

Kloning Gen β -1,4 Glukanase dari *Burkholderia cepacia* ke dalam *Escherichia coli* dan Karakterisasi Sekuennya

Fitriani Winangsih¹, Maria Bintang^{1*}, Tri Puji Priyatno²

¹Departemen Biokimia, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Cimanggu, Bogor 16111, Indonesia

Received: 19 September 2014; Accepted: 3 December 2014

*Corresponding author: Prof. Dr. Drh. Maria Bintang, MS; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; Email: maria_bintang@yahoo.com

ABSTRACT

The increasing of rice plant production has to deal with some constraints caused by pathogen infection such as by bacteria, viruses or fungi. Endophytic bacteria have antagonistic capacity against fungi and was used to prevent the invasion of the pathogen. *Burkholderia cepacia* is one of the endophytic bacteria carrying genes expressed in defense system against fungi by producing glucanase enzyme. The aim of this research was to clone a gene encoding β -1,4-glucanase from *B. cepacia* into the expression system in *Escherichia coli*. The clone of glucanase gene was isolated by PCR technique using DNA fragment of *B. cepacia* from rice plants. The Glu 1320 primer pairs were designed based on the glucanase gene nucleotide sequence on online database, with the length of the amplicon DNA of 1300 bp. Results from BlastN and BlastX analysis showed that the DNA fragment which was cloned into pGEM-T Easy vector had similarity with Endo-1,4-D-glucanase gene of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. The identity of the cloned DNA fragment was 99% and E-value 0.0. Proteomic analysis of the amino acid sequence was done using Server ExPASy Proteomic and the total of amino acid was 451 with, molecular weight of 48.363 kDa and isoelectric point (pI) of 5.87. The signal peptide had cleavage sites on position 23 and 24 in amino acid AAA-AE. Recombinant protein clone was obtained from Protein Data Bank (PDB) database with the code of 4q2b.2.A. The protein consist of 349 residu which formed the secondary structure like of 7 beta-hairpin pairs, 20 turn, 3 helix-3/10, and 17 alpha-helix.

Keywords: *Burkholderia cepacia*, β -1,4-glucanase, PCR, DNA sequencing.

ABSTRAK

Peningkatan produksi tanaman padi dapat mengalami beberapa kendala diantaranya disebabkan oleh adanya infeksi patogen yang terjadi karena bakteri, virus atau kapang. Upaya pengendalian terhadap patogen dapat dilakukan dengan memanfaatkan bakteri endofitik yang bersifat antagonis terhadap kapang patogen. Salah satu bakteri endofitik yang memiliki gen sifat ketahanan terhadap kapang adalah *Burkholderia cepacia* yang menghasilkan glukanase. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning gen penyandi enzim β -1,4-glukanase dari *Burkholderia cepacia* ke dalam sistem ekspresi *Escherichia coli*. Klon gen glukanase diisolasi dari bakteri *B. cepacia* yang berasal dari tanaman padi dengan teknik PCR menggunakan primer Glu 1320 yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen glukanase dari basis data online menghasilkan fragmen DNA berukuran 1300 bp. Hasil analisis BlastN dan BlastX dari urutan klon rekombinan menunjukkan bahwa gen berukuran 1300 bp yang telah diklon ke vektor pGEM-T Easy menunjukkan bahwa urutan fragmen DNANYA memiliki kemiripan dengan gen Endo-1,4-D-glukanase pada *Burkholderia mallei* dan *Burkholderia pseudomallei*. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai kemiripan (Identity) 99% dan E-value 0.0. Analisis proteomik hasil urutan asam amino menggunakan Server ExPasy Proteomic menunjukkan gen rekombinan glukanase memiliki jumlah asam amino 451, bobot molekul 48.363 kDA dan memiliki titik isoelektrik (pI) sekitar 5.87. Peptida sinyal memiliki sisi pemotongan berada pada posisi 23 dan 24 yang terletak pada asam amino AAA-AE. Protein klon rekombinan diperoleh dari basis data Protein Data Bank (PDB) dengan kode 4q2b.2.A. Protein ini terdiri atas 349 residu yang membentuk struktur sekunder berupa 7 pasang beta-hairpin, 20 turn, 3 helix-3/10, dan 17 alpha-helix.

Kata kunci: *Burkholderia cepacia*, β -1,4-glukanase, PCR, sekuensing DNA.

