

**MANIPULASI ENZIMATIK  
DNA KROMOSOM *Arthrobacter* sp B7  
DENGAN MENGGUNAKAN *Sau3A***

**SKRIPSI**

**NUR ALFIYATUL LAILAH**

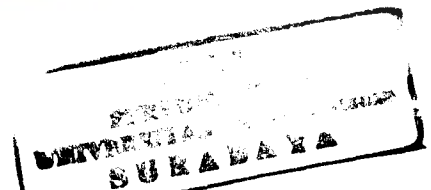
11/12/01/06

Lailah

m



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**



**MANIPULASI ENZIMATIK  
DNA KROMOSOM *Arthrobacter sp B7*  
DENGAN MENGGUNAKAN *Sau3A***

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia pada  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**NUR ALFIYATUL LAILAH  
NIM. 080112276**

**Tanggal Lulus : 30 Agustus 2005**

**Disetujui oleh :**

**Pembimbing I,**

**Pembimbing II,**



**Dr. Afaf Baktir, M.S  
NIP. 131 286 710**

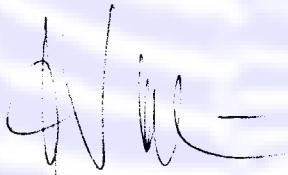
**Dr. Ni Nyoman Tri P., M.Si  
NIP. 131 653 446**

## LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

**Judul** : **Manipulasi Enzimatik DNA Kromosom *Arthrobacter sp B7* dengan Menggunakan *Sau3A***  
**Penyusun** : **Nur Alfiyatul Lailah**  
**NIM** : **080112276**  
**Tanggal Ujian** : **30 Agustus 2005**

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing I,**



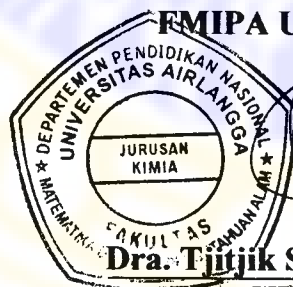
**Dr. Afaf Baktir, M.S**  
**NIP. 131 286 710**

**Pembimbing II,**

**Dr. Ni Nyoman Tri P., M.Si**  
**NIP. 131 653 446**

**Mengetahui,**

**Ketua Jurusan Kimia**  
**EMIPA Universitas Airlangga**

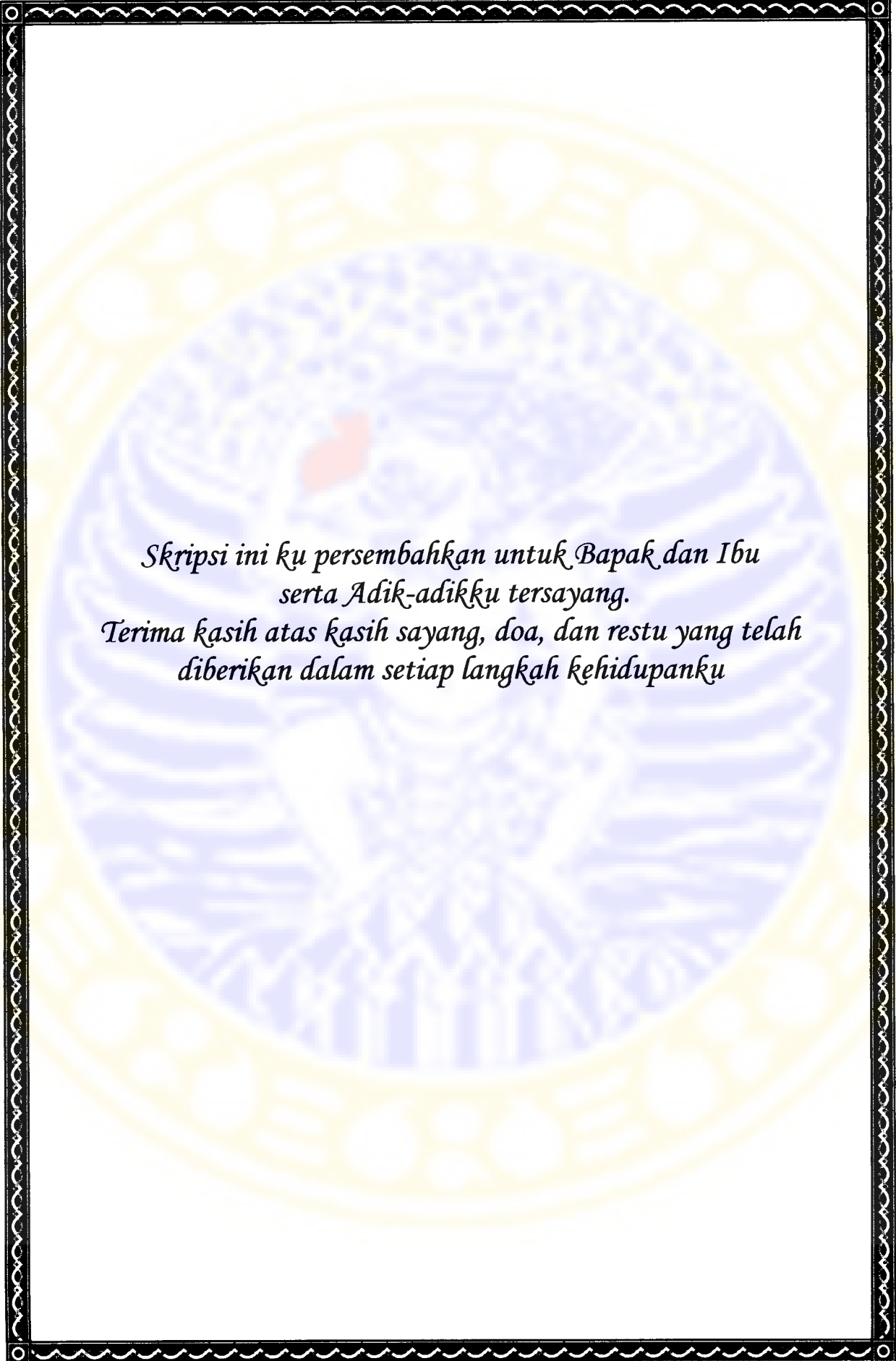


**Dra. Tjitjik Sri Tjahjandarie, Ph.D.**  
**NIP. 131 801 627**

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

**Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.**



*Skripsi ini ku persembahkan untuk Bapak dan Ibu  
serta Adik-adikku tersayang.  
Terima kasih atas kasih sayang, doa, dan restu yang telah  
diberikan dalam setiap langkah kehidupanku*

*Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu  
dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.  
(Q.S AlMujadilah: 11)*

*Ilmu pengetahuan tanpa agama akan tersesat,  
dan agama tanpa ilmu pengetahuan akan buta.  
(Albert Einstein)*

*Banyak orang menempuh perjalanan lebih jauh  
daripada yang mereka pikir bisa mereka lakukan,  
karena seseorang berpikir mereka bisa.  
(Zig Ziglar)*

*Katakanlah :  
"Adakah sama orang-orang yang berilmu dengan orang-orang yang tidak  
berilmu?" Sesungguhnya orang yang berakallah yang dapat menerima  
pelajaran.  
(Q.S Az Zumar: 9)*

*Akal itu ada dua yaitu akal yang menjadi tabiat dan akal yang didengar.  
Tak berguna yang didengar tanpa yang menjadi tabiat.  
Sebagaimana matahari takkan berguna kalau cahaya mata terhalang.  
(Ali bin Abi Thalib)*

*Kita tidak membutuhkan kekuatan lebih besar  
atau kemampuan lebih besar.  
Apa yang kita butuhkan adalah.....  
memanfaatkan apa yang kita miliki  
(Basil S. Walsh)*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah S.W.T. karena dengan rahmat dan hidayah-Nyalah penyusun dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **“Manipulasi Enzimatik DNA Kromosom *Arthrobacter sp B7* dengan Menggunakan *Sau3A*”**.

Skripsi ini disusun sebagai tugas akhir yang harus diselesaikan dalam meraih gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini penyusun mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak dan Ibu yang telah memberikan do'a, kasih sayang, kepercayaan, dan dukungan baik secara moril maupun materi
2. Dr. Afaf Baktir, M.S selaku dosen pembimbing I dan Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah sabar memberikan bimbingan, saran, dan nasehat dalam penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Purkan, S.Si, M.Si dan Bapak Abdulloh, S.Si, M.Si sebagai dosen penguji yang telah banyak memberi masukan, saran-saran, dan nasehat dalam penulisan skripsi.
4. Dosen-dosen pengajar di FMIPA Universitas Airlangga yang telah memberikan bekal ilmu kepada penyusun.
5. Prof. Dr. Ami Soewandi, JS selaku dosen wali.
6. Dra. Tjitjik Srie Tjahjandarie, Ph.D selaku ketua jurusan kimia FMIPA Universitas Airlangga dan seluruh staf jurusan kimia.



7. Adik-adikku tercinta, Qohar atas bantuannya, Rosa dan Fifi atas kasih sayang yang kalian berikan.
8. Seluruh keluarga, khususnya om Arif yang telah memberikan do'a dan dukungan.
9. Henry atas semangat dan kritiknya, Ajeng, Risty, dan Andin atas dukungan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
10. Teman-teman Lab. Organik dan Biokimia, khususnya Ika dan Afif sebagai tim kerja yang baik, Sulih, Nike, Fida, One, Ani, Anita, Hani, dan Nuri yang telah banyak membantu dalam penelitian.
11. Nurul, Yus, Asty, dan teman-teman Kimia 2001 yang tidak bisa disebutkan satu-persatu atas bantuan, dukungan, motivasi dan satu kenangan indah dalam dunia mahasiswa.
12. Pak Damam, mbak Ambar, mas Fendi, mas Rohadi, pak Gimam, mbak Yuli, dan karyawan jurusan kimia FMIPA UNAIR yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas bantuan dan kebaikannya.
13. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.

