industry (CoSCI)"


ABSTRACT BOOK

October 11-12th, 2018
Surabaya - East Java, Indonesia

Lampiran 3. Pemakalah dalam simposium nasional



Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Kanjuruhan Malang
 Jalan S. Supriyadi No. 48 Malang Telp. (0341) 801488 ext 216



Sertifikat
 Nomor : 124/SENASTEK-FST/LA2/UK-MI/VI.2018

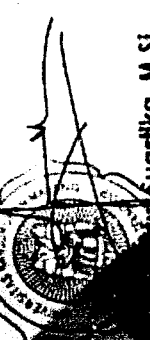
Diberikan kepada

MARIS KURNIAWATI
 sebagai


PEMAKALAH

Seminar Nasional Sains dan Teknologi (Senastek) Unikama 2018 dengan tema "Tantangan Pendidikan IIK di Era Industri 4.0" pada 21 Juli 2018 yang diselenggarakan oleh Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Kanjuruhan Malang.

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Sains dan Teknologi



Suastika, M.Si.
 NIK. 1992031002



Malang, 21 Juli 2018
 Ketua Pelaksana.
Toyok Saby Dwanoko, S.Kom., M.Kom.
 NIK. 290201170