1. PENDAHULUAN

Padi merupakan salah satu makanan pokok bagi sebagian besar masyarakat Indonesia, sehingga perlu dilakukan peningkatan produksi tanaman padi untuk mencapai stabilitas pangan. Peningkatan produksi tanaman padi sering mengalami beberapa kendala. Salah satu diantaranya disebabkan oleh adanya infeksi patogen. Infeksi patogen pada tanaman dapat terjadi karena bakteri, virus atau kapang. Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, pencegahan infeksi kapang pada bidang pertanian sering dilakukan secara kimiawi, namun kurang disukai karena selain memerlukan biaya yang cukup tinggi, juga dapat meninggalkan residu yang berbahaya bagi

konsumen serta memiliki efek negatif terhadap lingkungan di sekitarnya. Menurut Prince dan Prabakaran (2011) penggunaan bahan kimia sebagai alternatif dalam pencegahan penyakit tanaman dapat menimbulkan sifat resistensi pada patogen dan membuat penggunaannya menjadi tidak efektif.

Upaya pengendalian terhadap patogen dapat dilakukan melalui pemanfaatan bakteri endofitik antagonistik yang menghasilkan enzim penghancur dinding sel kapang. Salah satu enzim yang dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan kapang patogen yaitu enzim β -glukanase. Secara alami enzim ini merupakan salah satu upaya pertahanan tanaman terhadap kapang patogen, namun keberadaan enzim ini

belum mampu menghambat perkembangan kapang patogen secara efektif (Shaikh 2005). Hidrolisis β -glukan pada dinding sel kapang dapat menurunkan integritas dinding sel, sehingga kapang tidak mampu menginfeksi tanaman (Shetty *et al.* 2009). Bakteri endofitik yang menghasilkan glukanase diantaranya adalah, *Burkholderia cepacia*. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Fathin (2012) menunjukkan bahwa *B. cepacia* menghasilkan β -1,3-1,4-glukanase.

Aplikasi rekayasa genetika dapat digunakan untuk memproduksi enzim yang diinginkan dalam jumlah besar. Teknik yang digunakan yaitu teknologi DNA rekombinan yang diharapkan dapat menghasilkan suatu strain yang membawa gen penyandi enzim yang diinginkan dengan kualitas yang jauh lebih baik dari sifat alaminya. Hal tersebut juga memudahkan proses manipulasi produksi enzim.

Di Indonesia, usaha ekspresi gen β -1,3-glukanase dan kitinase pada tanaman kopi arabika (*Coffea arabica* L.) tahan dan rentan karat daun melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah dirintis oleh beberapa peneliti (Budiani *et al.* 2004). Selain itu, proses pemurnian β -1,4-glukanase dari bakteri *B. cepacia* endofitik juga telah dilakukan (Fathin 2012). Namun informasi mengenai urutan DNA yang menyandi β -1,4-glukanase, proses ekspresi dan karakterisasi gen β -1,4-glukanase dari *B. cepacia* pada tanaman padi belum pernah dilakukan. Sebagai upaya pengendalian terhadap kapang patogen pada tanaman padi maka tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan kloning gen penyandi enzim β -1,4-glukanase dari *B. cepacia* serta karakterisasi rekombinan β -1,4-glukanase dari *B. cepacia* pada *Escherichia coli*.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan

Bakteri endofitik *B. cepacia* yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain Biogen CCE76 yang diisolasi dari tanaman padi. Bakteri dipelihara dan disubkultur setiap 3 minggu sekali pada media agar miring Luria-Bertani (LB) dalam tabung reaksi. Komposisi media terdiri atas 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, dan 5 g/L ekstrak khamir. Biakan diinkubasikan pada suhu ruangan.

Perancangan primer β -1,4-glukanase

Primer spesifik dirancang untuk amplifikasi daerah konservatif gen β -1,4-glukanase melalui tahapan inventarisasi urutan glukanase. Koleksi sekuen terpilih diujarkannya untuk mendapatkan daerah yang tinggi homologi urutannya daerah lestari menggunakan program *Bioedit ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Daerah dengan homologi tinggi ini digunakan sebagai acuan perancangan primer menggunakan program Primer3 (<http://www.biotools.umassmed.edu/>) dengan mempertimbangkan persyaratan primer yang ideal. Pasangan primer yang dirancang yaitu Glu1320-F (ATGGCGAGCTTCTCGTGATGG) dan Glu1320-R (TCAACGCGCGGGCGTCAGCAC).