Penyusun menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penyusun harapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan

Surabaya, Agustus 2005  
Penyusun

Nur Alfiyatul Lailah



**Nur Alfiyatul Lailah, 2005, Manipulasi Enzimatik DNA Kromosom *Arthrobacter sp* B7 dengan Menggunakan *Sau3A*. Skripsi ini di bawah bimbingan Dr. Afaf Baktir, M.S dan Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya**

---

### ABSTRAK

*Arthrobacter sp* B7 merupakan mikroorganisme unggulan penghasil enzim dekstranase. Enzim ini dapat menghidrolisis glukosa tak larut air pada plak gigi dan dekstran pada industri gula, sehingga dapat dikembangkan sebagai enzim industri dan perlu dilakukan over produksi bentuk enzim rekombinannya. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan fragmen-fragmen restriksi berukuran 2-6 kb dari genom *Arthrobacter sp* B7. Fragmen restriksi ini akan digunakan pada konstruksi pustaka genom *Arthrobacter sp* B7 untuk kloning gen penyandi enzim dekstranase. DNA kromosom *Arthrobacter sp* B7 diisolasi dengan metode pembekuan dan pencairan dengan adanya *lysozym*, kemudian dilakukan digesti menggunakan *Sau3A*. Hasil digesti DNA Kromosom *Arthrobacter sp* B7 menggunakan *Sau3A* 0,03125 U pada suhu 37 °C selama 1 jam berupa pita *smear* pada 2-6 kb dalam gel agarosa.

*Kata kunci : Arthrobacter sp B7, gen penyandi enzim dekstranase, Sau3A*

**Nur Alfiyatul Lailah, 2005, Enzymatic Manipulation of Chromosomal DNA of *Arthrobacter sp* B7 by Using *Sau3A*. The Script Guided by Dr. Afaf Baktir, M.S and Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si, Department of Chemistry, Mathematic and Science Faculty, Airlangga University, Surabaya**

---

### ABSTRACT

*Arthrobacter sp* B7 is potential microorganism that produce dextranase enzyme. Dextranase enzyme from *Arthrobacter sp* B7 can hydrolyze water insoluble glucan in dental plaque and dextran in sugar industry, so it can developed as an industrial enzyme and need over producing the recombinant dextranase. The purpose of this experiment was to get restriction fragments from *Arthrobacter sp* B7 with sizes 2-6 kb. This restriction fragmen will be utilized in construction genomic library of *Arthrobacter sp* B7 for cloning encoding gene of dextranase enzyme. Chromosomal DNA of *Arthrobacter sp* B7 was isolated with freezing and thawing by *lysozyme*, then digested with *Sau3A*. The product of digestion chromosomal DNA from *Arthrobacter sp* B7 with *Sau3A* 0,03125 U at 37 °C for 1 hour is an smear band at 2-6 kb in agarose gel.

*Key word : Arthrobacter sp B7, gene encoding of dextranase enzyme, Sau3A*

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
KATA PENGANTAR.....	iii
ABSTRAK .....	v
ABSTRACT .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Enzim Dekstranase .....	6
2.2 Pertumbuhan Mikroorganisme .....	7
2.3 Metode Isolasi DNA .....	12
2.4 Enzim Endonuklease Restriksi .....	14
2.5 Analisis Hasil Restriksi dengan Elektroforesis Gel Agarosa .....	18
BAB III METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.2 Sampel Penelitian .....	22
3.3 Bahan dan Alat Penelitian .....	22
3.3.1 Bahan kimia .....	22
3.3.2 Alat penelitian.....	22
3.4 Prosedur Kerja .....	23
3.4.1 Diagram alir penelitian .....	23
3.4.2 Pembuatan media pertumbuhan.....	24
3.4.3 Kultivasi <i>Arthrobacter sp</i> B7.....	24
3.4.3.1 Pembuatan kurva pertumbuhan.....	24
3.4.3.2 Pembuatan inokulum .....	25
3.4.3.3 Penggandaan sel <i>Arthrobacter sp</i> B7.....	25
3.4.4 Isolasi DNA genom dari <i>Arthrobacter sp</i> B7 .....	25
3.4.5 Penentuan kemurnian dan kadar DNA .....	26

3.4.6	Digesti genom <i>Arthrobacter sp</i> B7 dengan enzim restriksi <i>Sau3A</i> .....	26
3.4.7	Elektroforesis gel agarosa.....	27
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1	Kultivasi <i>Arthrobacter sp</i> B7.....	28
4.1.1	Kurva pertumbuhan.....	28
4.1.2	Penggandaan sel.....	29
4.2	Isolasi DNA kromosom <i>Arthrobacter sp</i> B7.....	30
4.3	Digesti DNA kromosom <i>Arthrobacter sp</i> B7 dengan menggunakan enzim restriksi <i>Sau 3A</i> .....	31
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1	Kesimpulan.....	34
5.2	Saran.....	34
	DAFTAR PUSTAKA.....	35
	LAMPIRAN	

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor</b>	<b>Judul Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Enzim restriksi yang sering digunakan dalam rekayasa genetika.....	17
2.2	Range pemisahan molekul DNA dengan gel agarosa.....	21
4.1	Unit aktivitas dari enzim restriksi <i>Sau3A</i> yang digunakan dalam campuran reaksi digesti.....	32

**DAFTAR GAMBAR**

<b>No.</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Kurva pertumbuhan mikroorganism.....	10
3.1	Skema kerja manipulasi enzimatik DNA kromosom <i>Arthrobacter sp B7</i> dengan menggunakan <i>Sau3A</i> .....	23
4.1	Kurva pertumbuhan <i>Arthrobacter sp B7</i> .....	29
4.2	Elektroforegram DNA genom <i>Arthrobacter sp B7</i> .....	30
4.3	Elektroforegram DNA kromosom <i>Arthrobacter sp B7</i> yang telah didigesti dengan <i>Sau3A</i> .....	32
4.4	Pemotongan fragmen restriksi 2-6 kb.....	33

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>No.</b>	<b>Judul Lampiran</b>
1.	Data O.D ( <i>optical density</i> ) terhadap waktu



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Enzim dekstranase ( $\alpha$ -1,6-D-glukan-6-glukanohydrolase) adalah enzim yang menghidrolisis ikatan glikosida  $\alpha$ -1,6 pada molekul dekstran sehingga dihasilkan senyawa-senyawa sakarida rantai pendek.

Enzim dekstranase memiliki beberapa kegunaan di bidang kedokteran, kedokteran gigi dan industri. Di bidang kedokteran, enzim dekstranase digunakan untuk menghidrolisis dekstran yang secara alami berada di dalam substansi plasma darah. Di industri gula tebu, enzim dekstranase digunakan untuk menghidrolisis dekstran dalam nira. Hal ini dilakukan karena dekstran banyak ditemukan pada tebu yang terlambat giling atau penanganan setelah panen yang kurang baik. Kadar dekstran yang tinggi dalam nira tebu dapat mengganggu proses pembuatan gula terutama pada proses pengkristalan dan pemisahan gula. Dekstran terbentuk akibat aktivitas mikroorganisme *Leuconostoc mesenteroides* dan beberapa *Lactobacillus sp.* Keberadaan dekstran mengakibatkan kerugian besar karena menurunkan efisiensi produksi gula dan kualitas akhir gula (Galea & Inkerman, 1993). Perlakuan dengan menggunakan enzim dekstranase maka kesulitan dalam proses kristalisasi gula dapat diatasi sehingga didapat efisiensi pada proses pembuatan gula tebu. Sedangkan di bidang kedokteran gigi, enzim dekstranase merupakan bahan campuran pasta gigi untuk mencegah dan menghilangkan plak gigi, sehingga karies gigi dapat dihindari. Adanya plak yang

menempel pada gigi dan akan berkembang menjadi karies gigi merupakan salah satu masalah di bidang kedokteran gigi. Plak merupakan kumpulan bakteri yang terdapat dengan susunan teratur dalam matriks intermikroba yang melekat kuat pada gigi, kalkulus dan permukaan lain pada rongga mulut. Glukan tak larut air penyusun plak gigi berfungsi sebagai media perlekatan antar mikroba-mikroba guna membentuk agregat, dan media perlekatan agregat mikroba ini pada permukaan gigi. Glukan mempunyai struktur kompleks berupa rantai glukosa dengan ikatan glikosida  $\alpha$ -1,6 dan  $\alpha$ -1,3. Glukan penyusun plak gigi adalah glukan tak larut air dengan porsi ikatan glikosida  $\alpha$ -1,3 lebih banyak dibandingkan dengan ikatan glikosida  $\alpha$ -1-6, sehingga terbentuk banyak percabangan yang berakibat pada pembentukan struktur yang sulit dimasuki air (Ebisu *et al.*, 1974). Banyak peneliti yang melaporkan bahwa enzim dekstranase dapat menekan perlekatan bakteri pada permukaan gigi secara *in vitro*, menghambat deposisi plak dan mencegah karies (Hamada *et al.*, 1976) dan pada studi klinik terbukti bahwa pembentukan plak direduksi dengan pemakaian pasta gigi atau larutan pencuci mulut yang mengandung dekstranase berkadar tinggi.

Enzim dekstranase, seperti yang telah diuraikan, merupakan produk yang mempunyai nilai komersil tinggi, akan tetapi enzim ini masih merupakan produk impor, maka diperlukan pengembangan teknologi produksi dekstranase di dalam negeri yang efisien dan ekonomis.

