

1. GLUCAN 1,4-ALPHA - GLUCOSIDASE
2. ENDOMYCETALES
3. POLYMERASE CHAIN REACTION

TESIS

KIK
TKD 22/01
Had
P

PENGGANDAAN GEN GLUKOAMILASE (GLUI)
Endomycopsis fibuligera
MELALUI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



SOFIJAN HADI

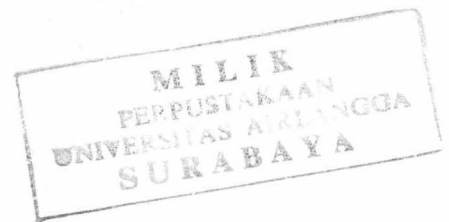
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2001

TESIS

**PENGGANDAAN GEN GLUKOAMILASE (GLU1)
Endomycopsis fibuligera
MELALUI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



SOFIJAN HADI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2001

**PENGGANDAAN GEN GLUKOAMILASE (GLU1)
Endomycopsis fibuligera
MELALUI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi IKD – Biokimia
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**SOFIJAN HADI
NIM 09983016M**

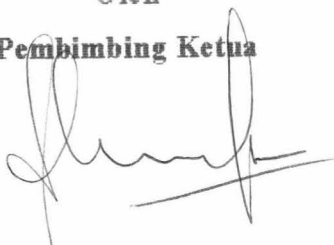
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 20 Pebruari 2001

Lembar pengesahan

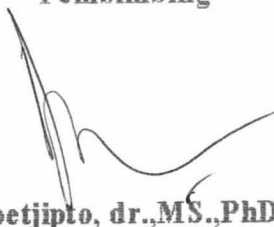
TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 20 FEBRUARI 2001

Oleh
Pembimbing Ketua



Prof. Sri Utari, P.S., dr
NIP. 130099600

Pembimbing



Soetjipto, dr., MS., PhD
NIP. 130687606

Mengetahui

Ketua Program Studi IKD

Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Soetjipto, dr., MS., PhD
NIP. 130687606

Telah diuji pada

Tanggal 20 Pebruari 2001

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr

Anggota : 1. Prof. Sri Utari P.S, dr

2. Soetjipto, dr., MS., PhD

3. Retno Handajani, dr.,MS.,PhD

4. Afaf Baktir, Dra., MS.

RINGKASAN

Enzim glukamilase (α -1,4; 1,6 - glukon glucohydrolase) mengkatalisis pemutusan eksoamilolitik substrat amilum menjadi glukosa. Enzim α -amilase mengkatalisis pemutusan endoamilolitik substrat amilum menjadi oligosakarida. Kedua enzim ini bekerja secara sinergis mengubah amilum menjadi glukosa. Upaya meningkatkan kualitas enzim perlu dilakukan antara lain dengan studi mutasi gen dan kloning gen pengkode α -amilase maupun glukamilase ke dalam *Saccharomyces cerevisiae* yang diharapkan mampu meningkatkan fungsi kerja *Saccharomyces cerevisiae* dalam mencerna substrat amilum menjadi etanol dalam satu tahap reaksi. Oleh karena itu dibutuhkan gen α -amilase dan glukamilase dalam jumlah yang cukup untuk mencapai tujuan di atas. Penelitian ini bertujuan melakukan penggandaan gen glukamilase melalui PCR dan melakukan karakterisasi hasilnya menggunakan enzim restriksi. Penggandaan α -amilase melalui PCR telah dilakukan oleh Puspaningsih dkk (1998).

Proses penggandaan target DNA lokus gen glukamilase melalui PCR diawali dengan penyiapan DNA *template* (cetakan DNA) dengan cara mengisolasi DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64. Kemudian menentukan urutan nukleotida sepasang pemicu (*primer*) berdasarkan urutan nukleotida gen glukamilase *GLU1* dari *Saccharomycopsis fibuligera* HUT7212 dengan bantuan program *Genmon* 4.1 dan *Primer Detective* 1.0. Sepasang pemicu yang dirancang terdiri dari P1 (20 pb) dan P2 (22 pb) dengan urutan (P1):5'GCGAGGTTCTCTTGGTTTGG3', (P2):5'TGCATGTTCTCCACAAAGG3' Target DNA lokus *GLU1* berukuran 1784 pb (urutan nukleotida nomor 144 sampai dengan 1927).

Penggandaan dilakukan dengan kondisi denaturasi pada temperatur 95°C selama 1 menit, *annealing* pada temperatur 55°C selama 1 menit dan *extension* pada temperatur 72 °C selama 2 menit. Jumlah siklus adalah 35 dengan 1 kali pemantapan *extension* pada temperatur 72 °C selama 5 menit. Sebagai cetakan DNA (DNA *template*) adalah DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 hasil isolasi. Sebagai kontrol positif digunakan DNA plasmid rekombinan pSf *GLU1*. Karakterisasi hasil PCR dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *Stu1*, *Eco RV*, *Eco RI*, *Bam HI* dan *Sau 3A*.

Hasil isolasi DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB. R.. cc. 64. mempunyai kadar 6615 ng/ μ l dan kemurnian 1,8. Hasil penggandaan target DNA lokus *GLU1* menunjukkan bahwa fragmen DNA 1784 pb lokus *GLU1 Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 telah diperoleh dan menunjukkan ukuran yang sama dengan kontrol positif pSf *GLU1*. Karakterisasi fragmen DNA 1784 dengan enzim restriksi *StuI*, *Eco RV*, *Eco RI*, *Bam HI* dan *Sau 3A* memberikan hasil pemotongan yang sama juga dengan fragmen pSf *GLU1* yang digunakan sebagai pembanding. Karakterisasi hasil PCR menunjukkan bahwa fragmen DNA 1784 tidak terpotong dengan enzim restriksi *StuI* dan *Eco RI*, pemotongan dengan enzim *Eco RV* menghasilkan 2 fragmen DNA yang mempunyai ukuran ± 997 pb dan ± 787 pb, pemotongan dengan enzim *Bam HI* menghasilkan 2 fragmen DNA yang mempunyai ukuran ± 1000 pb dan ± 780 pb, dan pemotongan dengan enzim *Sau 3A* menghasilkan 2 fragmen DNA yang mempunyai ukuran ± 850 pb dan ± 760 pb. Untuk penelitian berikutnya disarankan untuk melakukan penentuan urutan nukleotida fragmen DNA 1784 pb hasil penggandaan melalui PCR tersebut dan melakukan uji ekspresi gen glukamilase.

ABSTRACT

A research has been done on *Endomycopsis fibuligera* ITB . R. cc. 64 of glucoamylase gene *GLUI* , which can be amplified by PCR. The purpose at this research is to know the primer which was designed from nucleotide sequence of glucoamylase gene (*GLUI*) *Saccharomycopsis fibuligera* HUT 7212 by *Genmon 4.0* and *Primer Detective 1.0* computer program can amplify glucoamylase gen (*GLUI*) *Endomycopsis fibuligera* ITB . R. cc. 64 and to know recognition site of PCR product with restriction enzymes. The amplification are conducted under the denaturation 95°C for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes. Number of cycles of 35 with addition of 1 cycle at 72°C for 5 minute. Characterization of PCR product was done by using restriction enzyme *StuI*, *Eco Rv*, *Eco RI*, *Bam HI* and *Sau 3A*. The result of amplification glucoamylase gene (*GLUI*) indicated that 1784 bp DNA fragmen on *GLUI* locus has succesfully isolated and gave the same size with the positive control pSf *GLUI*. Analysis of those DNA fragmen by *StuI*, *Eco RV*, *Eco RI*, *Bam HI* and *Sau 3A* indicated that 1784 bp of DNA fragmen from *E. fibuligera* ITB.R.cc.64. has the same result with 1784 bp of DNA fragmen from pSf *GLUI*. The result of the fragments after incubated by restriction enzymes are as follows : ± 997 bp and ± 787 bp (*Eco RI*), ± 1000 bp and ± 1780 bp (*Bam HI*) and ± 850 bp and 760 bp (*Sau 3A*). Digestion using *Stu I* and *Eco RI* was failed. To ensure that the DNA fragmen 1784 bp has characteristic as glucoamylase gene, it should be expressed into *Saccharomyces cerevisiae* and/or should be determined the nucleotide sequence by DNA sequencing.

Key Words : glucoamylase gene, *Endomycopsis fibuligera*, amplification, PCR

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	vii
Abstrak	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan Umum <i>Endomycopsis fibuligera</i>	5
2.1.1. Amilase	8
2.1.2. Glukoamilase	11
2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	11
2.2.1. Konsentrasi enzim DNA <i>Taq Polimerase</i>	13
2.2.2. Deoxynukleotide triphosphate (dNTP)	13
2.2.3. Konsentrasi MgCl ₂	15
2.2.4. Suhu dan waktu denaturasi	15
2.3. Endonuklease Restriksi	15
2.4. Urutan Nukleotida gen <i>GLU1 S. fibuligera</i> HUT7212	18
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	20
BAB 4 METODE PENELITIAN	22
4.1. Rancangan Penelitian	22
4.2. Sampel Penelitian	22
4.3. Bahan – Bahan.....	22
4.4. Instrumen Penelitian	22
4.5. Metode Kerja	23
4.5.1. Uji pendahuluan aktivitas amilase dari <i>E.fibuligera</i> ITB. R. cc. 64	23
4.5.2. Penanaman biakan <i>E. fibuligera</i> ITB. R. cc. 64.....	23
4.5.3. Isolasi DNA kromosom <i>E. fibuligera</i> ITB. R. cc. 64	23
4.5.4. Perancangan pemicu (<i>primer</i>) DNA	24
4.5.5. Penggandaan Gen Glukoamilase	25
4.5.6. Karakterisasi Fragmen 1784 pb DNA lokus <i>GLU1</i> <i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64	26
4.6. Analisis Data dan Penafsiran Hasil Penelitian	26

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
5.1. Uji Pendahuluan Aktivitas Amilase <i>E. fibuligera</i> ITB. R. cc. 64.....	27
5.2. Isolasi DNA Kromosom dari <i>E. fibuligera</i> ITB. R. cc. 64	28
5.3. Perancangan Pemicu (<i>primer</i>)	31
5.4. Penggandaan Gen Glukoamilase <i>E. fibuligera</i> ITB. R. cc. 64	32
5.5. Karakterisasi Fragmen 1784 pb DNA lokus GLU1 <i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64.....	34
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	38
6.1. Kesimpulan	38
6.2. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Karakteristik Amilase	10
Tabel 2.2. Hubungan jumlah molekul templat dan jumlah siklus PCR	13
Tabel 2.3. Urutan pengenalan (recognition sequences) enzim restriksi	18
Tabel 5.1. Hasil pemotongan fragmen DNA 1784 pb dengan enzim restriksi	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Morfologi <i>Endomycopsis fibuligera</i> (Krueger, Rij, 1989).....	5
Gambar 2.2. Struktur sel Khamir (Prescoff,S.C, dan Dunn, C.G., 1959)	6
Gambar 2.3. Skema mekanisme hidrolisa pati oleh amilase (Crueger, W. dan Crueger, A., 1991)	9
Gambar 2.4. Bagan proses tiap siklus dalam PCR	14
Gambar 2.5. Urutan nukleotida gen <i>GLU1</i> dari <i>S. fibuligera</i> HUT7212 ...	19
Gambar 5.1. Penampakan aktivitas enzim amilase pada media padat YPS dengan pewarnaan uap I ₂	27
Gambar 5.2. Hasil elektroforesis gel agarosa 2%.....	30
Gambar 5.3. Elektroforesis gel agarosa 2% hasil fragmen DNA 1784 pb hasil PCR oleh enzim restriksi.....	35

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Produksi etanol dari bahan baku amilum memerlukan dua tahap reaksi. Pertama, perubahan amilum menjadi glukosa terutama dilakukan oleh enzim α -amilase dan glucoamilase yang bekerja secara sinergis.). Kedua, fermentasi glukosa menjadi etanol yang dilakukan oleh *Saccharomyces cerevisiae* Kedua tahap reaksi tersebut diperlukan karena mikroba utama untuk produksi etanol, yaitu *Saccharomyces cerevisiae* tidak mampu mengubah secara langsung amilum menjadi etanol. Hal ini disebabkan *Saccharomyces cerevisiae* tidak menghasilkan enzim α -amilase dan glucoamilase (Godfrey,1985). *Saccharomyces cerevisiae* galur YTYD tidak mampu melakukan fermentasi dan tidak menunjukkan aktivitas glucoamilase pada medium amilum. *Saccharomycopsis fibuligera* galur HUT7212 tidak mampu melakukan fermentasi tetapi menunjukkan aktivitas glucoamilase 4.4 unit per ml pada medium amilum. Plasmid pembawa gen glucoamilase yang ditransformasikan ke *S. cerevisiae* mampu melakukan fermentasi dan menunjukkan aktivitas glucoamilase sebesar 5.2 unit per ml. (Yamashita, et al. 1985) *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 mempunyai aktivitas amilase sebesar 15,24 unit/ml. (Baktir, 1991)

Endomycopsis fibuligera atau *Saccharomycopsis fibuligera* adalah salah-satu jenis ragi yang menghasilkan enzim amilase yang terdiri dari ; α -amilase, glucoamilase, dan maltase. *Endomycopsis fibuligera* mempunyai kemampuan yang baik dalam menghasilkan enzim α -amilase maupun glucoamilase.(Futatsugi, M., et al , 1993). Baktir, A. (1991) melakukan biokonversi pati sago menjadi sirup glukosa menggunakan amilase dari *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 yang diamobilisasi dalam matrik gel poliakrilamid. Pemisahan dan karakterisasi amilase dari

Endomycopsis fibuligera menghasilkan empat komponen amilase, tiga komponen memberikan aktivitas sakarifikasi dan satu komponen diduga memberikan aktivitas likuifaksi (Baktir, A. et al., 1997)

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

Studi mutasi gen α -amilase dan glukoamilase perlu dilakukan dalam upaya meningkatkan kualitas protein enzim yang dihasilkan dengan sasaran meningkatkan kemampuan sisi aktif enzim tersebut. Upaya penyisipan gen pengkode α -amilase dan glukoamilase ke dalam *S. cerevisiae* akan dapat meningkatkan fungsi kerja ragi itu dalam mencerna substrat amilum menjadi etanol dalam satu tahap reaksi. Oleh karena itu dibutuhkan sejumlah gen α -amilase glukoamilase yang cukup untuk melakukan studi di atas. Puspaningsih dkk. (1999) telah dapat melakukan penggandaan gen α -amilase *E. fibuligera* ITB R.cc.64 melalui PCR yang kemudian disisipkan pada vektor pMOSBlue-T untuk digunakan sebagai pelacak (*probe*) gen α -amilase.