Ekstraksi DNA genomik *B. cepacia*

B. cepacia dibiakkan pada 15 mL media cair LB dalam labu Erlenmeyer 100 mL selama 24 jam pada suhu ruang sambil digoyang menggunakan pengocok goyang (*orbital shaker*) dengan kecepatan 75 rpm. Kemudian sel bakteri dipanen menggunakan sentrifugasi

dengan kecepatan 12.000 rpm pada 4°C selama 10 menit agar sel dapat mengendap. Endapan sel bakteri diresuspensi dengan buffer, lalu DNA diekstraksi menggunakan *DNA Extraction Kit* (1st base). DNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan untuk proses amplifikasi gen β -1,4 glukanase (Modifikasi Sambrook dan Russell 2001).

Amplifikasi gen β -1,4 glukanase

Gen β -1,4 glukanase diamplifikasi dari *B. cepacia* menggunakan primer spesifik yang telah didesain sebelumnya mengikuti metode Sambrook dan Russell (2001). Komposisi reaksi PCR terdiri atas 1 μ L DNA *B. cepacia* dengan konsentrasi 200 μ g, 1 μ L primer maju 20 pmol, 1 μ L primer mundur 20 pmol, 0.5 unit (U) polimerase *Taq*, 10 μ mol MgSO₄, 2 μ L 10 \times PCR buffer, dan *mili-Q water* ditambahkan hingga total volume reaksi PCR 20 μ L. Reaksi PCR dijalankan dengan program sebagai berikut satu siklus inisiasi (94°C, 4 menit) dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari: denaturasi pada 94°C selama 1 menit; penempelan primer pada 58°C, selama 1 menit; pemanjangan pada 72°C selama 3 menit; serta 5 menit ekstensi pada 72°C. Hasil PCR diverifikasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%.

Kloning produk PCR dan sekuensing DNA

Fragmen pada gel agarosa yang tervisualisasi dengan ukuran 1300 bp diekstraksi menggunakan *Gel DNA Fragments Extraction Kit* (1st base). Hasil ekstraksi DNA diligasikan pada vektor kloning pGEM-T *Easy* berdasarkan panduan ligasi Promega. Volume ligasi terdiri atas: 3 μ L hasil PCR (gen β -1,4 glukanase), 1 μ L vektor pGEM-T *Easy*, 5 μ L buffer ligase 2 \times , dan 1 μ L T4 DNA. Reaksi ini dilakukan

pada suhu ruang dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam, kemudian ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α . Selanjutnya dikulturkan pada medium LB agar yang mengandung ampisilin, IPTG, dan X-gal. Setelah diinkubasi semalam pada suhu 37°C, maka dilakukan seleksi koloni yang tumbuh. Koloni putih yang tumbuh pada medium seleksi dianalisis dengan PCR koloni dan membuat duplikat terhadap koloni terpilih. Selanjutnya dilakukan proses isolasi plasmid rekombinan menggunakan *Miniprep Kit* (1st base) terhadap kultur *E. coli* rekombinan terpilih.

Plasmid rekombinan pGEM-Gln ditentukan urutan nukleotidanya untuk memastikan bahwa fragmen yang telah diklon adalah gen β -1,4-glukanase. Penentuan urutan nukleotida dilakukan menggunakan primer Glu 1320. Penentuan urutan nukleotida dilakukan di Laboratorium 1st Base PT. Genetika Science, Singapura dengan mengirimkan sampel plasmid DNA rekombinan. Hasil penentuan urutan nukleotida berupa data urutan nukleotida dianalisis menggunakan perangkat lunak Bioedit versi 7.0.9. Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program bioinformatika *Basic local Alignment search tool* (BlastN dan BlastX) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (Altschul *et al.* 1990).

3. HASIL

Isolasi dan amplifikasi gen β -1,4 glukanase

DNA *B. cepacia* diisolasi dari isolat bakteri *B. cepacia* yang berasal dari tanaman padi. Hasil isolasi digunakan sebagai DNA cetakan untuk amplifikasi gen β -1,4-glukanase dengan menggunakan primer maju Glu1320 dan primer mundur Glu1320. Gen β -1,4-glukanase