Enzim dekstranase dapat diproduksi dari isolat berbagai jamur atau bakteri, misalnya strain *Pennicillium*, *Bacillus*, *Cytopaga*, *Lypomyces*, *Aspergillus* dan *Streptococcus* (Safarik dan Safarikot, 1992). *P.luteum*, *P.funicullosum*, *P.*

*lilacium*, *A.carneus* merupakan kelompok jamur yang mampu menghasilkan dekstranase bila ditumbuhkan dalam media yang mengandung dekstran (Kosaric *et al.*, 1973). Dekstranase ekstraselular dihasilkan oleh berbagai bakteri oral gram positif (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Arthrobacter*) dan bakteri oral gram negatif (*Prevotella*, *Capnocytophaga*) (Igarasi *et al.*, 1998).

*Arthrobacter sp* B7 merupakan mikroorganisme unggulan penghasil enzim dekstranase (B7DEX) yang telah diteliti keunggulan aktivitasnya terhadap dekstran di pabrik gula (Murdiyatmo dkk, 1994) dan terhadap glukosa tak larut (WIG) di plak gigi (Baktir dkk, 2004). Bakteri ini memerlukan dekstran sebagai sumber karbon tunggal untuk pertumbuhannya, sedang dekstran juga masih diimpor dengan harga yang mahal. Oleh karena itu perlu dilakukan kloning gen penyandi B7DEX, guna diekspresikan dalam sel inang yang dapat menggunakan sumber karbon murah, misal tebu tetes. Dengan demikian dapat dilakukan produksi enzim dekstranase secara besar-besaran dengan harga murah untuk pemakaian di bidang industri, kedokteran, dan kedokteran gigi. Di samping itu klon gen B7DEX dapat digunakan untuk merekayasa flora normal rongga mulut sehingga dapat mengekspresikan enzim dekstranase secara terus menerus, dengan demikian problem karies gigi dapat diatasi.

Untuk proses kloning gen penyandi enzim dekstranase B7DEX dapat dilakukan melalui pembuatan pustaka genom. Pada pembuatan pustaka genom perlu dilakukan pemotongan kromosom secara parsial pada tingkat yang tepat agar gen penyandi enzim dekstranase sedapat mungkin hampir tidak terpotong internal. Oleh karena itu pemilihan enzim restriksi dan optimasi kadarnya yang

digunakan untuk proses ini sangat penting, dengan harapan agar gen sisipan yang dihasilkan dalam pustaka genom berukuran pada kisaran tertentu, yang kemungkinan besar gen dekstranase sedikit terpotong internal.

Pada penelitian ini akan dilakukan manipulasi DNA dari kromosom *Arthrobacter sp B7* untuk memperoleh fragmen-fragmen restriksi dalam rangka pembuatan pustaka genom *Arthrobacter sp B7* pada penelitian berikutnya. Untuk memastikan gen spesifik dapat diisolasi, maka perlu diperoleh fragmen-fragmen yang tumpang tindih. Fragmen tumpang tindih biasanya diperoleh dengan digesti parsial menggunakan enzim restriksi yang memotong sering, misal *Sau3A*, *AluI*, dan *HaeIII* (Rehm, 1993). Pada penelitian ini enzim restriksi yang dipilih untuk memotong DNA kromosom *Arthrobacter sp B7* adalah *Sau3A*. Gen dekstranase dari *Arthrobacter sp B7* telah diteliti pada penelitian sebelumnya berukuran sekitar 2 kb (Baktir, 2004), maka perlu ditentukan kadar *Sau3A* yang bisa menghasilkan fragmen-fragmen DNA *Arthrobacter sp B7* berukuran 2-6 kb.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang tersebut maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut: Berapakah Aktivitas enzim *Sau3A* yang digunakan agar didapat fragmen restriksi berukuran 2-6 kb ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui berapa aktivitas enzim *Sau3A* yang digunakan agar didapat

fragmen restriksi berukuran 2-6 kb.

2. Menghasilkan fragmen-fragmen restriksi berukuran 2-6 kb.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Fragmen restriksi yang didapat dalam penelitian ini berguna untuk konstruksi pustaka genom *Arthrobacter sp* B7 dalam rangka kloning gen dekstranase. Dengan demikian diharapkan dapat membuka peluang lebih luas untuk memproduksi enzim dekstranase unggul dalam skala industri di dalam negeri sehingga dapat menurunkan harga dekstranase.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Enzim Dekstranase

Dekstranase ( $\alpha$ -1,6-D-glukan-6-glukanohidrolase) adalah enzim yang secara acak menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6-glukosida pada dekstran menjadi senyawa-senyawa sakarida rantai pendek. Enzim ini tergolong dalam enzim hidrolase yang mengkatalisa reaksi hidrolisis substrat dengan pertolongan molekul air. Enzim ini dapat diisolasi dari berbagai jamur dan bakteri, misalnya *strain Penicillium*, *Bacillus*, *Cytopaga*, *Lypomyces*, *Aspergillus* dan *Streptococcus*.

Ada beberapa jenis enzim yang menghidrolisis dekstran, yaitu: EC.3.2.1.11, EC.3.2.1.70 dan EC.3.2.1.94

##### 1. 1,6-D-glukan-6-glucanohidrolase (EC.3.2.1.11).

1,6-D-glukan-6-glucanohidrolase dikenal dengan enzim dekstranase, namun juga memiliki beberapa nama lain, yaitu dekstran hidrolase, endodekstranase, dekstranase DL 2, DL 2. Enzim dekstranase bekerja terhadap makromolekul dari bagian dalam, menghidrolisis ikatan 1,6- $\alpha$ -D-glukosida dalam dekstran secara acak yang menghasilkan senyawa campuran yang terdiri dari monosakarida, disakarida, dan oligosakarida. Enzim jenis ini juga menghidrolisis pada banyak ikatan glukosida  $\alpha$ -1,4 (Safarik dan Safarikot, 1992).

##### 2. glukan $\alpha$ -1,6-D-glucohidrolase (EC.3.2.1.70).

Beberapa nama lain dari enzim ini adalah *exo*-1,6- $\beta$ -glucosidase,

glucodextranase. Enzim eksodekstranase hanya bekerja terhadap makromolekul dari luar saja dan menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6-D-glukosida pada posisi C-1 mulai dari ujung bebas menjadi 6-  $\alpha$ -D-glukan dan senyawa turunan oligosakarida.

### 3. 1,6- $\alpha$ -D-glukan-isomaltohydrolase (EC.3.2.1.94).

Beberapa nama lain dari enzim 1,6- $\alpha$ -D-glukan-isomaltohydrolase adalah ekso-isomaltohidrolase, isomaltodekstranase, G2-dekstranase. Enzim isomaltodekstranase menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6 glukosida setiap dua atom C dari rantai ujung luar yang menghasilkan beberapa disakarida.

Dekstranase telah digunakan secara luas di bidang medis sebagai penghidrolisis dekstran yang secara alami terdapat di dalam plasma darah, dan sebagai bahan campuran pasta gigi untuk mencegah karies gigi (Halpern, 1981). Dekstranase juga digunakan di industri untuk mengatasi masalah yang diakibatkan oleh dekstran, yaitu penurunan kadar sukrosa, dan penghambatan kristalisasi gula. Pemakaian dekstranase sebagai komponen pasta gigi, berdasarkan kemampuannya menghilangkan plak gigi dengan cara menghidrolisis glukan yang tidak larut dalam air yang disintesa dari sukrosa oleh strain *Streptococcus mutans*. Dekstranase adalah enzim yang produksinya diinduksi oleh keberadaan dekstran sebagai sumber karbon dalam media tumbuhnya.

## 2.2 Pertumbuhan Mikroorganisme

Mikroorganisme dalam pertumbuhannya mengalami tahap-tahap tertentu. Tahap-tahap dalam pertumbuhan organisme ditentukan oleh penggunaan substrat



dan biomassa yang dihasilkan. Pembuatan kurva pertumbuhan berguna untuk menentukan waktu panen mikroorganisme agar diperoleh sel dalam jumlah tertentu dan dalam kondisi optimum untuk tumbuh. Pertumbuhan mikroorganisme terdiri dari beberapa fase antara lain (Buckle, 1985):

1. Fase Adaptasi (Fase Lag).

Fase Adaptasi merupakan fase penyesuaian, dimana fase ini mikroorganisme hanya menyesuaikan diri dengan lingkungannya sehingga dalam fase ini belum terjadi pembelahan sel. Fase Lag dibutuhkan untuk kegiatan metabolisme dalam rangka persiapan dan penyesuaian diri dengan kondisi pertumbuhan dalam lingkungan yang baru.

2. Fase Pertumbuhan Awal.

Pada fase ini mikroorganisme mulai membelah dengan kecepatan yang masih rendah. Pertumbuhan sel pada fase ini belum menunjukkan kenaikan yang berarti karena mikroorganisme baru selesai tahap menyesuaikan diri (adaptasi).

3. Fase Pertumbuhan Logaritmik (Fase Eksponensial).

Pada fase ini sel membelah dan mengganda dengan cepat dan konstan. Sel-sel akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial sampai jumlah maksimum yang dapat dibantu oleh kondisi lingkungan, oleh karena itu dibutuhkan energi lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya.