Penelitian ini bertujuan untuk menggandakan gen glukoamilase *GLU1* *Endomycopsis fibuligera* melalui PCR menggunakan sepasang *primer* yang berfungsi

sebagai pemicu reaksi, yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida dari gen glukoamilase *GLUI Endomycopsis fibuligera* galur HUT7212 yang sudah diketahui urutannya. (Tetsuya Itoh 1987). Diharapkan *primer* yang dirancang ini mampu memicu proses penggandaan gen melalui PCR karena pemilihan urutan pemicu sangat menentukan keberhasilan PCR. Pemotongan fragmen DNA hasil PCR dilakukan menggunakan enzim restriksi dengan tujuan mengetahui karakteristiknya.

PCR adalah teknik penggandaan DNA secara *in-vitro* yang berkembang pesat sejak tahun 1985. Penggandaan gen *GLUI* melalui PCR ini lebih cepat dibandingkan dengan penggandaan gen *GLUI* secara konvensional yaitu melalui plasmid yang berlangsung secara *in-vivo*, dimana memerlukan lebih banyak tahapan dan waktunya lebih lama karena mengikuti waktu pertumbuhan sel induknya. Sedangkan PCR pelaksanaannya jauh lebih mudah karena menggunakan mesin. PCR juga mempunyai kemampuan melipatgandakan walaupun sejumlah kecil fragmen DNA.

Gen glukoamilase hasil penggandaan melalui PCR dapat dimanfaatkan untuk penelitian lebih lanjut yaitu ditentukan urutan nukleotidanya dengan sekuensing, dilakukan uji ekspresi gen glukoamilasanya atau difusikan dengan gen α -amilase. Apabila gen hasil fusi ini dapat di klonkan dan diekspresikan ke dalam *Saccharomyces cerevisiae* maka akan dihasilkan enzim bifungsional yang diharapkan akan mempercepat proses produksi etanol dari bahan baku amilum.

Manfaat yang lain dari penggandaan gen glukoamilase ini adalah studi peningkatan kualitas enzim dengan cara melakukan mutasi pada urutan nukleotida gen glukoamilase, sehingga dari mutasi gen yang dilakukan diharapkan dapat menghasilkan enzim glukoamilase dengan sisi aktif yang lebih meningkat kualitas kerjanya.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut .

1. Apakah gen glukoamilase *GLU1 E. fibuligera* galur ITB R.cc.64 dapat digandakan melalui PCR menggunakan pemicu DNA yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen glukoamilase *GLU1 S. fibuligera* galur HUT7212 ?
2. Bagaimanakah pola potong (karakteristik) amplikon oleh enzim restriksi ?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Menggandakan gen glukoamilase *GLU1 E. fibuligera* galur ITB R.cc.64 melalui PCR menggunakan pemicu DNA yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen glukoamilase *GLU1 Saccharomyopsis. fibuligera* galur HUT7212.
2. Menentukan pola potong (karakterisasi) amplikon dengan enzim restriksi.

1.4. Manfaat Penelitian

Gen glukoamilase *GLU1* hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk studi lebih lanjut tentang mutasi gen sampai diperoleh suatu gen yang mampu mengekspresikan protein/enzim yang lebih unggul dari semula. Selain itu gen ini dapat diklonkan ke ragi lain sehingga diperoleh galur baru yang lebih menguntungkan.

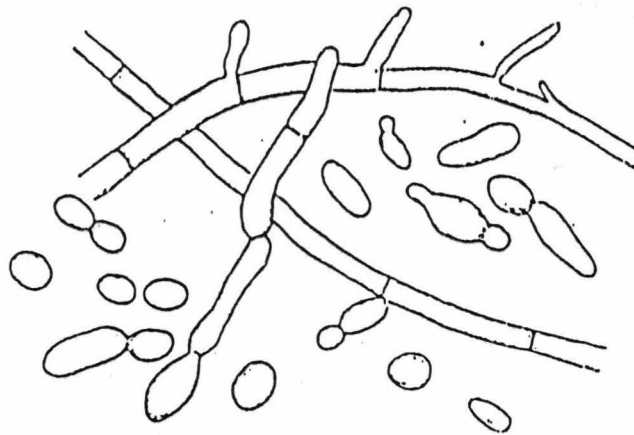
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

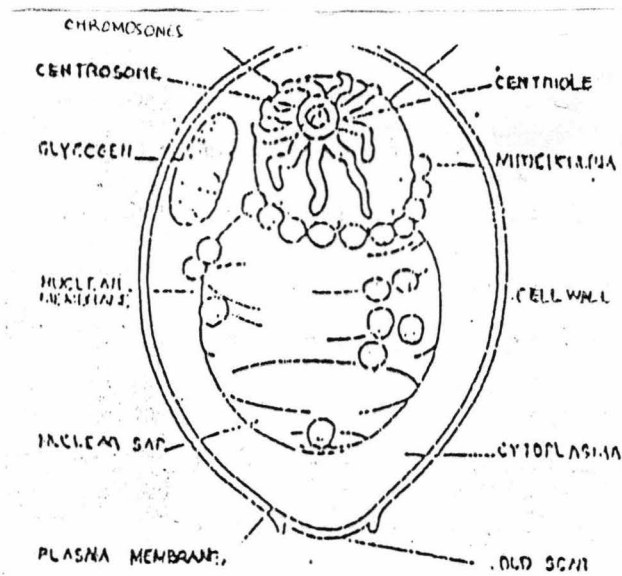
2.1. Tinjauan Umum *Endomycopsis fibuligera*

Endomycopsis fibuligera merupakan salah satu jenis khamir yang menghasilkan enzim amilase, yaitu α -amilase,glukoamilase dan maltase (Kol'stosa and Sadova, 1970). Enzim amilase ini dapat menghidrolisis pati menjadi glukosa sehingga dapat dimanfaatkan untuk pembuatan sirup glukosa.

Bentuk sel *E. fibuligera* adalah oval atau *ellips* dengan ukuran sel (4.2-6,6) x (6-15) μm . Sel berbentuk uniseluler atau dapat pula membentuk pseudomiselium dari pertunasan sel (Gambar 2.1). Struktur sel *E. fibuligera* sama dengan struktur sel khamir lainnya dan dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.1. Morfologi *Endomycopsis fibuligera* (Krueger van Rij,1989)



Gambar 2.2. Struktur sel Khamir (Prescott,S.C. dan Dunn,C.G., 1959)

Reproduksi vegetatif *E. fibuligera* adalah dengan pembelahan binair dan multilateral *budding*. Pembelahan binair sama dengan cara pembelahan bakteri yaitu sel memanjang, intinya membelah dan terbentuklah dua sel baru. Reproduksi dengan pertunasan (*budding*) merupakan metode yang biasa terjadi. Pada proses ini suatu tabung diarahkan ke luar dari vakuola inti sel induk menuju dinding sel terdekat vakuola. Di sana akan terjadi pertunasan kecil di bagian luar dinding yang diikuti dengan perlunakan dinding sel. Tabung akan mendorong pertunasan tersebut dan bersamaan dengan itu tabung akan terisi oleh bahan-bahan inti maupun sitoplasma dari sel induk. Dinding pertunasan terdiri dari bahan-bahan yang baru disintesis. Bila pertunasan telah hampir sama dengan sel induk, terjadi pula pemisahan bagian inti sel induk dan sel anak, kemudian dinding pemisah akan terbentuk dan terpisah antara sel

anak dan sel induk walaupun sering kali tetap melekat dan segera membentuk pertunasan baru. Suatu sel dewasa dapat berreproduksi melalui beberapa kali pertunasan pada tempat yang berlainan di permukaan sel. Multilateral *budding* terbentuk melalui proses ini. (Judoamidjojo et al., 1989).

Reproduksi seksual dengan cara sporulasi, membentuk ascus empat, bentuk ascus adalah bola atau oval dan spora berbentuk topi (*hat shaped*) dengan permukaan halus (Prescott, S.C. dan Dunn, C.G., 1959)

E. fibuligera bersifat fermentatif dan oksidatif. Menurut Sukhumavasi dan Harada (1975) sifat amilase yang dihasilkan *E. fibuligera* mempunyai aktivitas maksimum pada pH 5,5 dan stabil pada pH 4-9 dalam inkubasi 30°C – 40°C selama 30 menit. Enzim stabil pada temperatur 50°C yang diukur dalam buffer 0,1M (pH 5,5), pada inkubasi 80°C aktivitas berkurang.

Menurut Sukhumavasi dan Harada (1975) glukoamilase yang dihasilkan *E. fibuligera* telah luas digunakan dengan bahan baku pati.

Kedudukan *Endomycopsis fibuligera* dalam taksonomi adalah sebagai berikut (Frazier, W.C., Westhoff, D.C., 1978) :

Divisi	: Thallophyta
Subdivisi	: Ascomycotina
Classis	: Hemiascomycetes
Ordo	: Endomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Subfamily	: Saccharomycoidaeae
Genus	: <i>Endomycopsis</i>
Species	: <i>Endomycopsis fibuligera</i>

2.1.1. Amilase

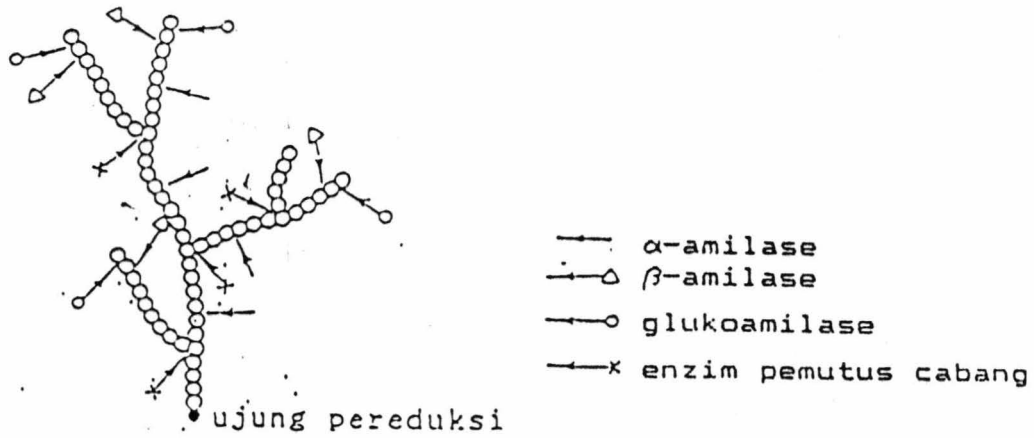
Amilase adalah enzim pemecah molekul pati, glikogen dan polisakarida lain dengan cara menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 dan atau ikatan α -1,6. Dari sudut pandang bioteknologi, amilase dibagi menjadi empat golongan, yaitu α -amilase, β -amilase, glukoamilase dan enzim pemutus cabang (Crueger, W. dan Crueger, A., 1991)

Cara kerja α -amilase adalah menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 secara acak, dengan menyerang substrat pada bagian dalam molekulnya (*endoenzym*). Tidak dapat memutus ikatan glikosidik α -1,6 tetapi ikatan ini tidak menghalangi kerjanya. Karena bekerja secara acak pada banyak tempat di bagian dalam molekul substrat, maka α -amilase dapat menurunkan kekentalan larutan substrat secara cepat, sedang produksi gula pereduksi lambat (Wiseman, A., 1979; Crueger, W. dan Crueger, A., 1991)

Cara kerja β -amilase adalah menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 dari ujung-ujung non pereduksi (*exoenzyme*) secara berseling, sehingga dihasilkan unit-unit maltosa. Tidak dapat menghidrolisis dan melewati ikatan glikosidik α -1,6. Bekerja hanya dari ujung non pereduksi, maka penurunan kekentalan substrat lambat, tetapi produksi gula pereduksi berlangsung agak cepat (Wiseman, A., 1979; Crueger, W. dan Crueger, A., 1991).

Glukoamilase juga disebut amiloglukosidase, termasuk jenis amilase yang menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 dari ujung-ujung non pereduksi (*exoenzyme*) secara berurutan, sehingga dibebaskan unit-unit glukosa. Glukoamilase dapat menghidrolisis dan melewati ikatan glikosidik α -1,6 sehingga dapat diperoleh produk akhir glukosa secara kuantitatif. Karena bekerja hanya pada ujung molekul, maka penurunan kekentalan larutan substrat terjadi secara lambat, sedang produksi gula

pereduksi berlangsung agak cepat (Wiseman, A., 1979; Crueger, W. dan Crueger, A., 1991)



Gambar 2.3. Skema mekanisme hidrolisa pati oleh amilase (Crueger, W dan Crueger, A, 1991)

Enzim pemutus cabang (*debranching enzyme*) hanya menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,6 pada amilopektin dan glikogen. Contoh enzim pemutus cabang adalah pullunase dan isoamilase (Wiseman, A, 1979; Crueger, W dan Crueger, A, 1991)

Berdasarkan produk akhir hidrolisis enzim amilase digolongkan menjadi *saccharifying amylase* dan *liquefying amylase*. Golongan pertama memberikan produk hidrolisis akhir gula bebas, sedangkan golongan kedua memecah molekul pati tetapi tidak menghasilkan gula bebas. Kedua golongan ini dapat dibedakan secara eksperimen (Godfrey, T. dan Reichett, J., 1986)

Saccharifying amylase dapat menghasilkan gula bebas, karena memutus ikatan glikosidik dari ujung-ujung non pereduksi, dan dibebaskan molekul-molekul monomer atau dimer (*exoenzyme*). Contoh golongan ini adalah glucoamilase dan β -amilase (Godfrey, T. dan Reichett, J., 1986)

Liquefying amylase menyerang substrat pada bagian dalam molekulnya, terbentuk oligosakarida dan tidak dihasilkan gula bebas (*endoenzyme*). Enzim-enzim pemutus cabang dan α -amilase termasuk golongan ini (Godfrey, T. dan Reichett, J., 1986).