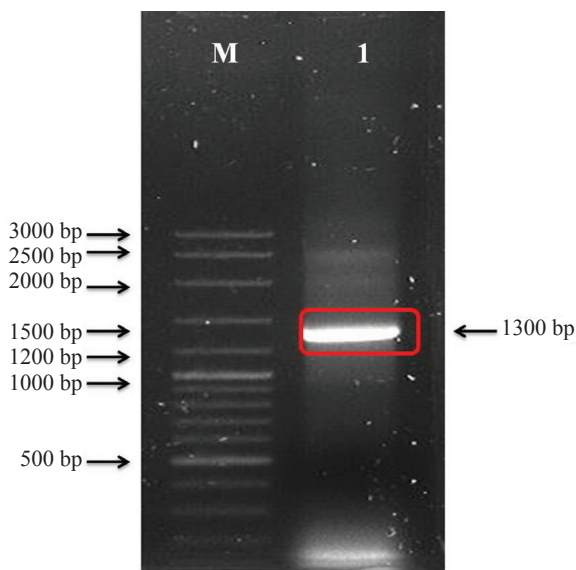
yang berhasil diamplifikasi memiliki ukuran 1300 bp yang dapat dilihat pada Gambar 1.

Kloning gen β -1,4-glukanase produk PCR

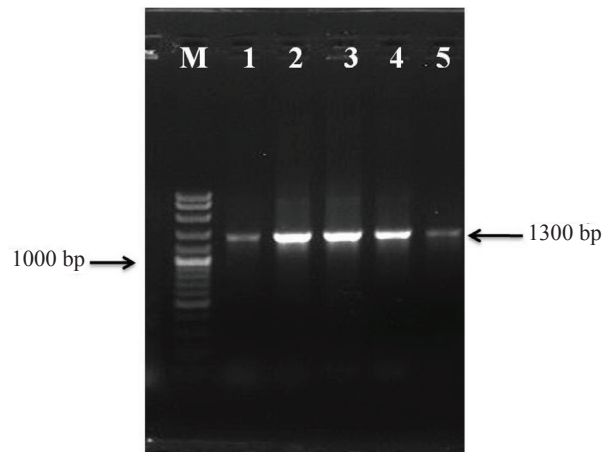
Kloning fragmen glukanase dilakukan ke vektor pGEM-T Easy menghasilkan lima koloni positif yang tumbuh pada media seleksi mengandung ampisilin, IPTG dan X-Gal (Gambar 2) dipanen dan dilakukan isolasi plasmid untuk memastikan bahwa koloni positif tersebut membawa sisipan gen glukanase.

Penentuan urutan nukleotida dan analisis urutan DNA

Hasil urutan nukleotida gen penyandi β -1,4-glukanase diubah ke dalam bentuk FASTA Format menggunakan *software Bioedit* (Gambar 3; Tabel 1 dan 2). Hasil penentuan urutan nukleotida yang dilakukan dua arah memperoleh sekuen penuh fragmen DNA glukanase dengan panjang 1314 bp. Sekuen memiliki kodon awal ATG pada ujung 5' dan kodon akhir TGA pada ujung 3'.



Gambar 1 Hasil amplifikasi gen β -1,4-glukanase *B. cepacia* strain Biogen CCE76 (M = Marker 100 bp; 1 = produk PCR)



Gambar 2 Hasil amplifikasi koloni terpilih dengan menggunakan primer Glu1320-F dan Glu 1320-R (M = Marker 100 bp; 1, 2, 3, 4 dan 5 = koloni positif)

Analisis Proteomik

Analisis urutan asam amino (Gambar 4) dilakukan menggunakan *Server ExPASy Proteomic* pada web <http://web.expasy.org/protparam/>. Protein dari klon rekombinan dengan kode 4q2b.2.A diperoleh dari basis data Protein Data Bank (PDB) (Gambar 5). Hasil penjajaran urutan asam amino diketahui melalui penjajaran *Clustal W* (Gambar 6).