4. Fase Pertumbuhan Lambat.

Pada fase Pertumbuhan Lambat ditandai dengan kecepatan penambahan sel tidak lagi sebanding dengan waktu dan jumlah nutrisi. Hal ini dipengaruhi oleh jumlah nutrisi yang mulai berkurang dan adanya sisa-sisa metabolisme

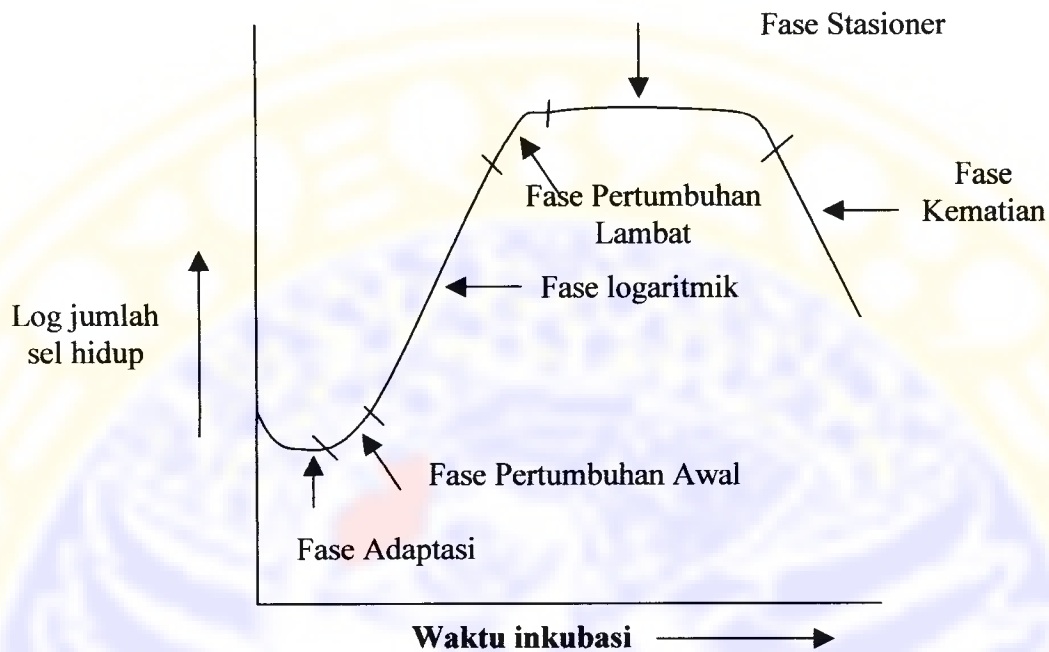
mikroorganisme yang dapat mengganggu pertumbuhan sel. Meskipun demikian jumlah sel yang hidup masih lebih banyak dari pada jumlah sel yang mati.

#### 5. Fase Pertumbuhan Tetap (Fase Stasioner).

Pada fase Stasioner kecepatan penambahan dan pengurangan sel sebanding sehingga jumlah biomassa tetap. Pertumbuhan mikroorganisme yang dibatasi oleh bahan gizi yang tersedia dan penimbunan zat racun sebagai hasil akhir metabolisme. Biasanya pada fase ini terjadi penimbunan metabolit dan berkurangnya nutrisi dalam media yang mengakibatkan kecepatan pertumbuhan menurun dan berhenti. Komposisi sel-sel pada fase ini berbeda dengan sel-sel saat fase Eksponensial dan umumnya lebih tahan terhadap perubahan kondisi fisik seperti panas, dingin, radiasi maupun terhadap bahan-bahan kimia.

#### 6. Fase Kematian.

Pada fase ini pertumbuhan mikroorganisme mengalami penurunan ketika kandungan nutrisi sudah habis dan terjadi kematian sel mikroorganisme secara eksponensial. Fase ini dalam bentuk logaritmik akan ditunjukkan sebagai garis lurus yang menggambarkan penurunan jumlah sel-sel yang hidup terhadap waktu. Kecepatan kematian berbeda-beda tergantung dari spesies mikroorganisme dan kondisi lingkungannya.



Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan mikroorganisme

Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh nutrisi, suhu, air, pH, dan tersedianya oksigen. Mikroorganisme seperti halnya makhluk hidup lain membutuhkan ketersediaan makanan yang akan menjadi sumber energi dan sumber unsur-unsur kimia dasar untuk pertumbuhan sel. Kebutuhan nutrisi suatu mikroorganisme tergantung pada spesiesnya, namun secara umum mikroorganisme memerlukan karbon, nitrogen, oksigen dan sejumlah kecil logam lainnya (Buckle, 1985).

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan terpenting yang mempengaruhi kehidupan dan pertumbuhan mikroorganisme. Suhu dapat mempengaruhi mikroorganisme dalam dua cara yang berlawanan, yaitu:

1. Apabila suhu naik, kecepatan metabolisme naik dan pertumbuhan dipercepat.

Sebaliknya apabila suhu turun, kecepatan metabolisme juga turun dan pertumbuhan diperlambat.

2. Apabila suhu naik atau turun, tingkat pertumbuhan mungkin terhenti, komponen sel menjadi tidak aktif dan sel-sel dapat mati.

Berdasarkan pengaruh suhu terhadap pertumbuhan mikroorganisme yang telah diuraikan suhu dapat digolongkan menjadi tiga, yaitu suhu minimum, suhu optimum, dan suhu maksimum. Suhu optimum merupakan suhu pertumbuhan suatu mikroorganisme terjadi secara cepat (Buckle, 1985).

Setiap organisme juga mempunyai kisaran nilai pH untuk dapat tumbuh dengan optimal. Kebanyakan mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH 6,0–8,0 dan nilai pH di luar kisaran 2,0 sampai 10,0 biasanya bersifat merusak (Buckle, 1985).

Air berperan dalam reaksi metabolik dalam sel dan merupakan alat pengangkut zat-zat gizi atau bahan limbah ke dalam dan ke luar sel pada semua organisme. Jenis mikroorganisme yang berbeda membutuhkan jumlah air yang berbeda pula untuk pertumbuhannya (Buckle, 1985).

Mikroorganisme berbeda nyata dalam kebutuhan oksigen guna metabolismenya dengan organisme lainnya. Berdasarkan kebutuhan terhadap oksigen, mikroorganisme dapat digolongkan menjadi empat, yaitu: (Buckle, 1985)

1. Organisme aerobik yaitu organisme yang membutuhkan ketersediaan oksigen untuk pertumbuhannya.
2. Organisme anaerobik yaitu organisme yang tidak dapat tumbuh dengan adanya oksigen dan bahkan oksigen dapat merupakan racun bagi organisme

tersebut.

3. Organisme anaerobik fakultatif yaitu organisme yang menggunakan oksigen bila tersedia dan tetap dapat tumbuh walaupun tidak tersedia oksigen.
4. Organisme mikroaerofilik yaitu mikroorganisme yang lebih dapat tumbuh pada kadar oksigen yang lebih rendah dari pada kadar oksigen dalam atmosfer.

### 2.3 Metode Isolasi DNA

DNA sebagai molekul yang terdapat dalam jumlah melimpah dalam sel prokariot maupun eukariot, dapat diekstraksi dengan mudah dalam jumlah yang cukup untuk berbagai analisis. Namun untuk memperoleh urutan DNA spesifik dalam jumlah yang cukup untuk studi molekul, akan menghadirkan berbagai problem, karena sel-sel dalam organisme hanya memiliki satu atau dua kopi urutan tersebut (Wolfe, 1993).

Ada beberapa teknik untuk memperoleh urutan DNA spesifik secara kuantitatif, meliputi metode hibridisasi, kloning dan PCR. Dalam metode hibridisasi, urutan target diidentifikasi diantara urutan-urutan DNA yang lain dengan bantuan asam nukleat pelacak (*probe*). Setelah urutan target didapat, selanjutnya dapat dilipatgandakan jumlahnya dengan metode kloning maupun PCR (wolfe, 1993).

Metode hibridisasi berdasarkan atas fakta bahwa rantai nukleotida DNA terlepas dari untai ganda pada temperatur tinggi, dan akan melilit kembali dengan urutan komplemen bila DNA didinginkan. Aplikasi fenomena ini untuk



mengidentifikasi setiap urutan DNA sebagai berikut: sampel DNA dipanaskan agar terlepas dari lilitan untai ganda. Kemudian pelacak radioaktif ditambahkan ke dalam sampel DNA tersebut dalam kondisi suhu yang memungkinkan terjadi pelilitan kembali. Molekul DNA atau RNA untai tunggal yang komplementer dengan sebagian dari seluruh urutan target. Metode hibridisasi pelacak sering digabung dengan elektroforesis sampel DNA menggunakan teknik Southern dan Northern *blotting*. Pada teknik Southern *blotting*, larutan mengandung pelacak radioaktif dituang ke dalam DNA untai tunggal dan akan tampak sebagai noda pada membran nitroselulosa. Pelacak akan berhibridisasi hanya dengan noda yang mengandung untai DNA komplementer. Selanjutnya membran dicuci untuk menghilangkan molekul pelacak yang tidak terikat, sedang molekul DNA target tertinggal pada membran sebagai noda yang ditandai dengan radioaktif. Sedangkan pada teknik Northern *blotting*, pelacak yang digunakan adalah molekul DNA untai tunggal radioaktif yang komplementer dengan molekul RNA target.

*Polymerase chain reaction (PCR)* adalah metode amplifikasi urutan DNA secara *in vitro*. Teknologi PCR dapat melakukan amplifikasi urutan DNA spesifik sampai jutaan kali lipat, melalui prosedur yang sangat sederhana. Dua hal yang menunjang lahirnya teknik PCR adalah penemuan DNA polimerase tahan panas dan kemampuan mensintesis oligonukleotida dengan murah.

Kloning gen adalah suatu teknik rekombinasi DNA untuk menghasilkan klon baru yang memerlukan enzim khusus diantaranya endonuklease restriksi. Enzim ini bekerja memotong DNA pada tempat yang spesifik menghasilkan fragmen-fragmen DNA dengan berbagai macam ukuran, yang selanjutnya dapat

disambung dengan vektor kemudian ditransformasikan ke dalam sel hidup. Seutas DNA dapat dipotong oleh enzim restriksi dengan menghasilkan ujung kohesif atau lengket. Fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan dapat digabung kembali, karena ujung kohesif memiliki rangkaian komplementer yang akan membentuk pasangan basa. Pada penggunaan teknik rekombinasi DNA, gen yang memproduksi suatu protein diisolasi dan diinsersikan ke dalam sel mikroorganisme, kemudian mikroorganisme tumbuh dan berkembang biak dengan membawa gen yang diinsersikan tersebut ke dalam sel keturunannya dan dengan mengontrol pertumbuhan mikroorganisme itu akan diproduksi protein secara besar-besaran.