Endoenzyme dan *exoenzyme* bekerja sama secara simultan dalam degradasi molekul polisakarida. Efek sinergis ini telah dipelajari menggunakan model persamaan kinetik terhadap α -amilase dan glukamilase. Disimpulkan bahwa α -amilase meningkatkan kecepatan pembentukan glukosa dengan cara mensuplai ujung-ujung non-pereduksi baru yang merupakan substrat bagi glukamilase (Fujii, M. dan Kawamura, Y., 1985).

Tabel 2.1.. Karakteristik Amilase (Crueger, W. dan Crueger, A., 1991)

Karakteristik	α -Amilase	β -Amilase	Glukoamilase	Pemutus cabang
Hidrolisis α -1,4	+	+	+	-
Hidrolisis α -1,6	-	-	+	+
Kemampuan melewati cabang	+	-	pemutusan ikatan	pemutusan ikatan
Konfigurasi C ₁ Pada produk	α	β	β	-
Mekanisme penyerangan substrat	endo	ekso	ekso	-
Penurunan kekentalan substrat	cepat	lambat	cepat	-
Produksi gula Pereduksi	lambat	cepat	cepat	-
Intensitas warna Produk dengan I ₂	↓cepat	↓lambat	↓lambat	↑

2.1.2. Glukoamilase

Glukoamilase jarang sekali ditemukan dalam bakteri, tetapi dihasilkan oleh beberapa genera fungi. Secara komersial diperoleh dari *Aspergillus niger*, *A. Oryzae*, *A. awamori*, *Rhizopus niveus*, *R. delemar*, *R. formosaensis*, *R. javanicus* serta genera *Endomyces*. Glukoamilase adalah glikoprotein, dengan berat molekul berkisar 60.000 – 10.000 (Crueger, W dan Crueger, A., 1991). Glukoamilase yang berasal dari *A. niger* dan *R. delemar* mengandung 13% karbohidrat (Pazur dan Okada, 1967). Glukoamilase dari *Rhizopus* dan *Aspergillus* mengandung manosa, glukosa, galaktosa dan asam uronat (Wiseman, A., 1985).

Kadang-kadang satu strain menghasilkan beberapa isomer enzim glukoamilase. Isomer enzim dapat terbentuk akibat modifikasi enzim selama proses fermentasi. Sebagai contoh, *A. awamori* var. *kawachii* menghasilkan tiga jenis glukoamilase, akibat kerja protease dan glikosidase yang terdapat pada kondisi eksperimen. Satu dari ketiga glukoamilase tersebut dapat menghidrolisis pati jagung yang masih mentah, sedang dua yang lain bekerja pada molekul pati yang telah digembungkan dengan pemanasan (Crueger, W dan Crueger, A., 1991). Hal yang menarik pada kebanyakan glukoamilase adalah kemampuannya menghidrolisis granul pati mentah. Sehingga memungkinkan hidrolisis pati tanpa gelatinasi yang memerlukan temperatur tinggi. Dalam industri, hal demikian akan mengurangi ongkos tinggi akibat penggunaan energi yang berlebihan (Priest, F.G., 1984).

2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sejak ditemukannya teknik amplifikasi DNA secara invitro yang disebut PCR pada tahun 1985 oleh Carry Mullis, maka perkembangan biologi molekular sangat pesat. Kemampuan PCR dalam melipatgandakan sejumlah kecil fragmen DNA

tertentu dapat menyederhanakan prosedur dalam melakukan kloning fragmen DNA tunggal dari DNA genom (Scharf, 1990). Kemampuan tersebut telah digunakan dalam mengklasifikasi gen amilase berbagai tanaman (Huang, N. et al., 1992). Pada dasarnya, PCR adalah proses replikasi DNA. Oleh karena itu proses dan kondisinya adalah sama. Sebagaimana pada replikasi DNA diperlukan urutan nukleotida tertentu, maka pada PCR urutan nukleotida tersebut juga ada yang disebut dengan pemicu (*primer*). Selain itu diperlukan pula komponen-komponen lain, seperti dNTP (deoxynucleotide triphosphate) dan enzim DNA polimerase (Innis dan Gelfand, 1990).

Metoda dasar PCR ada tiga tahap, yaitu denaturasi DNA cetakan (*template*) biasanya pada suhu $92,5^{\circ}\text{C} - 97,5^{\circ}\text{C}$, *primer annealing* pada suhu $55^{\circ}\text{C} - 72^{\circ}\text{C}$ tergantung dari T_m (*melting temperatur*) oligonukleotida pemicu dan pemanjangan rantai (*extension*) pada suhu 72°C oleh enzim DNA *polymerase*. Proses tersebut diulang beberapa kali sampai dapat diamati secara jelas berupa pita DNA pada elektroforesis gel agarosa. Bagan proses tiap siklus dalam PCR dapat dilihat pada Gambar 2.4.

Jika siklus diulang beberapa kali, maka daerah DNA yang dibatasi oleh dua *pemicu* akan diamplifikasi secara eksponensial yang hasil akhirnya (disebut *amplikon*, berupa DNA untai ganda) dapat dirumuskan sebagai $(2^n - 2n)x$, dengan n adalah jumlah siklus, $2n$ adalah hasil pertama yang diperoleh setelah siklus pertama dan hasil kedua yang diperoleh setelah siklus kedua dengan panjang tidak tertentu, dan x adalah jumlah *salinan* (atau molekul) DNA cetakan (Newton dan Graham, 1994). Dengan demikian satu molekul DNA yang diamplifikasi sebanyak 20 siklus akan menghasilkan sekitar $(2^{20} - 40)$ *amplikon* yang dapat diamati secara jelas berupa pita DNA pada elektroforesis gel agarosa. Banyaknya siklus yang disarankan untuk



masing-masing jumlah salinan (kopi) atau molekul cetakan dapat dilihat pada Tabel

2.2. (Innis dan Gelfand, 1990)

Tabel 2.2. Hubungan jumlah molekul cetakan dan jumlah siklus PCR

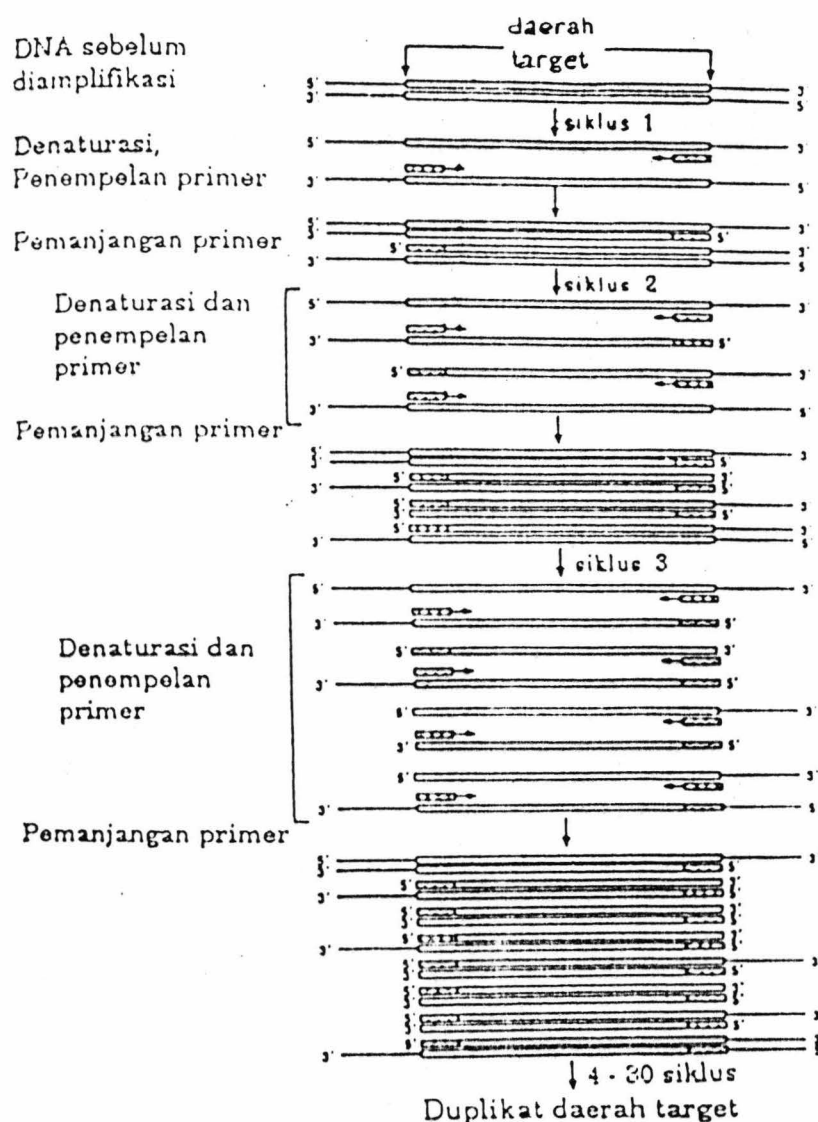
Jumlah molekul cetakan	Jumlah siklus
$3,0 \times 10^5$	25 – 30
$1,5 \times 10^4$	30 – 35
$1,0 \times 10^3$	35 – 40
50	40 - 45

2.2.1. Konsentrasi enzim DNA *Taq Polymerase*

Konsentrasi enzim DNA *Taq polymerase* yang digunakan adalah antara 1 – 2,5 unit per 100 μ l reaksi bila parameter lain telah optimum. Konsentrasi enzim yang tidak optimal akan menyebabkan munculnya produk yang tidak diharapkan, yaitu munculnya pita yang non spesifik (bila konsentrasi terlalu banyak) atau produk yang dihasilkan tidak mencukupi (bila konsentrasi enzim terlalu sedikit). Perlu pula diperhatikan bahwa DNA polimerase dari pabrik yang berbeda kemungkinan memiliki formula yang berbeda pula, sehingga hal itu tidak dapat digeneralisasi. (Innis dan Gelfand, 1990).

2.2.2. Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)

Selain enzim, maka dNTP yang digunakan juga harus diperhatikan. Keempat jenis dNTP tersebut harus mempunyai jumlah yang sama dengan konsentrasi yang tidak terlalu rendah. Konsentrasi umum yang digunakan adalah antara 2,5 mM untuk



Gambar 2.4. Bagan proses tiap siklus dalam PCR.

Daerah target yang berupa DNA untai ganda dipisahkan secara denaturasi termal menjadi DNA untai tunggal. Temperatur kemudian diturunkan agar pemicu menempel (*annealing*) pada daerah spesifik DNA target untai tunggal. DNA polimerase kemudian digunakan untuk pemanjangan pemicu (*extension*) dengan adanya empat dNTP dan bufer yang cocok. Dengan cara demikian akan dihasilkan duplikat daerah target DNA untai ganda. Proses siklus ini berulang diulang sebanyak 20 - 40 kali sampai diperoleh DNA target untai ganda yang dapat diamati secara jelas pada elektroforesis gel agarosa (Sumber : Newton dan Graham, 1994)

masing-masing jenis dNTP. Konsentrasi yang terlalu besar akan menyebabkan besarnya kesalahan pada urutan yang akan digandakan (Innis dan Gelfand, 1990).

2.2.3. Konsentrasi $MgCl_2$

Optimalisasi konsentrasi $MgCl_2$ dalam proses PCR penting dilakukan. Konsentrasi $MgCl_2$ dapat mempengaruhi penempelan pemicu, suhu disosiasi rantai baik pada DNA cetakan maupun produk PCR, spesifisitas produk dan ketepatan aktivitas enzim polimerase. Konsentrasi $MgCl_2$ yang baik adalah berkisar antara 1,5 – 2,5 mM. Adanya EDTA pada stok pemicu maupun DNA cetakan akan mengganggu kerja optimal dari $MgCl_2$ (Innis dan Gelfand, 1990).

2.2.4. Suhu dan waktu denaturasi

Hal lain yang perlu diperhatikan adalah denaturasi. Bila denaturasi tidak sempurna dapat menyebabkan tidak terjadinya produk amplifikasi yang diharapkan. Hal ini disebabkan karena DNA akan cepat berpasangan kembali atau pemicu tidak menempel. Sedangkan bila denaturasi terlalu lama dapat menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Menurut Gelfand dan White (1990), Taq DNA polimerase mempunyai waktu paruh 40 menit pada suhu $95^{\circ}C$ dan 5 – 6 menit pada suhu $97,5^{\circ}C$. Aktivitas enzim ini juga akan menurun dengan bertambahnya jumlah siklus PCR.

2.3. Endonuklease Restriksi

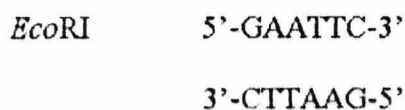
Endonuklease restriksi tipe II (disebut enzim restriksi) sering digunakan dalam proses kloning gen. Hal ini disebabkan enzim restriksi ini mempunyai ciri utama bahwa tiap enzim mengenal urutan spesifik pada molekul DNA yang akan dipotong.

Enzim tertentu akan memotong DNA pada urutan pengenalan dan tidak pada tempat lain. Enzim ini stabil dan hanya memerlukan Mg^{2+} sebagai kofaktor (Winnacker, L.E., 1987).