#### **2.4 Enzim Endonuklease Restriksi**

Enzim endonuklease restriksi adalah suatu enzim yang dihasilkan oleh berbagai bakteri yang dapat digunakan untuk memotong molekul DNA yang diperlukan untuk kloning gen. Observasi permulaan yang mengantarkan pada penemuan endonuklease restriksi telah dilakukan sejak awal tahun 1950-an ketika terlihat bahwa beberapa strain bakteri kebal terhadap infeksi bakteriofag. Fenomena ini disebut dengan restriksi, yang diatur oleh tuan rumah (*host-controlled restriction*). Restriksi terjadi karena bakteri menghasilkan enzim yang menghancurkan DNA fag sebelum fag ini sempat mengadakan replikasi dan mengarahkan sintesis partikel fag baru. DNA bakteri sendiri terlindung dari serangan enzim tersebut karena DNA ini mempunyai gugus metil tambahan yang menghalangi kerja degradatif enzim. Enzim-enzim degradatif ini disebut



endonuklease restriksi (Brown, 1991).

Sistem restriksi merupakan sarana bakteri untuk memonitor DNA yang masuk ke dalam sel kemudian merusaknya apabila dikenali sebagai DNA asing. Endonuklease restriksi mengenali urutan DNA spesifik pada DNA pendatang dan memotong DNA tersebut menjadi fragmen-fragmen, baik pada sisi spesifik maupun secara acak (Brown, 1991).

Pembentukan fragmen DNA melalui digesti dengan endonuklease restriksi dapat dilakukan dengan beberapa strategi yang berbeda, yaitu:

1. Digesti sempurna DNA dengan enzim tunggal untuk menghasilkan fragmen-fragmen dengan ujung yang identik.
2. Digesti sempurna DNA menggunakan kombinasi satu atau lebih enzim untuk menghasilkan fragmen dengan ujung identik.
3. Digesti parsial DNA dengan enzim yang *frequently cutting*, biasanya yang memiliki urutan rekognisi tetranukleotida. Misal *HaeIII* dan *Sau3A*.

Sifat hasil pemotongan oleh endonuklease sangat penting dalam mendisain eksperimen kloning gen. Beberapa endonuklease restriksi membuat potongan untai ganda yang sederhana pada pertengahan urutan pengenalan sehingga menghasilkan ujung tumpul, dan sejumlah besar endonuklease restriksi yang lain memotong DNA dengan cara yang agak berbeda, yaitu kedua untai DNA tidak dipotong pada posisi yang tepat sama, tetapi pemotongannya berbentuk zig-zag atau dengan belok tajam melampui dua atau empat nukleotida, sehingga fragmen DNA yang dihasilkan mempunyai tonjolan untai tunggal pendek pada tiap ujung. Ujung ini disebut dengan ujung lengket atau ujung kohesif (Brown, 1991).

Enzim restriksi diklasifikasikan menjadi tiga golongan, yaitu:

#### 1. Enzim restriksi tipe I

Enzim kompleks yang memiliki aktivitas nuklease dan metilase. Enzim ini memerlukan ATP, S-adenosilmetionin dan ion magnesium sebagai kofaktor. Potongan terjadi pada jarak sekitar 1000 nukleotida dari sisi rekognisi.

#### 2. Enzim restriksi tipe II

Enzim ini memotong DNA pada bagian dalam urutan rekognisi dan hanya memerlukan  $Mg^{2+}$  sebagai kofaktor, dan mempunyai Mr 20.000 sampai dengan 100.000. Enzim ini mengenali urutan DNA spesifik yang terdiri dari beberapa nukleotida dan bersifat palindrom (Fersht, 1985). Enzim restriksi tipe II sangat penting peranannya dalam rekayasa genetika karena hanya memotong pada urutan tertentu dan menghasilkan ujung-ujung yang kompatibel. Kondisi reaksi yang diperlukan cukup sederhana, kadar garam memegang peranan penting terhadap aktivitas dan spesifitas enzim ini. Kondisi garam yang tidak sesuai menghasilkan aktivitas “bintang”, yaitu ketepatan pengenalan urutan berkurang, sehingga DNA juga terpotong pada urutan-urutan yang berbeda dari urutan rekognisi.

#### 3. Enzim restriksi tipe III

Enzim kompleks yang memotong DNA pada jarak spesifik kira-kira 25 pb dari urutan rekognisi, sehingga ujung menonjol yang dihasilkan oleh enzim ini biasanya tidak kompatibel.

Dari ketiga tipe enzim restriksi yang telah diuraikan hanya enzim restriksi

tipe II yang digunakan dalam proses rekayasa genetika, karena enzim ini mempunyai spesifitas yang tinggi, yaitu hanya memotong DNA pada urutan pengenalnya (urutan restriksi) tidak pada tempat lain. Rantai DNA diputus dalam arah simetri untuk memberi *nick* dengan ujung 3'- hidroksil dan 5'- fosforil. Pemotongan bisa berbeda untuk setiap enzim restriksi, sebagai contoh *EcoRI* melepaskan ujung 5' lengket dan *PstI* melepaskan ujung 3' lengket. Enzim lain, seperti *HaeIII* memberikan ujung tumpul karena memotong pada pusat simetri (Fersht, 1985). Urutan restriksi bagi beberapa endonuklease restriksi yang paling sering digunakan dalam rekayasa genetika dapat dilihat pada tabel 2.1

**Tabel 2.1** Enzim Restriksi yang sering digunakan dalam rekayasa genetika

Enzim	Sumber	Sisi Pemotongan	Ujung Tumpul/ Ujung lengket
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG↓CT TC↑GA	Tumpul
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G↓GATCC CCTAG↑G	Lengket
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	NA↓GATCTN NTCTAG↑AN	Lengket
<i>EcoRI</i>	<i>Escherchia coli</i>	NG↓AATTCN NCTTAA↑GN	Lengket
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓CC CC↑GG	Tumpul
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	A↓AGCTT TTCGA↑A	Lengket
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAG↓CTG GTC↑GAC	Tumpul
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus 3A</i>	N↓GATCN NCTAG↑N	Lengket

*Sau3A* adalah enzim yang dihasilkan oleh *Streptococcus aureus* strain 3A yang akan memotong DNA kromosom pada urutan pengenalan tetranukleotida GATC. Enzim ini banyak digunakan untuk preparasi fragmen restriksi dalam konstruksi pustaka genom karena enzim ini memotong secara zig-zag atau belok tajam melampaui dua atau empat nukleotida sehingga menghasilkan fragmen restriksi yang mempunyai tonjolan untai tunggal pendek pada tiap ujung atau biasa disebut dengan ujung lengket (Brown, 1991).

Reaksi endonuklease restriksi dapat dihambat oleh kontaminan yang ditemukan selama preparasi DNA, misalnya adanya protein, fenol, etanol dan EDTA. Dampak dari kontaminan ini dapat diatasi dengan penambahan jumlah atau kadar enzim restriksi ke dalam campuran reaksi, peningkatan volume reaksi untuk mengencerkan potensi hambatan dan peningkatan waktu inkubasi (Ausubel, 1995).

## **2.5 Analisis Hasil Restriksi dengan Elektroforesis Gel Agarosa**

Digesti restriksi akan menghasilkan sejumlah fragmen DNA dengan ukuran yang tergantung pada posisi urutan pengenalan yang tepat pada molekul DNA mula-mula. Jelas diperlukan cara untuk menentukan jumlah dan ukuran fragmen bila digunakan endonuklease restriksi dalam kloning gen.

Cara yang biasa dipakai dan lebih tepat untuk menentukan jumlah dan ukuran fragmen tersebut adalah pemisahan dengan elektroforesis gel. Pemisahan secara elektroforesis ini menggunakan gel, yaitu agarosa, poliakrilamid atau campuran keduanya (Brown, 1991).

Elektroforesis gel adalah suatu teknik yang digunakan untuk memisahkan asam nukleat dan protein berdasarkan ukuran, muatan listrik dan sifat fisik lainnya. Istilah elektroforesis menggambarkan migrasi partikel bermuatan dalam medan listrik. Elektroforesis gel adalah teknik yang memisahkan molekul pada suatu gel dalam media yang memiliki aliran listrik.

Elektroforesis gel agarosa digunakan sebagai standar dalam pemisahan, identifikasi dan pemurnian fragmen DNA. Teknik ini mudah dilakukan, cepat dan kemampuan dalam memisahkan fragmen-fragmen DNA yang tidak dapat dipisahkan dengan teknik atau prosedur lain. Lokasi DNA pada gel agarosa dapat ditentukan dengan merendam gel agarosa tersebut pada larutan ethidium bromida berkonsentrasi rendah dan melihatnya dibawah sinar UV.

Pemisahan fragmen DNA dengan menggunakan elektroforesis berdasar pada ukuran fragmen yang berbeda-beda. Selama proses elektroforesis, makromolekul bergerak menembus pori atau matriks gel dan rata-rata migrasinya bergantung pada ukuran molekul, konsentrasi agarosa dalam gel elektroforesis, kekuatan ionik dan suhu bufer yang digunakan dalam elektroforesis.