Enzim restriksi telah diisolasi dari lebih 200 bakteri, oleh karena itu penamaan enzim tersebut diwakili oleh 3 kata kode yang diturunkan dari nama genus bakteri tempat enzim diisolasi, misalnya *Hae*, enzim yang diisolasi dari *Haemophilus aegypticus* dan *Sma* yaitu enzim yang diisolasi dari *Serratia marcescens*. Perbedaan serotipe dari organisme yang sama diidentifikasi dengan penambahan huruf keempat. *Hinf*, merupakan serotipe f dari *Haemophilus influenza*. Oleh karena memungkinkan untuk mengisolasi dua atau lebih enzim dari bakteri yang sama, maka perbedaan satu dengan yang lain dilakukan dengan cara memberi nomor romawi, misalnya *HaeII*, *HaeIII* dan lain-lain (Brown, T.A., 1991)

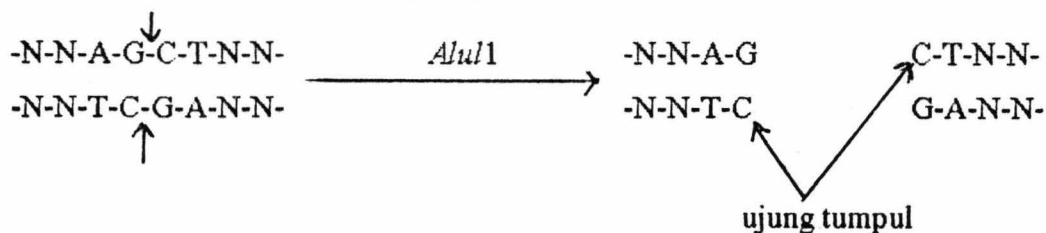
Kebanyakan endonuklease restriksi tipe II mengenal urutan tetra, penta dan heksanukleotida dari DNA. Urutan pengenalan tersebut biasanya ditulis dari kiri ke kanan dengan awalan 5' ke 3'. Contoh GAATTC mewakili urutan 5'-GAATTC-3'. Sisi pengenalan tersebut secara mayoritas mengenali urutan yang palindrom, yaitu bila mengenali kedua untai maka pada tiap untai akan terbaca dalam arah yang sama

contoh



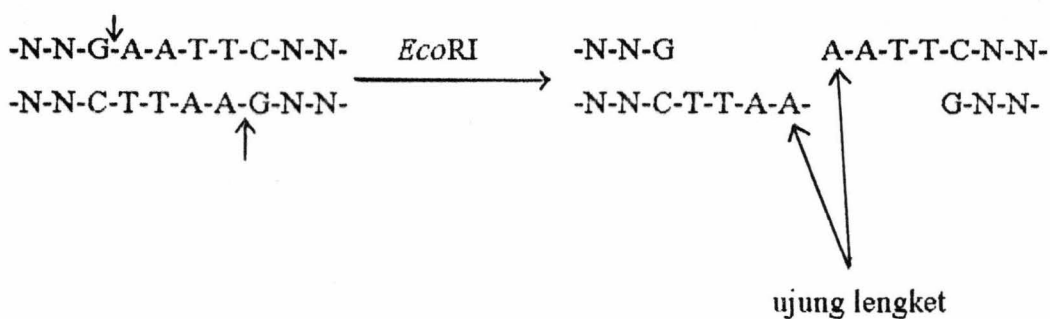
Pemutusan hidrolitik dua rantai DNA oleh enzim restriksi terjadi di dalam pengenalannya, sehingga dapat menghasilkan ujung tumpul atau ujung lengket dimana ujung 3' akan membawa gugus -OH, sedangkan ujung 5' membawa gugus fosfat (Winnacker, L.E., 1987).

a. Pemotongan dengan hasil ujung tumpul



N: A, T, G atau C

b. Pemotongan dengan hasil ujung lengket



c. Ujung lengket yang sama dihasilkan oleh enzim restriksi berbeda

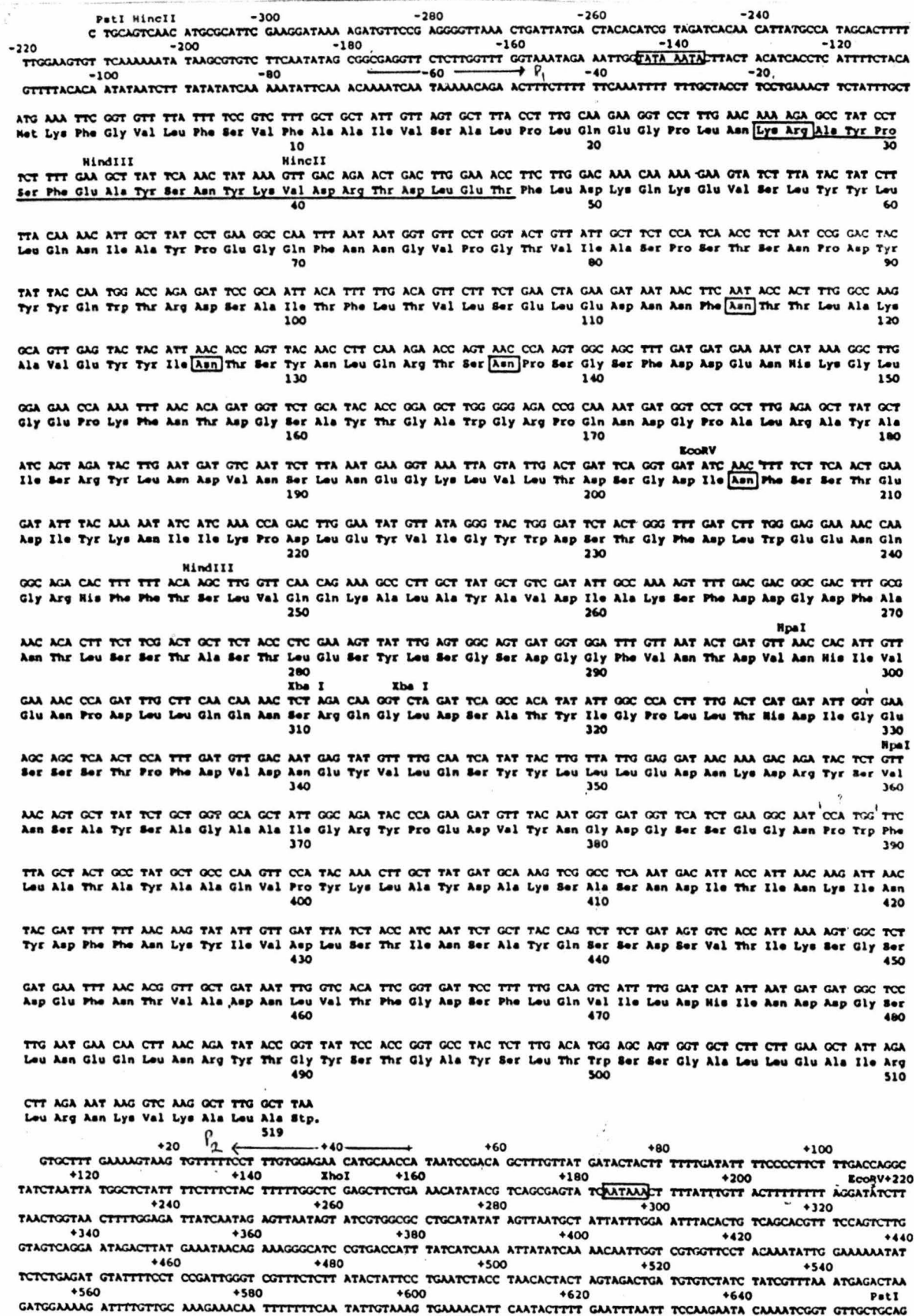
<i>Bam</i> HI	-N-N-G -N-N-C-C-T-A-G	G-A-T-C-C-N-N- G-N-N-
<i>Bgl</i> II	-N-N-A -N-N-T-C-T-A-G	G-A-T-C-T-N-N- A-N-N-
<i>Sau</i> 3A	-N-N-N -N-N-N-C-T-A-G	G-A-T-C-N-N-N- N-N-N-

Tabel 2.3. Urutan pengenalan (recognition sequences) beberapa enzim restriksi (Shahib, N., 1990)

Enzim	Organisme	urutan Pengenal	jenis ujung
<i>Eco RI</i>	<i>E. Coli</i>	G↓AATCC	lengket
<i>Eco RV</i>	<i>E. Coli</i>	GAT↓ATC	lengket
<i>Bam HI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G↓GATCC	lengket
<i>Sau 3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GA↓TC	lengket
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	A↓AGCTT	lengket
<i>Pvu II</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAG↓CTG	tumpul
<i>Bgl</i>	<i>Bacillus globigii</i>	A↓GATCT	lengket
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG↓CT	tumpul
<i>Hae III</i>	<i>Haemphilus aegyptius</i>	GG↓CC	tumpul

2.4. Urutan Nukleotida gen *GLU1 Saccharomyopsis fibuligera* HUT7212

Urutan nukleotida gen glukamilase *GLU1* dari *Saccharomyopsis fibuligera* HUT7212 telah ditentukan oleh Tetsuyab Itoh et al, (1987) menggunakan subklon M13 dengan metode dideoxy-Sanger. Gen *GLU1* ini terdiri dari fragmen DNA 2538 pb yang diekspresikan dalam *S. cerevisiae* untuk menghasilkan glukamilase yang disekresi. Kerangka baca terbuka (open reading frame) yang unik diidentifikasi dari nukleotida -57 sampai 1557. Urutan peptida yang mengandung 519 asam amino juga diperlihatkan pada Gambar 2.5

Gambar 2.5. Urutan nukleotida gen *GLU1* dari *S. fibuligera* HUT7212

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

Penggandaan Gen Glukoamilase Melalui Teknik PCR

Endomyopsis fibuligera ITB R.cc.64

isolasi

Tahap-tahap PCR

DNA kromosom ← 1. Penyiapan cetakan DNA

(mengandung gen glukoamilase)

-uji elektroforesis gel

- ditentukan kadarnya

2. Perancangan *primer* (*Genmon & P.D*)

- ditentukan kemurniannya

3. Sintesis *primer* (P1 dan P2)

Penggandaan ← 4. Menentukan kondisi optimum PCR

Gen glukoamilase

-konsentrasi ion Mg^{2+}

melalui PCR

-konsentrasi cetakan DNA

-Konsentrasi enzim Taq

-suhu denaturasi

-suhu *annealing*

-suhu *extension*

Fragmen DNA gen glukoamilase hasil PCR

-uji elektroforesis gel dibandingkan dengan kontrol positif *pSjGLU1*

-karakterisasi fragmen DNA gen glukoamilase hasil PCR dengan enzim restriksi

Uraian :

- *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 adalah organisme hidup dari jenis ragi yang menghasilkan enzim glukoamilase dan α -amilase .
- DNA kromosom adalah DNA yang berhubungan dengan sifat-sifat hereditas, diisolasi dari *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 dan diperlukan sebagai cetakan penggandaan gen glukoamilase pada teknik PCR.
- Teknik PCR adalah teknik penggandaan fragmen DNA dari gen tertentu secara in vitro, dapat digunakan untuk identifikasi suatu gen dan menyederhanakan proses kloning gen.
- Perancangan *primer* adalah penentuan urutan sepasang oligonukleotida yang dalam penelitian ini akan digunakan sebagai pemicu dalam perpanjangan rantai DNA gen glukoamilase melalui PCR.
- Program *Genmon* dan *Primer Detective* adalah program yang sudah digunakan secara luas dalam perancangan pemicu dibidang biologi molekuler.
- Sintesis *primer* adalah sintesis rantai oligonukleotida dengan DNA *synthesizer*.
- Kondisi optimum PCR adalah kondisi konsentrasi DNA cetakan , konsentrasi $MgCl_2$, suhu *annealing* dan suhu ekstensi yang harus ditentukan besarnya agar produk PCR optimal.
- Elektroforesis gel adalah metode untuk mendeteksi adanya fragmen DNA.
- Enzim restriksi digunakan untuk memotong DNA pada sisi urutan pengenalnya (sisi potongnya)

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental laboratoris

4.2. Sampel Penelitian

Endomycopsis fibuligera ITB. R.cc.64, biakan *E. fibuligera* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Teknik Kimia ITB, Bandung. Plasmid *pSfGLU1* diperoleh dari Dr. Ichiro Yamashita, *Departemant of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University*.

4.3. Bahan-Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai kemurnian untuk standar biologi molekuler. Diantaranya adalah : *yeast extract*, sukrosa, agarosa, etanol, kloroform, isoamil alkohol, *proteinase K*, *RNAse*, dNTP, enzim *Taq polymerase*, $MgCl_2$, enzim restriksi dan lain-lain.

4.4. Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan berupa alat-alat gelas dan non gelas yang biasa dipakai di laboratorium Jurusan Kimia, Biologi FMIPA Unair dan laboratorium TDC-FK Unair. Alat-alat tersebut antara lain : *shaker incubator*, *freezer*, *gel electrophoresis Bio-rad*, *fotometri uv Shimadzu-*, *micro centrifuge*, *autoclave*, neraca analitik, , cawan petri, *homogenizer*, *laminar air flow cabinet*, *PCR Thermal cycler Bio-rad*, *vortex*, komputer dan lain-lain.

4.5. Metode Kerja

4.5.1. Uji pendahuluan aktivitas amilase dari *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64

Masing-masing koloni tunggal *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 dan *Saccharomyces cerevisiae* W303a ditumbuhkan dalam media YPS padat (yeast extract 1% , bacto peptone 2%, pati terlarut 3% dan bacto agar 2%). Biakan diinkubasi pada suhu 30⁰ C selama 2 hari. Diamati terbentuknya daerah bening di sekitar koloni tersebut setelah pewarnaan dengan uap iodium.

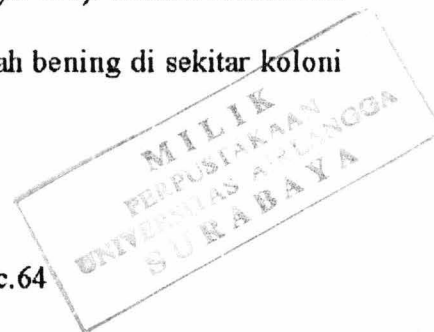
4.5.2. Penanaman biakan *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64

Peremajaan biakan *Endomycopsis fibuligera* galur ITB.R.cc.64 dilakukan dengan memindahkan stok biakan lama ke dalam medium padat sukrosa tauge (sukrosa 6%, ekstrak tauge 10%, agar 2%) dalam tabung miring secara aseptis. Biakan diinkubasi pada suhu 30⁰ C selama dua hari.

Biakan *Endomycopsis fibuligera* dalam media padat dinokulasikan dengan ose ke dalam 20 ml medium cari (sukrosa 6%, ekstrak tauge 10%), kemudian dikocok selama 16 jam pada suhu 30⁰ C, pada kecepatan 200 rpm. 5% inokulum selanjutnya dipindahkan ke dalam medium cair satu liter, dikocok selama 16 jam pada suhu dan kecepatan yang sama untuk digunakan dalam isolasi DNA kromosom.

4.5.3. Isolasi DNA kromosom dari *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64

Sel dipanen dengan sentrifugasi pada suhu 20⁰C, kecepatan 10.000 rpm. Pelet sel dicuci dua kali dengan larutan SSC (NaCl 0,15 M dan Na₃ - sitrat, 0,015M), kemudian satu kali dengan larutan saline-EDTA-SDS (NaCl 0,15M, EDTA 0,1M, SDS 2%, pH 8,0) dan dibekukan pada suhu -20⁰ C. Setelah mencair pada suhu kamar, sejumlah volume sel disuspensi dengan sejumlah volume yang sama dengan larutan



saline-EDTA-SDS dan dihomogenisasi selama 2 menit. Homogenat diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 4 jam dan ditambah larutan NaClO₄ sampai konsentrasi akhir 1 M, diinkubasi kembali pada suhu 60⁰ C selama 10 menit. DNA diekstraksi dari homogenat dengan sejumlah volume yang sama, kloroform : isoamil alkohol (24 : 1). Campuran dikocok selama 30 menit, disentrifugasi 4000 rpm 10 menit dan supernatan diperlakukan lagi dengan campuran kloroform : isoamil alkohol. DNA diendapkan dengan menambah dua kali volume etanol dingin. Pelet DNA yang diperoleh disuspensikan dalam larutan SSC dan ke dalam larutan tersebut ditambah NaCl sampai konsentrasi akhir 1M. Selanjutnya ke dalam suspensi tersebut ditambahkan *proteinase K* 1 mg/ml dan diinkubasi pada suhu 60⁰ C 4 jam. Kemudian ditambah *RNAse* 100 µg/ml dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C 30 menit. Perlakuan *proteinase K* diulang kembali. Kontaminan protein dihilangkan dengan ekstraksi kloroform : isoamil alkohol 3 sampai 4 kali dan DNA diendapkan dengan menambah 2 kali volume etanol dingin, disentrifugasi dan supernatannya dibuang. Endapan dilarutkan dengan sodium asetat 3M pH 5,2 diendapkan kembali dengan 2 kali volume etanol dingin, disentrifugasi dan endapannya dibuang. Pelet DNA dilarutkan dalam bufer TE.

4.5.4. Perancangan Pemicu (*Primer*) DNA

Pemicu dirancang atas dasar urutan nukleotida gen glukoamilase *GLUI* *Endomycopsis fibuligera* (Yamashita, I. et al., 1987). Perancangan pemicu dilakukan dengan bantuan program komputer *Genmon* versi 4.1. dan *Primer Detective* versi 1.0 (Lab. Rekayasa Genetika PAU-Bioteknologi ITB Bandung). Daerah yang dipilih adalah daerah *coding sequence* dan akan ditentukan sepasang pemicu. Mula-mula memasukkan urutan nukleotida lengkap fragmen DNA 2538 pb *Saccharomycopsis fibuligera* HUT7212 yang mengekspresikan gen glukoamilase ke program *Primer*

Detective 1.0. Kemudian memasukkan parameter-parameter untuk penentuan urutan pemicu seperti pada tampilan Lampiran 2. Dengan pengisian parameter di atas kita akan memperoleh beberapa pasang urutan nukleotida pemicu (*sense dan antisense primer*). Dari beberapa pasang dipilih sepasang yang homologinya paling rendah (<60%). Uji homologi dilakukan menggunakan program *Genmon 4.1* (data pada Lampiran 2). Sepasang pemicu P1 dan P2 selanjutnya disintesis oleh GENSET Singapore Biotech. Pte. Ltd. dengan data pada Lampiran 3. Selanjutnya pemicu ini akan digunakan dalam perpanjangan DNA target pada proses PCR.

4.5.5. Penggandaan Gen Glukoamilase

Penggandaan DNA target pada lokus gen glukoamilase dilakukan terhadap cetakan DNA *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64 dan dilakukan uji kontrol positif menggunakan gen glukoamilase yang disisipkan dalam plasmid (*pSfGLU1*). Ditentukan terlebih dahulu kondisi optimum reaksi PCR yang meliputi : konsentrasi cetakan DNA, konsentrasi $MgCl_2$, suhu *annealing* dan suhu ekstensi. Selanjutnya digandakan dalam 35 siklus dengan alat PCR *Thermal Cycler Bio-rad*, USA

Sebagai pedoman, kondisi umum reaksi PCR dapat digambarkan sebagai berikut .Untuk 50 μ l reaksi diperlukan :

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

Dari kondisi umum ini akan ditentukan kondisi optimal reaksi PCR untuk penggandaan gen glukamilase dari DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB R.cc.64.

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

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

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

4.6. Analisis Data Dan Penafsiran Hasil Penelitian

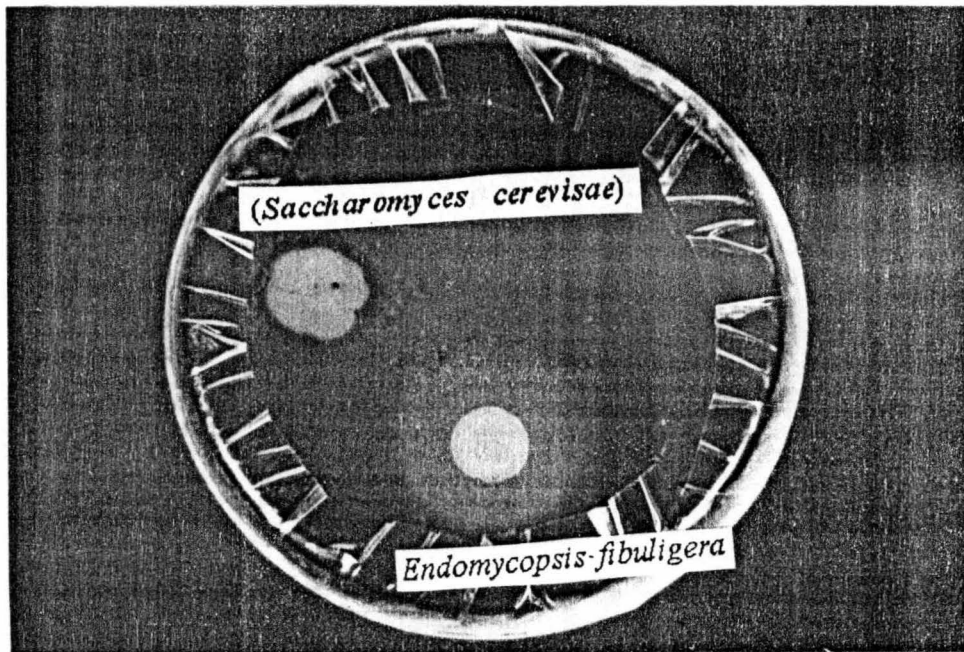
Analisis dan penafsiran hasil penelitian didasarkan pada hasil PCR dan hasil pemotongan dengan enzim restriksi yang telah diaplikasikan pada elektroforesis gel, divisualisasi dengan UV λ_{320} - etidium bromide, didokumentasi dengan foto polaroid dan diperkirakan ukuran ampikonnya dengan pita DNA standar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

BAB 5

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Uji Pendahuluan Aktivitas Amilasei *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64

Secara teori, *E. fibuligera* dapat menghasilkan enzim amilase, sehingga organisme ini mampu mencerna substrat pati (Godfrey, 1985). Kemampuan *E. fibuligera* dalam mencerna amilum dapat diamati dengan cara menumbuhkan koloni *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 ke dalam media YPS padat. Sebagai pembanding digunakan koloni *S.cerevisiae* W303a. yang tidak menghasilkan amilase. Setelah pewarnaan dengan uap iodium, hasil menunjukkan bahwa *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 terbukti dapat mencerna substrat pati. Hal ini ditunjukkan dengan adanya daerah bening di sekitar koloni, sedangkan *S.cerevisiae* W303a tidak mampu mencerna pati dengan tidak terbentuknya daerah bening di sekitar koloninya. Hasil uji aktivitas amilase tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Penampakan aktivitas enzim amilase *E. fibuligera* (bawah) dan *S. cerevisiae* (atas) pada media padat YPS dengan pewarnaan uap I₂

5.2. Isolasi DNA Kromosom dari *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64

Endomycopsis fibuligera ITB.R.cc.64 merupakan suatu mikroorganisme penghasil enzim amilase yang mempunyai aktivitas *saccharifying* dan *liquefying* yang cukup tinggi (Baktir, 1995). Aktivitas *saccharifying* dapat menghasilkan gula bebas, karena memutus ikatan glikosidik dari ujung-ujung non pereduksi dan dihasilkan molekul-molekul monomer atau dimer glukosa. Contoh enzim ini adalah glukoamilase dan β -amilase. Apabila gen pengkode glukoamilase ini dapat diinsersikan dan diekspresikan di *Saccharomyces cerevisiae* atau dimutasi sehingga menghasilkan enzim yang mampu mencerna pati menta, maka manfaatnya sangat besar sekali. Oleh karena itu perlu dilakukan penggandaan gen glukoamilase *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 melalui PCR. Untuk menggandakan gen glukoamilase tersebut langkah yang harus dilakukan adalah mengisolasi DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* galur ITB.R.cc.64 yang akan digunakan sebagai cetakan dalam PCR.

Hasil inkubasi biakan *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 pada medium sukrosa tauge selama 2 hari pada suhu 37°C berupa suspensi sel berwarna putih dengan koloni bulat-bulat dan bermiselium. Karena bermiselium, maka isolasi DNANYA lebih sulit dibanding sel pada umumnya, maka harus digunakan metode isolasi DNA yang tepat. Pada penelitian ini menggunakan metode isolasi DNA kromosom dari Smith & Halvorson yang telah disempurnakan.

Langkah awal yang dilakukan dalam metode ini yaitu mencuci pelet sel dengan larutan SSC dengan tujuan melunakkan dinding sel. Penambahan senyawa kelating EDTA yang terkandung dalam larutan salin-EDTA-SDS dengan tujuan untuk mengikat ion Mg^{2+} yang sangat penting dalam mempertahankan integritas selubung sel. Disamping itu EDTA juga bekerja menghambat enzim yang akan merusak DNA.

Sedang SDS adalah senyawa yang tergolong detergen yang dimaksudkan untuk melisis sel dengan jalan mengikat molekul lipid sehingga membran sel pecah.

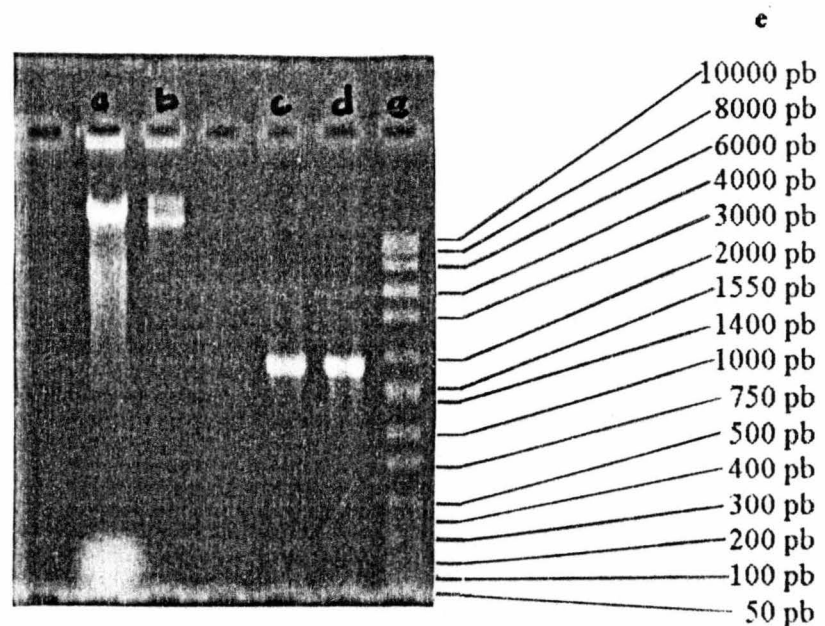
Proses lisis dinding sel selain dilakukan dengan cara kimia seperti di atas maka perlu juga disempurnakan dengan cara mekanis yaitu menggunakan alat homogenizer agar isi sel dapat keluar. Hal ini perlu dilakukan mengingat *Endomycolopsis fibuligera* ITB.R.cc.64 mempunyai dinding sel yang bermiselium. NaClO_4 diperlukan dengan tujuan melepaskan protein dan asam nukleat. Untuk menghilangkan debris sel yang tidak larut, yang terdiri dari komponen-komponen seperti dinding sel dapat dilakukan dengan cara sentrifugasi, sehingga ekstrak kromosom terdapat dalam supernatan yang jernih.