Molekul DNA mempunyai muatan listrik yang bersifat negatif, sebagai akibatnya bila molekul DNA tersebut diletakkan pada medan listrik maka molekul DNA ini akan bergerak ke arah positif. Migrasi molekul DNA pada gel selama elektroforesis berlangsung ditentukan oleh berat molekul dan densitas muatan. Dengan semakin besar berat molekul suatu DNA maka migrasinya akan semakin lambat, demikian sebaliknya semakin kecil berat molekul suatu DNA maka migrasinya akan semakin cepat, oleh karena itu elektroforesis akan memisahkan



molekul DNA sesuai dengan ukurannya (Brown, 1991). Migrasi molekul melewati matriks atau pori-pori gel sebanding dengan jumlah pasangan basa dari suatu molekul, oleh karena itu perlu pemilihan konsentrasi gel yang tepat agar proses pemisahan molekul dengan elektroforesis dapat berjalan dengan baik. Dengan elektroforesis dapat ditentukan ukuran potongan DNA dengan membandingkan potongan DNA yang tersebar pada plat elektroferesis gel dengan suatu standar DNA  $\lambda$  yang telah dipotong dengan enzim restriksi *HindIII*.

Untuk melihat hasil elektroforesis gel dapat dilakukan pengecatan gel dengan senyawa yang menyebabkan DNA dapat dilihat. Ethidium bromida sering dipakai untuk menampakkan DNA dalam gel agarosa dan poliakrilamid. Pita-pita yang menunjukkan posisi fragmen-fragmen dengan ukuran berbeda dapat dilihat dengan jelas di bawah penyinaran ultraviolet setelah pengecatan ethidium bromida dengan catatan terdapat DNA yang cukup. Untuk yang terdapat kurang dari 25 ng tiap pita, maka tidak mungkin hasil dapat tampak dengan pengecatan menggunakan ethidium bromida karena keterbatasan sensitivitas, oleh karena itu diperlukan cara deteksi yang jauh lebih sensitif, yaitu menggunakan autoradiografi DNA yang dilabel radioaktif (Brown, 1991).

Tipe-tipe gel atau konsentrasi agarosa dalam gel yang digunakan untuk memisahkan fragmen-fragmen restriksi dengan elektroforesis berbanding terbalik dengan jumlah pasang basa suatu DNA (Berg, 2002). Kisaran ukuran DNA yang dapat dipisahkan dengan gel agarosa secara efisien dapat dilihat pada tabel 2.2 (Sambrook *et al.*, 1989).

**Tabel 2.2** Range pemisahan molekul DNA dengan gel agarosa

<b>Konsentrasi agarosa dalam gel %(w/v)</b>	<b>Kisaran ukuran DNA (kb) yang dapat dipisahkan secara efisien</b>
0,3	5,0 – 60,0
0,6	1,0 – 20,0
0,7	0,8 – 10,0
0,9	0,5 – 7,0
1,2	0,4 – 6 0
1,5	0,2 – 3,0
2,0	0,1 – 2,0



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga Surabaya, mulai bulan Februari sampai Juli 2005.

#### 3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah *Arthrobacter sp* B7 yang diperoleh dari Pabrik Dekstranase PTPN XI di Jatiroto, Jember.

#### 3.3 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.3.1 Bahan kimia.

Semua bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini memiliki derajat kemurnian pro-analisis (p.a) kecuali disebut lain. Bahan kimia yang digunakan antara lain: agar *bacto*, *trypton*, dekstran, akuades,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaOAc}$ , ethidium bromida, brom fenol biru, trisma base,  $\text{HCl}$ , *lysozym* (Sigma), *Sau3A* (Amershan), etanol, fenol, EDTA.

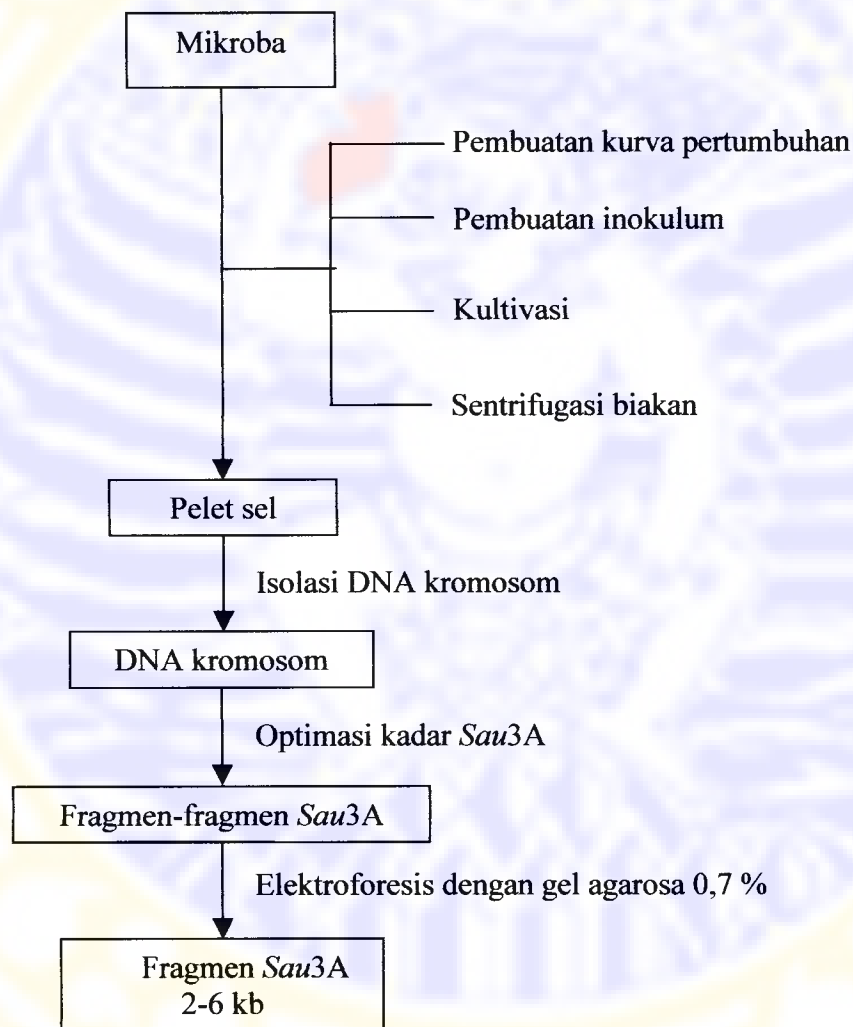
##### 3.3.2 Alat penelitian.

Alat-alat yang digunakan antara lain: alat gelas yang biasa digunakan, pipet mikro, tip, tabung Eppendorf, jarum ose, bunsen, neraca analitik, pH meter, sentrifuga, inkubator, seperangkat alat elektroforesis (Biorad), spektrofotometer

UV-VIS (Shimadzu), *laminar air flow cabinet*, *autoklaf*, *frezeer* – 20 °C, *vortex*, *shaker* dan *transluminator*.

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Diagram alir penelitian.



Gambar 3.1 Skema kerja manipulasi enzimatik DNA kromosom *Arthrobacter sp B7* dengan menggunakan *Sau3A*

### 3.4.2 Pembuatan media pertumbuhan.

Media pertumbuhan cair terdiri dari (b/v): ekstrak ragi 0,5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,24%,  $\text{NaCl}$  0,1%,  $\text{CaCl}_2$  0,01% dan dekstran 2%. Setelah bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam akuades, pH larutan dibuat 7 dengan menambahkan larutan  $\text{NaOH}$  secukupnya, kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

Bahan untuk media pertumbuhan padat sama dengan media pertumbuhan cair dan ditambah dengan agar bacto 1,5% (b/v).

### 3.4.3 Kultivasi *Arthrobacter sp B7*.

#### 3.4.3.1 Pembuatan kurva pertumbuhan.

Biakan agar dipindahkan ke dalam media pertumbuhan 50 mL dalam labu Erlenmeyer 125 mL sebanyak 1 mata ose, kemudian diinkubasi dengan penggojokan 150 rpm pada suhu kamar selama 6 jam. Suspensi diambil 3 mL dan diukur densitas optiknya dengan spektrofotometer UV-VIS pada  $\lambda$  600 nm. Sisa suspensi biakan ini sebanyak 1% (v/v) ditambahkan ke media pertumbuhan 100 mL dalam labu Erlenmeyer 250 mL, diinkubasi dengan penggojokan 150 rpm pada suhu kamar. Prosedur pembuatan kurva pertumbuhan ini dilakukan secara aseptis. Pengukuran OD (*optical density*) dilakukan sampling sebanyak 2 mL setiap selang waktu 2 jam. Sampling pertama dilakukan pada jam kedua dilanjutkan sampai nilai OD menunjukkan penurunan yang jelas. Kurva pertumbuhan diperoleh dari hasil pengukuran densitas optik yang diplot terhadap waktu inkubasi.

### 3.4.3.2 Pembuatan inokulum.

Stok biakan mikroba B7 yang diperoleh dari PTPN XI Jatiroto, Jember dipindahkan menggunakan ose ke medium cair pertumbuhan. Biakan diinkubasi selama 6-8 jam dengan penggojokan 150 rpm, maka diperoleh inokulum mikroba B7.

### 3.4.3.3 Penggandaan sel *Arthrobacter sp B7*.

Disiapkan 50 mL medium pertumbuhan cair yang steril dalam erlenmeyer 125 mL, diinokulasi dengan 0,5 mL inokulum mikroba *Arthrobacter sp B7*, kemudian diinkubasi pada suhu kamar dengan penggojokan 150 rpm selama 6-8 jam diperoleh biakan cair.