Pada tahap pemurnian ekstrak DNA kromosom perlu ditambahkan kloroform : isoamil alkohol (24:1) untuk menghilangkan protein. Dengan pengocokan yang kuat selama 30 menit diharapkan protein akan terikat pada fasa organik sedang DNA kromosom dalam fasa cair.

Proteinase K ditambahkan untuk memecah polipeptida menjadi unit yang lebih kecil sehingga memudahkan pemisahannya dari DNA kromosom dengan sentrifugasi. Untuk menghilangkan RNA ditambahkan *RNAse* yang sudah diaktifkan dengan pemanasan selama 15 menit pada suhu 75°C . *RNAse* aktif ini akan memecah molekul RNA menjadi sub unit ribonukleotida. Dua ratus mikro liter *RNAse* yang ditambahkan kali ini tidak cukup untuk menghilangkan semua RNA yang terikat saat isolasi. Hal ini tampak jelas pada visualisasi hasil elektroforesis DNA dengan sinar UV pada Gambar 5.2. Walaupun demikian keberadaan RNA ini tidak terlalu mengganggu proses penggandaan DNA melalui PCR, karena hanya DNA target yang akan digandakan.

DNA kromosom diendapkan dengan menambahkan etanol absolut dingin. Karena adanya garam Na pada temperatur -20°C etanol absolut akan mengendapkan DNA kromosom dengan baik. Presipitasi dengan etanol ini mempunyai keuntungan tambahan yaitu tertinggalnya komponen asam nukleat monomer dan rantai pendek dalam larutan. Ribonukleotida yang dihasilkan dengan ribonuklease akan hilang pada tahap ini.

Hasil yang didapat pada proses isolasi DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB. R. cc. 64 divisualisasi dengan elektroforesis gel. Pada pengambilan foto akan diperoleh satu pita dengan ukuran fragmen di atas 10 Kb (Gambar 5.2). Sedangkan kadar DNA yang diukur dengan fotometrik UV sebesar $6615\text{ ng}/\mu\text{l}$ dan kemurnian 1,8.



Gambar 5.2. Hasil elektroforesis gel agarosa 2%
 a. DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB R. cc.64 hasil isolasi
 b. DNA plasmid *psfGLU1* (kontrol positif)
 c. Fragmen DNA hasil PCR *E. fibuligera* ITB.R.cc.64
 d. FragmenDNA hasil PCR *psfGLU1*
 e. Direct Load Wide Range DNA Marker (Katalog. 7058, Sigma)

5.3. Perancangan Pemicu (*Primer*)

Sepasang pemicu (P1 dan P2) dirancang atas dasar urutan nukleotida gen glukamilase *GLU1 Saccharomyces fibuligera* galur HUT7212 (Itoh, T., 1987) yang diharapkan mempunyai derajat homologi yang tinggi terhadap DNA *Endomyopsis fibuligera* galur ITB, R. cc.64. Dari penelusuran pustaka gen glukamilase dari *Endomyopsis fibuligera* galur HUT 7212 mempunyai homologi yang tinggi terhadap gen glukamilase dari *Endomyopsis fibuligera* galur "KZ" (data pada Lampiran 1)

Program komputer *Genmon 4,1* dan *Primer Detective 1,0* digunakan sebagai alat bantu perancangan sepasang pemicu P1 dan P2. Sepasang pemicu yang berhasil dirancang terdiri dari pemicu 1 (P1) dengan ukuran 20 pasang basa (pb), mempunyai homologi 100% pada cetakan yang terletak pada urutan nukleotida 144 – 163. Pemicu 2 (P2) dengan ukuran 22 pb, mempunyai homologi 100% pada cetakan yang terletak pada urutan basa 1906 – 1927. P1 mempunyai kandungan GC sebanyak 55% sedang P2 mempunyai kandungan GC sebanyak 50%. Daerah target amplifikasi yang diharapkan mempunyai ukuran 1784 pb dari urutan basa ke 144 – 1927, sedangkan temperatur *meltingnya* adalah 77,1⁰C (data pada Lampiran 2).

Dari data di atas dapat ditentukan temperatur *annealing* dari masing-masing pemicu dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$T_a FP = 62,3 + 0,41 (\%GC) - (500 / \text{panjang pemicu}) - 5^{\circ}C$$

Dari rumus di atas diperoleh T_a P1 (20) adalah 52,8⁰C dan T_a P2 (22) adalah 55,1⁰C.

Adapun urutan Pemicu 1 dan Pemicu 2 adalah sebagai berikut

Pemicu 1 (P1) : 5'GCGAGGTTCTCTTGGTTTGG3'

Pemicu 2 (P2) : 5'GGITGCATGTTCTCCACAAAGG3'

5.4. Penggandaan Gen Glukoamilase *Endomycopsis fibuligera* ITB.R.cc.64

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

Amplifikasi DNA target telah dilakukan terhadap larutan DNA cetakan *Endomycopsis fibuligera* ITB. R. cc. 64 dan DNA plasmid rekombinan pSf *GLUI*. Dari uji pendahuluan yang telah dilakukan maka kondisi optimum reaksi amplifikasi sebagai berikut . Volume total campuran reaksi yang digunakan untuk proses amplifikasi DNA target dalam masing-masing tabung adalah 50 μ l yang mengandung 30 pmol masing-masing P1 dan P2, 2 μ l larutan cetakan DNA (500 ng/ μ l), 2,5 unit enzim DNA *Taq polymerase* (*Biopharma technology*), 5 μ l buffer 10x., 1,5 mM $MgCl_2$, 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP dan dTTP). Proses amplifikasi untuk masing-masing tabung dilakukan sebanyak 35 siklus dan pemantapan satu siklus polimerisasi (*extension*) selama 5 menit dengan alat DNA *Thermal Analyzer* Bio-rad, USA. Setiap siklus terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 1 menit , *annealing* pada suhu 55 $^{\circ}$ C selama 1 menit dan polimerisasi (*extension*) pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 2 menit. Sebelum amplifikasi dilakukan pemanasan awal (*preheat*) pada 95 $^{\circ}$ C selama 5 menit.

Pada penentuan kondisi optimum yang paling menentukan adalah konsentrasi $MgCl_2$ Apabila konsentrasinya kurang dari 1,5 mM maka proses amplifikasi PCR sulit berhasil. Walaupun suhu *annealing*nya sudah direndahkan, tidak akan ada

produk PCR yang teramplifikasi. Hal ini disebabkan karena peranan $MgCl_2$ dalam PCR sangat penting yaitu: ion Magnesium membentuk kompleks yang larut dengan dNTP yang berperan dalam proses inkorporasi. Ion Magnesium juga menstimulasi aktivitas *Taq polymerase*, meningkatkan T_m DNA untai ganda dan berinteraksi dengan cetakan DNA. Konsentrasi ion Magnesium yang terlalu rendah menurunkan perolehan PCR dan kelebihan ion Magnesium menyebabkan akumulasi produk non spesifik.

Amplifikasi DNA target melalui PCR yang dilakukan memberikan hasil bahwa DNA target yang berukuran 1784 pb (berdasarkan perancangan pemicu) dapat dihasilkan dengan cetakan DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB. R. cc. 64. Fragmen DNA 1784 pb juga dapat dihasilkan dengan cetakan DNA plasmid rekombinan pSf *GLU1* sebagai pembanding (kontrol positif). Hasil amplifikasi dengan PCR ini dapat dilihat pada Gambar 5.2. Dari analisis elektroforesis gelnya terlihat bahwa letak pita hasil penggandaan DNA kromosom *Endomycopsis fibuligera* ITB. R. cc. 64 (Gambar 5.1c) dan letak hasil penggandaan DNA plasmid rekombinan pSf *GLU1* (Gambar 5.1d) sebagai kontrol positif menunjukkan posisi yang sama. Hasil penggandaan tersebut menunjukkan bahwa fragmen DNA 1784 pb merupakan fragmen DNA lokus *GLU1 Endomycopsis fibuligera* ITB. R. cc. 64 yang diduga mempunyai derajat homologi yang tinggi terhadap gen glukoamilase *GLU1* pada plasmid pSf*GLU1*. Hal ini juga membuktikan bahwa pemicu yang dirancang benar – benar dapat menempel pada DNA target pada posisi yang diharapkan, yaitu pada urutan nukleotida ke 144 - 163 Dan proses polimerisasi nukleotida berhenti pada urutan nukleotida ke 1906 – 1927 Sehingga menghasilkan fragmen DNA produk amplifikasi PCR berukuran 1784 pb.

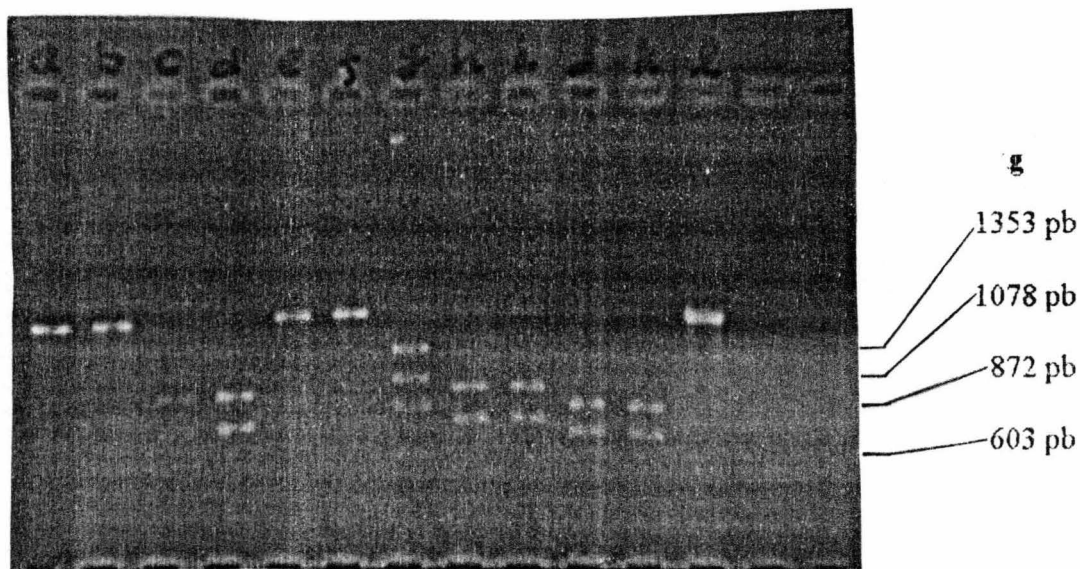
5.5. Karakterisasi Fragmen 1784 pb DNA lokus *GLUI E. fibuligera* ITB.R.cc.64

Untuk meyakinkan bahwa fragmen DNA 1784 pb yang diperoleh dari proses PCR adalah fragmen DNA pada lokus *GLUI*, maka dilakukan karakterisasi fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 dan *pSf GLUI* dengan enzim *Stu I*, *Eco RV*, *Eco RI*, *Bam HI* dan *Sau 3A*. Hasil pemotongan fragmen DNA 1784 pb dengan kelima enzim restriksi tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.3. Sedangkan ukuran fragmen DNA hasil pemotongannya dapat dilihat pada Tabel 5.1. Ukuran fragmen DNANYA dihitung berdasarkan urutan nukleotida pada Gambar 2.5.

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

Fragmen DNA 1784 tidak dapat terpotong oleh enzim restriksi *Stu I* maupun *Eco RI* (Gambar 5.3. a,b,e,f). Hal ini dibuktikan oleh letak fragmen DNA tersebut yang sama dengan letak fragmen DNA 1784 pb yang tidak dipotong oleh enzim (Gambar 5.3.1), berarti pada kedua fragmen DNA 1784 tersebut tidak terdapat urutan nukleotida AGG↓CCT maupun G↓AATCC yang dikenal sebagai sisi potong enzim restriksi *Stu I* dan *Eco RI*. Pemotongan dengan enzim *Eco RV* menghasilkan 2 fragmen DNA dengan ukuran ±997 pb dan ± 787 pb. Ukuran fragmen DNA ini sesuai dengan yang ada pada peta restriksi urutan nukleotida gen glukamilase *GLUI E. fibuligera* galur HUT7212 (Gambar 2.5), berarti pada urutan nukleotida fragmen DNA *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 terdapat urutan GAT↓ATC yang dikenal sebagai sisi potong enzim *Eco RV*. Pada Gambar 2.5 urutan GAT↓ATC terletak pada posisi (607-

612) yang berada di antara P1 (144 – 163) atau (-178 s/d -158) dan P2 (1906 – 1927) atau (+28 s/d +49). Jadi fragmen DNA 1784 dapat dipotong antara posisi 607 –612 oleh enzim *Eco RV*



Gambar 5.3. Elektroforesis gel agarosa 2% hasil karakterisasi fragmen DNA 1784 pb hasil PCR oleh enzim restriksi

- a. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yang dipotong *Stu I*
- b. Fragmen DNA 1784 pb pSfGLU1 yang dipotong *Stu I*
- c. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yang dipotong *Eco RV*
- d. Fragmen DNA 1784 pb pSfGLU1 yang dipotong *Eco RV*
- e. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yang dipotong *Eco RI*
- f. Fragmen DNA 1784 pb pSfGLU1 yang dipotong *Eco RI*
- g. DNA standar (ϕ x174 RF DNA/*Hae III*) 1353 pb – 72 pb
- h. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yang dipotong *Bam HI*
- i. Fragmen DNA 1784 pb pSfGLU1 yang dipotong *Bam HI*
- j. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 yang dipotong *Sau 3A*
- k. Fragmen DNA 1784 pb pSfGLU1 yang dipotong *Sau 3A*
- l. Fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 uncut

Pemotongan dengan enzim *Bam HI* menghasilkan 2 fragmen dengan ukuran ± 1000 pb dan ± 780 pb dengan sisi potong $G\downarrow GATCC$. Pada Gambar 2.5 sisi potong ini tidak ditemukan, seharusnya fragmen 1784 ini tidak terpotong. oleh enzim *Bam HI*. Hal ini diduga karena ada perbedaan urutan nukleotida *GLU1 S. fibuligera* HUT7212 dengan *GLU1 E. fibuligera* dan *pSfGLU*.

Pemotongan dengan menggunakan enzim *Sau 3A* juga menghasilkan 2 fragmen DNA dengan ukuran ± 870 dan ± 750 . Bila kedua fragmen tersebut dijumlahkan menjadi berukuran 1670 pb padahal fragmen yang dipotong berukuran 1784 kemungkinan yang dapat dikemukakan adalah fragmen yang berukuran kecil ± 160 pb tidak nampak karena sudah keluar gel. Pada Gambar 2.5 sisi potong enzim *Sau 3A* $GA\downarrow TC$ terletak pada posisi (700 – 704), dan, (1317 – 1321) di antara P1-P2.

Adanya pola fragmen-yang sama hasil pemotongan dengan enzim *Eco RV*, , *Bam HI* dan *Sau 3A* antara *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 dengan *pSfGLU1* menunjukkan bahwa minimal ada 20 urutan nukleotida kedua ampikon *E. fibuligera* ITB.R.cc.64 dan *pSfGLU1* yang sama.



Tabel 5.1. Hasil pemotongan fragmen DNA 1784 pb dengan enzim restriksi

Enzim restriksi	Substrat fragmen DNA 1784 pb	Posisi pemotongan	Ukuran fragmen (pb)
<i>Stu I</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64	AGG↓CCT	±1784
	<i>PsfGLU1</i>		±1784
<i>Eco RV</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64	GAT↓ATC	± 997 ± 787
	<i>pSfGLU1</i>		± 997, ±787
<i>Eco RI</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64	G↓AATCC	±1784
	<i>pSfGLU1</i>		±1784
<i>Bam HI</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64	G↓GATCC	± 1000 ± 780
	<i>pSfGLU1</i>		± 1000, ±780
<i>Sau 3A</i>	<i>E. fibuligera</i> ITB.R.cc.64	GA↓TC	± 870 ± 750, ±160
	<i>pSfGLU1</i>		± 870, ±780±160

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. fragmen DNA 1784 pb lokus *GLU1 E. fibuligera* ITB. R. cc. 64 dapat digandakan melalui PCR dengan menggunakan sepasang pemacu P1 (20 pb) dan P2. (22 pb) yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen glukamilase *GLU1 S. fibuligera* galur HUT7212 dengan program *Genmon* versi 4.1. dan *Primer Detective* versi 1.0
2. hasil pemotongan fragmen DNA 1784 pb hasil penggandaan melalui PCR adalah sebagai berikut; fragmen DNA 1784 pb tidak dapat dipotong oleh enzim *Stu I* dan *Eco RI*. Pemotongan dengan enzim *Eco RV* menghasilkan 2 fragmen DNA yang mempunyai ukuran ± 997 pb dan ± 787 pb, pemotongan dengan enzim *Bam HI* menghasilkan 2 fragmen DNA yang mempunyai ukuran ± 1000 pb dan ± 780 pb, dan pemotongan dengan enzim *Sau 3A* menghasilkan 2 fragmen yang mempunyai ukuran ± 850 pb dan ± 760 pb.

6.2. SARAN

Perlu dilakukan penelitian penentuan urutan nukleotida fragmen DNA 1784 pb *E. fibuligera* hasil penggandaan melalui PCR dan/atau uji ekspresi dari gen glukamilase.

DAFTAR PUSTAKA

Baktir,A. dan Soedigdo P., 1991, **Biokonversi Pati Sago Menjadi Sirup Glukosa Menggunakan Amilase *Endomycopsis fibuligera* yang Diamobilisasi Dalam Matrik Gel Poliakrilamid**, *Proseding Seminar Nasional Bioteknologi Industri*, PAU ITB, Bandung

Baktir, A., 1995 **Fraksinasi Amilase dari *Endomycopsis fibuligera* dengan Metode Presipitasi Amonium Sulfat**, *Journal of Biological Research*,1,2

Baktir, A., Ni Nyoman, T.P. dan Sofijan Hadi, 1997, **Pemisahan dan Karakterisasi Amilase dari *ndomEycopsis fibuligera***. *Seminar Nasional XIII Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia*, Fakultas Kedokteran Unair, Surabaya

Crueger, W. dan Crueger, A., 1991, **Biotechnology : A textbook of Industrial Microbiology**, Sinauer Associate, Inc., Sunderland

Fujii, M. dan Kamamura, Y., 1985, dalam Fujii, M., Taira Homa dan Masayuki Taniguchi, 1988, **Synnergism of α -amilase and Glukoamilase on Hydrolysis of native Sarch Granuls**, *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 910-915

Futatsugi, M., Ogawa, T. dan Fukuda , H., 1993, **Purification and Properties of Two form of Glukoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera***, *J. of Fermentation and Bioengineering*, 70 (6) : 521 – 523

Godfrey, t. dan Reichett, J., 1986, **Industrial Enzymology**, Macmilalan Publisher, Ltd., England

Huang, N., Stebbins,L. dan Rodriquez,R.L. 1992, **Classification and Evolution of α -amylase Genes in Plants** , Proc. Natl. Acad. Sci., **89** : 7526 – 7530, USA

Innis, M. dan Gelfand, D.H., 1990, **Optimization of PCRs** dalam Innis, M.A. et al. (Ed) **PCR Protocols : a Guide to Methods and Application**, Academic Press, New York

Itoh, T., Yamashita, I., dan Fukui, S., 1987, **Nucleotide Sequence of The Glukoamylase Gene *GLUI* in the Yeast *Saccharomyopsis fibuligera***, J. of Bacteriology, 169 (9) 4171 – 4176

Judoamidjojo, R.M., Said E.G., Hartono, L., 1989, **Biokonversi**, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Ko'sova, E.V. and Sodova, A.L., 1970, **Examination of Enzymes of The Amylolytic Complex of *Endomycopsis* sp**, Prikl. Biochim. Microbiol. p. 48 – 50

Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F., 1989, **Molecular Cloning a Laboratory Manual** Vol. 1, 2, 3, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Pelezar, J. Michael, 1988, **Dasar-dasar Mikrobiologi** ,(terjemahan Ratna Sri Hadioetomo dkk), UI Press, Jakarta, p. 930 – 932

Prescott, S.C. and Dunn, C.G., 1959, **Industrial Microbiology**, Mc Graw-Hill Book, London.

Priest, F.G., 1984, **Extracellular Enzyme** ,Van Norstrand Reinhold (UK) Co. Ltd. England

Puspaningsih, N.N.T., Hadi, S., Akhmaloka dan Manuhara, S., 1996-1999, **Pembentukan Sel Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) Galur Baru yang Mampu Mencerna Pati Secara Langsung Menjadi Etanol Melalui Kloning Gen Amilase**, Laporan Penelitian Hibah Bersaing V/I – V/3, DIKTI, Jakarta

Neway, O., Justin, 1989, **Fermentation Proses Development of Industrial Organism**, Marcel Dekker Inc., New York and Bassel, p. 277 , 286

Newton, C.R., and Graham, A, 1994, **Introduction to Biotechnology : PCR**, Bio Scientefic Publishers, Oxford.

Scharf, 1990, **Cloning with PCR dalam Innis, M.A. et al. (Ed) PCR protocols : a Guide to Methods and Application**, Academic Press, New York.

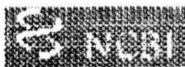
Shibuya, L., Tanura, G., Shima, H., Ishikawa, T dan Hara, S., 1992, **Construction of an α -amylase/glukoamylase Fusion Gene and Its Expression in *Saccharomyces cerevisiae***, Biosci. Biotech. Biochem, 56(6), 884 – 889

Sukhumavasi, J., Kato, K. and Harada, T., 1975, **Glukoamylase of Strain of *Endomycopsis fibuligera* Isolated from Mould Brand (Look Pang) of Thailand**, J. Ferment Technol. 53 : 559 – 565

Winnacker, L.E. (1987), **From Genes to Clones, Introduction to Gene Technology**, VCH, New York.

Yamashita, I., Itoh, I., Fukui, S., 1985, **Cloning and expressin of *Saccharomycopsis fibuligera* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae***, Applied Microbiol Biotechnology, 23: 130 - 133

LAMPIRAN 1



PubMed Nucleotide Protein Genome Oligo PopSet

Search for

Limits

History has expired due to inactivity

M17355: Yeast (*S. fibuligera*) [gi 171610]

PubMed, Protein, Related Sequences

LOCUS YSCGLUI 2538 bp DNA PLN 27-APR-1993

DEFINITION Yeast (*S. fibuligera*) glucoamylase (GLUI) gene, complete cds.

ACCESSION M17355

VERSION M17355.1 GI:171610

KEYWORDS glucoamylase.

SOURCE Yeast (*S. fibuligera*, strain HUT7212) DNA.

ORGANISM *Saccharomycopsis fibuligera*

Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Saccharomycetales;

Saccharomycopsidaceae; *Saccharomycopsis*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2538)

AUTHORS Itoh, T., Ohtsuki, I., Yamashita, I. and Fukui, S.

TITLE Nucleotide sequence of the glucoamylase gene GLUI in the yeast

Saccharomycopsis fibuligera

JOURNAL *J. Bacteriol.* 169, 4171-4176 (1987)

MEDLINE 87307999

REFERENCE 2 (sites)

AUTHORS Itoh, T., Sakata, Y., Akada, R., Mini, O. and Yamashita, I.

TITLE Construction and characterization of mutant glucoamylases from the

yeast *Saccharomycopsis fibuligera*

JOURNAL *Agric. Biol. Chem.* 53, 3159-3167 (1991)

COMMENT Draft entry and printed copy for [1] kindly provided by

I. Yamashita, 19-JAN-1988.

A poly-adenylation site is located at positions 2061-2066 and a Hogness box at 178-185.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2538
 /organism="Saccharomycopsis fibuligera"
 /db_xref="taxon:4944"

sig_peptide 322..402
 /note="glucoamylase signal peptide"

CDS 322..1881
 /note="glucoamylase precursor"
 /codon_start=1
 /protein_id="AAA34649.1"
 /db_xref="GI:171611"

/translation="MKFGVLFVFAAIVSALPLQEGPLNKRAYSFEEAYSNYKVDRTD
 LETFLDKQKEVSLYLLQNIAYPEGQFNNGVPGTVIASPSTSNPDYIYQWTRDSAITF
 LTVLSELEDNNFNTLAKAVEYYINTSYNLQRTSNPSSGFDDENHKGGLGPEKFNTDGGS
 AITGAWGRPQNDGPALRAYAISRYLNDVNSLNEGKLVLTDSGDINFSSTBDIYKRLIK
 PDLEYVIGYWDSTGFDLWEENQGRHFFTSLVQQKALAYAVDIAKSFDDGDFANILSSST
 ASTLESYLSGSDGGFVNTDVNHIVENPDLQNSRQGLDSATYIGPLLTHDIGSSST
 PFDVDNVEYVLSYLLLEDNKDRYSVNSAYSAGAADGRYPEDVYNGDGSSEGNPWFLLA
 TAYAAQVYKLAAYDAKASNDITINKINYDFFNKYIVDLSTINSAYQSSDSVTKSGS
 DEFNTVADNLVTFGDSFLQVILDHINDDGSLSNEQLNRYTGYSTGAYSLSLWSSGALLEA
 IRLRNKVKALA"

mat_peptide 403..1878
 /note="glucoamylase"