### 3.4.4 Isolasi DNA genom dari *Arthrobacter sp B7*.

DNA kromosom diisolasi dengan metode *freeze thaw*. Biakan bakteri sebanyak 6 mL disentrifugasi selama 10 menit sehingga diperoleh pelet sel yang kemudian disuspensi dengan 0,3 mL bufer TE. Suspensi dibekukan dalam *freezer*  $-20^{\circ}\text{C}$ . setelah beku segera ditambah dengan 0,03 mL larutan *lysozym* (10 mg/mL *lysozym* dalam 0,25 mM Tris HCl pH 8) yang baru dibuat dan dilakukan penggojokan menggunakan vortex sampai melumer, kemudian segera direndam dalam es selama 45 menit. ditambahkan 0,06 mL STEP (0,5% SDS; 50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,4 M EDTA; 1 mg / mL Proteinase K), dicampur dan diinkubasi dalam *water bath* pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit sambil sesekali dicampur perlahan. Ditambahkan 0,3 mL fenol kemudian dicampur pelan-pelan dan didiamkan dalam es selama 5 menit, lalu disentrifugasi selama 15 menit dan akan diperoleh dua lapisan yang terpisah. Lapisan atas (fasa air) dipipet dan

dipindahkan ke tabung lain. Lapisan atas yang telah dipindah ditambah dengan 1/10 volume 3 M larutan Natrium Asetat dan 2 kali volume etanol absolut, diinkubasi pada  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama semalam, disentrifuga pada 12.000 rpm selama 10 menit. Endapan dipisah dari supernatan dan dicuci dengan etanol 70 %, dibiarkan di udara sampai kering, dilarutkan dalam bufer TE. DNA kromosom hasil isolasi dianalisis dengan elektroferesis gel agarosa seperti pada prosedur 3.4.7 untuk mengetahui secara pasti keberhasilan dalam melakukan isolasi DNA kromosom dari *Arthrobacter sp B7*.

#### **3.4.5 Penentuan kemurnian dan kadar DNA.**

Kemurnian dan kadar DNA dilakukan dengan pengukuran densitas optik pada  $\lambda$  260 nm dan  $\lambda$  280 nm menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Rumus yang dipakai sebagai berikut (Sambrook *et al.*, 1989).

$$\text{Kemurnian DNA} = \text{OD pada } \lambda \text{ 260 nm} / \text{OD pada } \lambda \text{ 280 nm}$$

$$\text{Kadar DNA} = \text{OD pada } \lambda \text{ 260 nm} \times \text{pengenceran} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

#### **3.4.6 Digesti genom *Arthrobacter sp B7* dengan enzim restriksi *Sau3A*.**

Digesti DNA dilakukan menurut metode Ausubel *et al.* (1995). Disiapkan 9 buah tabung steril dan diberi nomor berurutan. Ke dalam tabung mikrosentrifuga nomor 9 dipipet 15  $\mu\text{L}$  DNA dalam TE, 15  $\mu\text{L}$  10 x bufer endonuklease restriksi, 1,5  $\mu\text{L}$  BSA dan 118,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Kemudian ke dalam tabung nomor 1 diisi dengan campuran reaksi sebanyak 30  $\mu\text{L}$  sedangkan 7 buah tabung lainnya diisi campuran reaksi sebanyak 15  $\mu\text{L}$ . Ditambahkan enzim endonuklease restriksi 10 U/ $\mu\text{L}$  ke dalam tabung nomor 1 sebanyak 4 U, Kemudian campuran reaksi diencerkan secara paralel sehingga jumlah unit aktivitas *Sau3A* pada tabung nomor 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7 dan 8 adalah sebagai berikut: 4 U; 2 U; 1U; 0,5 U; 0,25 U; 0,125 U; 0,0625 U dan 0,03125 U. Tabung nomor 9 tidak diisi dengan enzim restriksi, kemudian 9 buah tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam.

### 3.4.7 Elektroforesis gel agarosa.

Fragmen restriksi dipipet 5  $\mu$ L dan dilakukan elektroforesis gel agarosa 0,7% (0,7 g agarosa dalam 100 mL TBE) dengan menggunakan marker DNA  $\lambda$ HindIII. Gel elektroforesis direndam dalam bufer TBE  $\frac{1}{2}x$ . Sampel yang telah ditambah dengan *loading buffer* (0,25% bromofenol biru; 40% (w/v) sukrosa) dimasukkan dalam sumur dalam gel, kemudian proses elektroforesis dijalankan. Setelah proses elektroforesis gel agarosa direndam dalam larutan etidium bromida selama 5 menit dan larutan pencuci selama 10 menit, kemudian diamati di bawah sinar UV.



## BAB IV

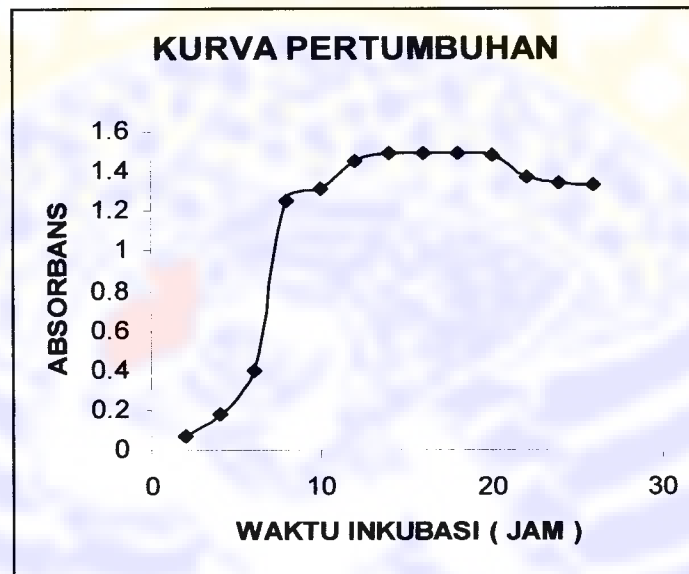
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Kultivasi *Arthrobacter sp B7*

##### 4.1.1 Kurva pertumbuhan.

Kurva pertumbuhan *Arthrobacter sp B7* terdapat pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa *Arthrobacter sp B7* tidak mengalami fase Adaptasi (fase Lag). Fase Adaptasi merupakan fase penyesuaian. Pada fase ini tidak terjadi penambahan sel, akan tetapi mikroorganisme hanya menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Pada kurva pertumbuhan yang diperoleh tidak terdapat fase Adaptasi karena mikroorganisme telah mengenal media pertumbuhannya. Fase Pertumbuhan Awal nampak mulai jam ke-2. Pada fase ini mikroorganisme mulai membelah dengan kecepatan yang masih rendah. Pada jam ke-6 pertumbuhan sel mulai meningkat tajam. Fase ini merupakan fase Logaritmik (Ekspensial), yaitu fase dimana sel membelah dengan kecepatan pembelahan maksimum yang konstan. Fase Pertumbuhan Lambat mulai terjadi pada jam ke-8. Pada fase ini kecepatan penambahan sel tidak lagi sebanding dengan waktu namun jumlah sel yang hidup masih lebih banyak daripada jumlah sel yang mati. Pada jam ke-12 kecepatan penambahan dan pengurangan sel sebanding sehingga jumlah biomasnya tetap, kandungan nutrisi dalam media pertumbuhan juga menurun yang menyebabkan daya tahan mikroorganisme juga mulai turun. Fase ini disebut fase Stasioner Setelah jam ke-20 pertumbuhan mikroorganisme mengalami

penurunan karena kandungan nutrisi sudah habis dan terjadi pengurangan sel sehingga fase ini disebut juga fase kematian.



Gambar 4.1 Kurva pertumbuhan *Arthrobacter sp B7*

#### 4.1.2 Penggandaan sel.

Koloni tunggal *Arthrobacter sp B7* dari media pertumbuhan padat dipindahkan ke dalam media pertumbuhan cair, kemudian diinkubasi selama 6-8 jam pada suhu kamar dengan penggojokan 150 rpm. Hasil yang diperoleh berupa biakan cair sel *Arthrobacter sp B7*, yang di panen pada fase logaritmik. Sel yang diperoleh dari penggandaan sel ini kemudian di isolasi untuk memperoleh DNA kromosom.

#### 4.2 Isolasi DNA Kromosom *Arthrobacter sp B7*

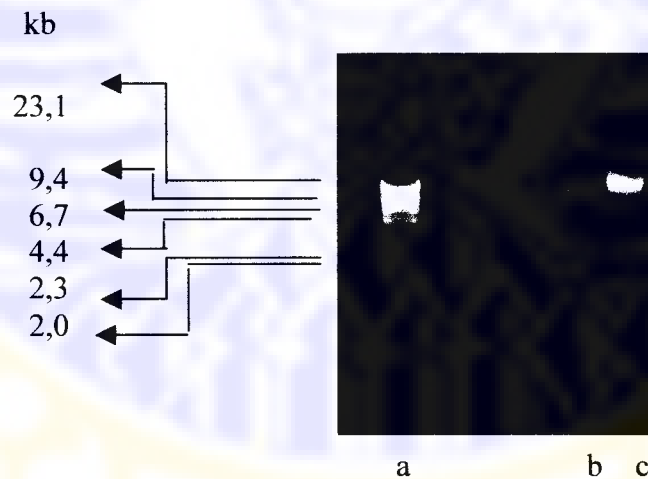
Isolasi DNA kromosom *Arthrobacter sp B7* dilakukan dengan metode *freeze thaw*, menghasilkan preparat DNA kromosom sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dengan spesifikasi sebagai berikut: serapan pada 260 nm = 0,122

serapan pada 280 nm = 0,093

kemurnian = 1,312

kadar DNA= 0,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Pada elektroforesis, preparat DNA tersebut memberikan hasil yang baik, yaitu berupa pita kompak tanpa *smear*, akan tetapi angka kemurnian sebesar 1,312 menunjukkan bahwa preparat ini masih mengandung pengotor, baik yang berupa protein atau pengotor lain, oleh karena itu preparat DNA ini dimurnikan lebih lanjut dengan *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* agar proses hidrolisis dengan enzim restriksi berlangsung secara efisien.