BASE COUNT 766 a 462 c 450 g 860 t

ORIGIN 5 bp upstream of PstI site.

```

1 ctgcagtc aa catgcgcatt cgaaggataa aagatgttcc gaggggttaa actgattatg
61 actacacatc gtagatcaca acattatgcc atagcacttt ttggaagtg ttcaaaaaat
121 ataagecgtg ctccaatata gggcgagggt tctcttggtt tggtaaatag aaattgggat
181 aaataacttac tacatcacct cattttctac agttttacac aaataaatct ttatatatca
241 aaaatattca aacaaaaatc ataaaaacag aactttcttt ttcaaaattt ttttgctacc
301 ttctgtaaac ttctatttgc tatgaaattc ggtgttttat ttccgctctt tgcctgctatt
361 gttagtgcct tacctttgca agaaggctct ttgaacaaaa ggcctatcc ttcttttgaa
421 gcttattcaa actataaagt tgacagaact gacttggaaa ccttcttggc caaacaaaaa
481 gaagtatctt tatactatct tttaaaaaac attgcttata ctgaaggcca atttaataat
541 gctgttctct gtaactgtat tgccttctca tcaaccteta atccggacta ctattaccaa
601 tggaccagag attccgcaat tacatttttg acagttcttt ctgaactaga agataataac
661 ttcaatacca ctttggccaa ggcagttgag tactacatta acaccagtta caaccttcaa
    
```

```

721 agaaccagta acccaagtgg cagctttgat gatgaaaatc ataaaggctt gggagaacca
781 aaatttaaca cagatgggtc tgcatacacc ggagcttggg ggagaccgca aaatgatggt
841 cctgctttag gagcttatgc tatecagtaga tacttgaatg atgtcaattc tttaaatgaa
901 ggtaaattag tattgactga ttcaggtgat atcaactttt ctccaactga agatatttac
961 aaaaatatca tcaaacacaga cttggaatat gttatagggg actgggattc tactgggttt
1021 gatctttggg aggaaaaacca aggcagacac ttttttaca gcttgggtca acagaaagcc
1081 cttgcttatg ctgtcgatat tgcacaaaagt tttgacgacg gcgactttgc gaacacactt
1141 tcttcgactg cttctaccct cgaaaagtta ttgagtggca gtgatgggtg atttgttaat
1201 actgatgta accacattgt tgaaaaccca gatttgctc sacaaaaactc tagacaaggt
1261 ctgattcag ccacatatat tggcccactt ttgactcatg atattggtga aagcagctca
1321 actccatttg atgttgacaa tgagtatggt ttgcaatcat attacttgtt atgggaggt
1381 aacaaagaca gatactctgt taacagtgc tttctgctg gtgcagctat tggcagatac
1441 ccagaagatg tttacaatgg tgatggttca tctgaagyc a tccataggtt cttagctact
1501 gcctatgctg cccaagttcc atacaaactt gcttatgatg caaagtcggc ctcaaagac
1561 attaccatta acaagattaa ctacgatttt ttaacaagt atattgttga tttatctacc
1621 atcaattctg cttaccagtc ttctgatagt gtcaccatta aaagtggctc tgatgaattt
1681 aacacgggtg ctgataattt ggtcacattc ggtgattcct ttttgcaagt cttttggat
1741 catattaatg atgatggctc cttgaatgaa caacttaaca gatataccgg ttattccacc
1801 ggtgcctact ctttgacatg gagcagtggt gctcttcttg aagctattag acttagaaaat
1861 aaggtcaagg ctttggctta agtgctttga aaagtaagtg tttttccttt gttgagaaca
1921 tgaaccata atccgacagc tttgttatga tactactttt ttgatatttt ccccttcttt
1981 gaccaggcta tctaattatg gctctatttt ctttctactt tttggctcga gcttctgaaa
2041 catatacgtc agcgagatc aataaacttt tatttggtac ttttttttag gatattctta
2101 actggtaact tttggagatt atcaatagag ttaatagtat cgtgggcctt gcatatatag
2161 ttaatgctat tatttggaa ttacactgtc agcacgtttc cagtcttggg agtcaggaat
2221 agacttatga aataacagaa agggcatccg tgaccattta tcatcaaat tatatcaaaa
2281 caattggctg tggttcctac aaatattgga aaaaatattc tctgagatgt attttctcc
2341 gattgggtcg tttctcttat actattcctg aatctacct a cactactag tagactgatg
2401 tgtctatcta tcgtttaaat gagactaaga tggaaaagat tttgttgcaa agaaacaatt
2461 tttttcaata ttgtaaagtg aaaacattca atacttttga atttaatttc caagaataca
2521 aaatcggtgt tgctgcag

```

//

Revised March 24, 2000.

Disclaimer | Write to the Help Desk
 NCBI | NLM | NIH



Fibred Nucleotide Protein Genome Structure PopSet

Search for

Limits

History has expired due to inactivity

X58117: *S. fibuligera* gene. [gi:1835225]

Published, Protein, Related Sequence

LOCUS SFGLUCAM 1881 bp DNA PLN 12-FEB-1997
 DEFINITION S.fibuligera gene for glucoamylase.
 ACCESSION X58117
 VERSION X58117.1 GI:1835225
 KEYWORDS extracellular protein; glucoamylase; glycoprotein.
 SOURCE Saccharomycopsis fibuligera
 ORGANISM Saccharomycopsis fibuligera
 Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Hemiascomycetes; Saccharomycetales;
 Saccharomycopsidaceae; Saccharomycopsis.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1881)
 AUTHORS Hostinova, E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-MAR-1991) E. Hostinova, Institute of Molecular
 Biology, 84251 Bratislava, Dubravska Cesta 21, Czechoslovakia
 REMARK revised by [4]
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1881)
 AUTHORS Hostinova, E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-FEB-1997) E. Hostinova, Institute of Molecular
 Biology, 84251 Bratislava, Dubravska Cesta 21, Czechoslovakia
 REFERENCE 3 (bases 1 to 1881)
 AUTHORS Hostinova, E., Balanova, J. and Gasperik, J.
 TITLE The nucleotide sequence of the glucoamylase gene GLA1 from
 Saccharomycopsis fibuligera KZ
 JOURNAL FEMS Microbiol. Lett. 67 (1), 103-108 (1991)
 MEDLINE 92137640
 COMMENT On Feb 8, 1997 this sequence version replaced gi:4849.
 Overlaps with M17355.

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1881
 /organism="Saccharomycopsis fibuligera"
 /strain="KZ"
 /db_xref="taxon:4944"
 TATA_signal 178..185
 CDS 322..1881
 /EC_number="3.2.1.3"
 /codon_start=1
 /product="glucoamylase"
 /protein_id="CAA41120.1"
 /db_xref="GI:1835226"
 /db_xref="SWISS-PROT:P26989"
 /translation="MRFGVLISVFVAIVSALPLQEGPLNKRAYPSFEAYSNYKVDRTD
 LETFLDKQKQDVSLYLLQNIAYPEGQFNDGVPPTVIASPSTSNPDYIYQWTRDSAITF
 LTVLSELEDNNFNFTLAKAVEYIINTSYMLQRTSNP3GSDDENHKGGLGEPKFNITDGS
 AYTGAWRPQNDGPALRAYAISRYLNDVNSLNKGLVLTDSGDINFSSTEDIYKNIK
 PDLEYVIGYWDSTGFDLWENQGRHFFTSLVQQKALAYAVDIAKSPDDGDFANTLSST
 ASTLESYLSGSDGGFVNTDVNHIVENPDLLQQNSRQGLDSATYIGPLLTHTDIEGSSST
 PFDVDNEYVYLSYLLLEDNKRYSVNSAYSAGAAIGRYPEDVYNGDGSSEGNWFLA
 TAYAAQVPYKLVYDAKSASNDITINKINYDFFNKYIVDLSTINSGYQSSDSVTIKSGS
 DEFNIVADNLVTPGDSFLQVILDHINDGSLNEQLNPMTGYSYSAYSLTWSSGALLEA
 IRLPNKVKALA"
 sig_peptide 322..402
 mat_peptide 403..1878
 /EC_number="3.2.1.3"
 /evidence=experimental
 /product="glucoamylase"

BASE COUNT 571 a 351 c 342 g 617 t

ORIGIN

1 ctgcagtc aa catccgcat cgaaggataa aagatgttcc gaggggttaa actgattatg
 61 actacacatc gtatgatcaca acattatgcc atagcacttt tttggaagtg ttcaaaaaat
 121 gtaagcgtgt cttcaatata gcggcgaggt tctcttggtt tggtaaatag aaattggtat

```

181 aaatacttac tacatcacct cattttctac agttttacac aatataatct ttatatatca
241 aaaatattca aacaaaatca ataaaaacag aactttcttt ttccaattt ttttgctacc
301 ttectgaaac ttctatttgc tatgagatte ggtgttttaa tttccgtctt tgttgctatt
361 gttagtgcct tacctttgca agaaggtcct ttgaacaaaa gagcctatcc ttcttttgaa
421 gcttattcaa actataaagt tgacagaact gacttggaaa ccttcttggc caaacaaaaa
481 gatgtatctt tatactatct ttacaaaaac attgcttate cagaaggcca attfaatgac
541 ggtgttcccg gtactgttat tgccttctca tcaacctctc atccggacta ctattaccaa
601 tggaccagag attccgcaat tacatttttg acagtctctt ctgaaactaga agataataac
661 ttcaatacca ctttggctaa ggcagttgag tactacatta ataccagtta caaccttcaa
721 agaaccagta acccaagtgg cagctttgat gatgaaaatc ataaaggctt gggagaacca
781 aaatttaaca cagatgggtc tgcatacacc ggagcttggg ggagaccgca saatgatggt
841 cctgctttga gagcttatgc tatcagtaga tacttgaatg atgtcaattc tttaaataaa
901 ggtaaattga tattgactga ttcaggtgat atcaactttt cttcaactga agatatttac
961 aaaaatatca tcaaacacaga cttggaatat gttatagggt actgggatc tactgggttt
1021 gatctttggg aggaaaacca aggcagacac ttttttacia gcttggttca acagaaagcc
1081 cttgcttatg ctgtcgatat tgccaaaagt ttgacgatg ggcactttgc gaacacactt
1141 tcttcgactg cttctaccct cgaagttat ttgagtggca gtgatggtgg atttgtaaat
1201 actgatgta accacattgt tgaaaaccca gatttgctcc aacaaaactc tagacaaggt
1261 ctagattcag ccacttatat tggcccactt ttgactcatg atattggcga aagcagctca
1321 actccatttg atgttgacaa tgagtatggt ttgcaatcat attacttgtt attggaggat
1381 aataaagaca gatactctgt taacagtgtt tattctgctg gtgcagctat tggcagatc
1441 ccagaagatg tttacaatgg tgatggttca tctgaaggca atccatggtt tttagctact
1501 gcctatgctg cccaagttcc atacaaactt gtttatgatg caaagtctgc ctcaaatgac
1561 attaccatta acaagattaa ctacgatttt tttacaagt atattggtga tttatctacc
1621 atcaattctg gttaccagtc ttctgatagt gtcaccatta aaagtggctc tgatgaattt
1681 aacacgggtg ctgataattt ggtcacatcc ggtgattcct ttttgcaagt cattttggat
1741 catattaatg atgatggctc cttgaatgaa caacttaaca gaaataccgg ttattccacc
1801 agtgccctact ctttgacatg ggcagtggt gctcttcttg aagctattag acttagaaat
1861 aaggtcaagg ctttggctta a

```

//

Revised: March 24, 2000.

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Sense primer Anti-sense primer
 AATATAGCGGCGAGGTTCTCTTGG CCTTTGTGGAGAACATGCAACC
 from base # 135 to 158 from base # 1906 to 1927
 length = 24 bp length = 22 bp
 GC content = 50.0% GC content = 50.0%
 $T_m = 56,97$ $55,1^{\circ}C$

ITOH-T Gene Map

base #1 + #1269 #2538

Target region # 1 of 2

from base # 135 to 1927
 length = 1793 bp
 melt temp = 77.1 °C
 marked: no

Total marked: 0 (_ 36 bases)

Sense primer Anti-sense primer
 GCGAGGTTCTCTTGGTTTGG CCTTTGTGGAGAACATGCAACC
 from base # 144 to 163 from base # 1906 to 1927
 length = 20 bp length = 22 bp
 GC content = 55.0% GC content = 50.0%
 $52,8$ $55,1^{\circ}C$

ITOH-T Gene Map

base #1 + #1269 #2538

Target region # 2 of 2

from base # 144 to 1927
 length = 1784 bp
 melt temp = 77.1 °C
 marked: no

Total marked: 0 (_ 36 bases)

untuk Reverse Primer yg dipesan :
 5' ggt tgc atg ttc tcc acc aag g 3'
 3' gg aa acc cct ctt gta cgt c

$$T_m = 2(T+A) + 4(C+G)$$

27.72.

$$T_m \text{ FP-1} = 62,3 + 0.41 (\%GC) - (500 / \text{panjang primer}) - 5^{\circ}C$$

$$62,3 + 20,5 - (500 / 24) - 5$$

$$62,3 + 20,5 - 20,83 - 5$$

$$(25) - 5$$

* GENMON version 4.1 - Module: compare - Date: Thu 20-Apr-100 22:56

Scanning entire sequence for 55% homology

Linear DNA sequence ITOH-T(144:163)
Homology 20/20 = 100%
Linear DNA sequence FP-2(1:20)

GCGAGGTTCTCTTG6TTTGG

GCGAGGTTCTCTTG6TTTGG

Linear DNA sequence ITOH-T(1002:1021)
Homology 12/20 = 60%
Linear DNA sequence FP-2(1:20)

CTGGGATTCTACTG6GTTTG
* * * * * * * * * *
GCGAGGTTCTCTTG6TTTGG

Linear DNA sequence ITOH-T(1982:2001)
Homology 12/20 = 60%
Linear DNA sequence FP-2(1:20)

ACCAGGCTATCTAATTATGG
* * * * * * * * * *
GCGAGGTTCTCTTG6TTTGG

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Scanning entire sequence for 55% homology

Linear DNA sequence ITDH-T(388:409)
Homology 13/22 = 59%
Linear DNA sequence RP-1(1:22)

DCTTTGAACAAAAGAGCCTATC

DCTTTGTGGAGAACATGCAACC

Linear DNA sequence ITDH-T(1906:1927)
Homology 22/22 = 100%
Linear DNA sequence RP-1(1:22)

DCTTTGTGGAGAACATGCAACC

DCTTTGTGGAGAACATGCAACC

5% Homology

Info-fax: +65 873 1077
 Tech-mail: techmail@genset.com.sg
 Info-phone: +65 873 2271
 e-mail order: oligos@genset.com.sg

GENSET SA [Paris, France]
 GENSET CORP [La Jolla (CA), USA]
 GENSET KK [Kyoto, Japan]

GENSET Singapore Biotech. Pte Ltd [Singapore]
 GENSET PACIFIC PTY. Ltd [Lismore, Australia]

OLIGO TECHNICAL DATA SHEET

**** Final Shipment ****

Dest : DR. INDRAYANA NOTO SOEHARDJO

Purchase order: CMDE 04/12/00

Ordered: 2000/12/4 (Y/M/D)

Shipped by : FE

GENSET ref : 0012056

Shipped: 2000/12/4 (Y/M/D)

(DP : Deprotected / Desalt : Desalted)

Cat	Oligo Nr	Type	DP	Purification		Name	Sequence : (5' - 3')	Size	Epsilon l/(mMcm)	MW g/mole	Qty/tube		Concentration		Tm °C
				Desalt							OD	nmoles	µM	µg/µl	
GUAR5	97709	DNA	X	X	-	SOFIJANI	5'-GCGAGGTTCTCTGGTTTGG-3'	20	190.4	6183	6.0	31.7	Dry	Dry	62
GUAR5	97710	DNA	X	X	-	SOFIJAN2	5'-GGTTGCATGTTCTCCACAAAGG-3'	22	213.8	6747	6.0	28.2	Dry	Dry	56

Oligos delivered: 2 (Total order : 2)

Total bases: 42