Gambar 4.2 Elektroforegram DNA Genom *Arthrobacter sp B7*  
 a. Marker DNA  $\lambda$  HindIII; b. DNA Genom *Arthrobacter sp B7* dengan pemurnian; c. DNA Genom *Arthrobacter sp B7* tanpa pemurnian

Pada proses isolasi DNA kromosom menggunakan metode *freeze thaw* tidak ditambahkan RNase untuk menghilangkan RNA sehingga seharusnya pada gel agarosa terdapat pita RNA, namun pada Gambar 4.2 hasil elektroforesis tidak nampak pita RNA hal ini dikarenakan proses elektroforesis berjalan cukup lama sehingga kemungkinan RNA sudah keluar dari gel agarosa.

### 4.3 Digesti Genom *Arthrobacter sp B7*

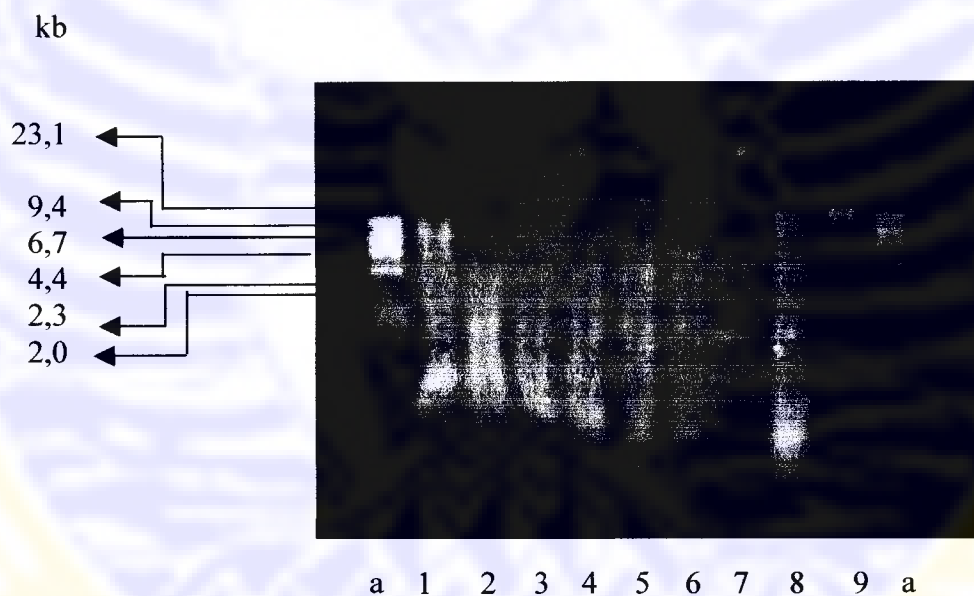
DNA kromosom *Arthrobacter sp B7* hasil isolasi dilakukan digesti dengan menggunakan enzim restriksi *Sau3A*, suatu enzim restriksi yang memiliki frekuensi pemotongan tinggi (*frequently cutting*). Enzim ini menghasilkan banyak fragmen dengan ukuran kecil sebab enzim ini mempunyai sisi pemotongan berupa urutan rekognisi tetranukleotida GATC. Satu unit enzim restriksi *Sau3A* adalah kuantitas dari enzim restriksi *Sau3A* yang digunakan untuk memotong 1  $\mu\text{g}$  DNA pada suhu 37 °C selama 1 jam.

Pemotongan DNA kromosom dengan enzim restriksi *Sau3A* dilakukan secara parsial pada tingkat yang tepat dengan tujuan agar sedapat mungkin gen penyandi enzim dekstranase tidak terpotong internal.

Hasil pemotongan parsial DNA kromosom *Arthrobacter sp B7* pada suhu 37 °C selama 1 jam, dengan enzim restriksi *Sau3A* pada berbagai unit aktivitas dapat dilihat pada Gambar 4.3, sedangkan unit aktivitas dari enzim restriksi *Sau3A* yang digunakan dalam campuran reaksi digesti dapat dilihat pada Tabel 4.1.

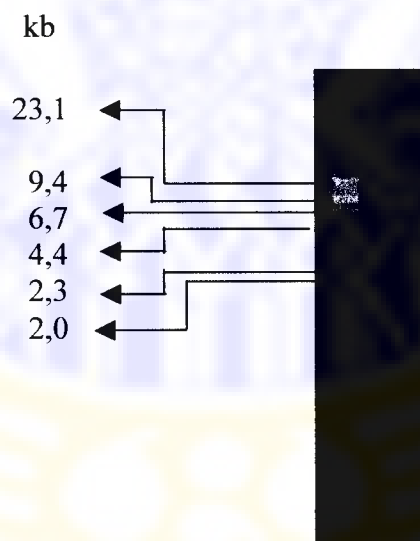
**Tabel 4.1** Unit aktivitas dari enzim restriksi *Sau3A* yang digunakan dalam campuran reaksi digesti

Nomor Tabung	Unit total <i>Sau3A</i> (U)
1	4
2	2
3	1
4	0,5
5	0,25
6	0,125
7	0,0625
8	0,03125
9	-



**Gambar 4.3** Elektforegram DNA kromosom *Arthrobacter sp* B7 yang telah dilakukan digesti dengan *Sau3A*  
 a. DNA  $\lambda$  (standar) yang telah dipotong oleh enzim *HindIII*; nomor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 merupakan campuran reaksi digesti DNA kromosom *Arthrobacter sp* B7 menggunakan *Sau3A* dengan aktivitas *Sau3A* pada Tabel 4.1.

Pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa pemotongan DNA kromosom *Arthrobacter sp* B7 dengan enzim restriksi *Sau3A* 0,03125 U memberikan pita *smear* di daerah 2-6 kb yang lebih intensif dibanding pemakaian *Sau3A* yang lebih tinggi. Akan tetapi pita *smear* yang tebal justru terdapat pada daerah di bawah 2 kb. Hal ini disebabkan waktu inkubasi yang terlalu lama. Pita tebal yang terletak pada bagian bawah merupakan pita RNA sebagai hasil dari proses isolasi DNA kromosom tanpa penambahan RNase, namun hal ini tidak mempengaruhi proses digesti karena urutan yang dikenali oleh *Sau3A* berupa basa nukleotida GATC sedangkan pada RNA tidak terdapat basa nukleotida timin (T) sehingga RNA tidak akan terpotong oleh *Sau3A*. Untuk memperoleh fragmen berukuran 2-6 kb dalam jumlah yang lebih banyak dapat dilakukan dengan mengurangi lama waktu inkubasi, sehingga daerah yang paling intensif berada di sekitar 2-6 kb. Selanjutnya fragmen restriksi 2-6 kb dipotong pada daerah ini sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Pemotongan fragmen restriksi 2-6 kb



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fragmen restriksi berukuran 2-6 kb dihasilkan dari digesti parsial DNA kromosom *Arthrobacter sp* B7 dengan menggunakan *Sau3A* 0,03125 U pada inkubasi 37°C selama 1 jam.

#### 5.2 Saran

Untuk mendapatkan fragmen dari *Arthrobacter sp* B7 berukuran 2-6 kb yang lebih banyak disarankan untuk melakukan optimasi lama waktu inkubasi dengan unit aktivitas *Sau3A* sebesar 0,03125 U.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J. and Struhl, K. (ed.), 1995, *Short Protocol in Molecular Biology*, 3<sup>th</sup>Ed., John Wiley and Sons, Inc., Canada.
- Baktir, A., 2004, *Kloning Fragmen Gen dan Karakterisasi Enzim Dekstranase B7DEX yang Berpeluang sebagai Penghambat Pembentukan Plak Gigi*, Disertasi Program Pasca Sarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Berg, J.M., John, T., Lubert, S., 2002, *Biochemistry*, 5<sup>th</sup>Ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- Brown, T.A., 1991, *Pengantar Kloning Gena*, (Editor : Prof. Soemiati Ahmad Muhammad Praseno), Yayasan Essentia Medika, Yogyakarta.
- Buckle, K.A., Edward, R.A., Fleet, G.H., Wootton, M., 1985, *Ilmu Pangan*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K. and Kotani, S., 1974, **The structure of water Insoluble Glucans of Cariogenic Streptococcus mutans**, *Carbohydr. Res.*, 38 , 370-374.
- Fersht, Alan, 1985, *Enzym Structure and Mechanism*, W.H. Freeman and Company, New York.
- Galea and Inkerman, 1993, **Dextran Analysis of Raw Sugar, Peirt I, A specific Method for Total Dextran**, *International Sugar Journal*, 95 (1136), 309-313.
- Halpern, M.G., 1981, **Industrial Enzyme for Microbial Source**, *Chemical Technology Review*, 186, Noyes Data Corporation, USA.
- Hamada,S. and Slade, H.D., 1976, **Biology Immunology and Cariogenicity of Streptococcus mutans**, *Microbiology Rev.*, 44: 331-384.
- Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N., 1998, **Detection of Dextranase Producing Gram Negatif Oral Bacteria, Oral Microbia.**, *Immunol.*, 13, 382-386.
- Kosaric, N., Yu, K., Zajic, J.E., 1973, **Dekstranase Production from Penicillium furiculosom**, *Biotechnology and Bioengineering*, vol XXV, 729-741.
- Murdiyatmo, U., Ambarsari, L., Widayati, W.E., Hartayani, L., 1994,

**Dekstranase Bakterial: Produksi dan penggunaannya di Pabrik Gula,**  
*Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II,*  
Cibinong.

Rehm, H. J., Reed, G., 1993, *Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> Edition, Weinheim, German.

Safaric, Ivo, Miroslava Safarikovat, 1992, **A new substrat for Determination of Dextranase Activity in Coloured Samples**, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol 16, 263-268.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Wolfe, S.L., 1993, *Molecular and Cellular Biology*, Wadsworth publishing Company, California.

**Lampiran 1. Data O.D (*optical density*) terhadap waktu**

Jam ke-	Nilai O.D
2	0,065
4	0,176
6	0,394
8	1,248
10	1,313
12	1,454
14	1,489
16	1,488
18	1,486
20	1,485
22	1,369
24	1,346
26	1,330