4. PEMBAHASAN

Amplifikasi gen β -1,4-glukanase *B. cepacia* dilakukan menggunakan sepasang primer yaitu primer maju Glu1320 dan primer mundur Glu1320 menunjukkan DNA yang teramplifikasi berupa pita DNA tunggal yang memiliki ukuran 1300 bp (*full length CDS*). Hasil tersebut menunjukkan bahwa primer yang digunakan dalam proses amplifikasi fragmen gen target memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi sehingga komplementasi antara basa-basa primer dengan basa-basa pada kedua ujung fragmen DNA berjalan dengan baik.

```
>Sekuen gluknanase
ATGGCGAGCTTCTCGGTGATGGCGTTCGCGGGCGGCGACGTTGCCGGTGTCGT
GGCGCGTCGCGCGGCGGAGCGTACGCGGAGCGGCGGCGATCGCGCGG
GCGGGCTGCGCGACACGGCGGGCTTGCTCGAGATCTCGGCGGCGGCGCCGG
CCTCGACGCCGATCCCGGCGGCGCCGCGGCGGTTTCGCGCAGCCGTTTCGCGCA
GCCGGCTCGCGCGTTCGCCGTCGCGAGCGCCTGCGCGCCGTCCTGGCCGCGC
TGGGACCGTTTCAAGCGTGACTTCGTATCGGCCGACGGCCGCGTGATCGACG
TCGGCTCGGCCGACGAGCGGACCGTATCCGAGGGGCGAGGCGTACGGCCTTTT
CTTCGCGCTCGTCGCGAACGACCGCGCGCGGTTTCGACGCGCTGCTGCGCTGG
ACCGAGGACAGTCTCGCGCAGGGCGATCTGAGCGCGCGTCTGCCCGCGTGG
CTGTGGGGCCGCGCGGCGGCGGCGCGTGGCGCGTGTCTCGATGCGAACGCC
GCGTCCGACGCCGATCTGTGGCTTGCGTACGCGCTGCTCGAAGCGGGGCGCT
TGTGGCGCGAGCGCAGCTACACGGCGCGCGGCGCGGCGTTCGCGGATGCGCG
TGCTCGACGAGGAGACCGCGACGCTGCCGGGGCTCGGTCTCGTGCTGCTGCC
GGGCCCCGATGGGTTTTTCGGCCGGCGCGCGACGCGTGGCGGCTGAATCCGAG
CTATTCGCCGCCGACGGCGATTTCGCGGGGATCGGCGCGCATGTGCCCGACGAC
GCGCGCTGGGCGCGGCTCGCGGGGCTTCGGCCGCGTGTGCTGACCGACAGC
GCGCCGCGCGGCTTCGCGCCGGACTGGGCGTGTATCGCGCGGCGGCGCGGCT
TCGAGCCGGACGCCGAAACGCATGCGGTGAGCGCGTACACCGCGATTTCGCG
TCTATCTGTGGGCGGGCATGCTCGATGCGGGCGATCCGCTGGCGCGGCGCGT
CGTCGCGCATTTCGCGCCGTTTCGCCGAGCATGTCGCCGCGCATGGCGCGCCG
CCGGAGGCGGTTCGATGCGACGACGGGCGCGGCCGCCCGCGCGACGGCAAT
GCCGGGTTTTCCGCGGCGGCCGTCGCGTTTCTCGAGGCGCGCGGCGAGCGGG
CGAGCGCCGACGCGCAGCTCGCGCGCGTTCGCGCGGCTCGAGCGCGAGCGGGC
AGCGGCTATTACGCGAACGTGCTGACGCTGTTTCGGGCTCGGCTGGCGCGCA
CGGGCGCTACCGGTTTCGCGGCCGACGGCACGCTGCGGGTTCGATGGAGCGA
GCCGTGCTCGACGCCCGCGCGTTGA
```

Gambar 3 Hasil sekuensing gen β -1,4-glukanase *B. cepacia* strain Biogen CCE76

Keberhasilan amplifikasi tergantung pada kemurnian DNA yang digunakan dalam reaksi PCR, selain itu juga dipengaruhi oleh tingkat spesifisitas dan suhu penempelan primer. Primer yang ideal dirancang memenuhi beberapa ketentuan umum, diantaranya panjang primer antara 18 hingga 28 nukleotida, komposisi G+C sekitar 50 – 60%, dan sepasang primer mempunyai titik leleh (T_m) yang seimbang, yakni tidak melebihi 70°C (Innis & Gelfand 1990; Yuwono 2006).

Proses seleksi koloni positif diawali dengan proses pemurnian fragmen DNA produk PCR. Fragmen DNA dengan ukuran 1300 bp yang merupakan produk PCR dimurnikan untuk membersihkan garam-garam dalam

reaksi PCR dan kemungkinan masih terdapat sisa genom yang dapat mempengaruhi atau mengganggu proses selanjutnya. Proses pemurnian menggunakan *Gel DNA Fragments Extraction Kit* untuk selanjutnya digunakan sebagai sisipan dalam proses transformasi. Produk PCR hasil pemurnian selanjutnya diligasikan dengan vektor kloning pGEM-T *Easy* dan ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α yang merupakan sel inang yang digunakan untuk melakukan kloning gen karena memiliki efisiensi transformasi yang tinggi. Penggunaan vektor pGEM-T *Easy* memiliki keunggulan, diantaranya memiliki dua buah asal mula replikasi dan gen ketahanan

Tabel 1 Hasil BlastN gen β -1,4-glukanase

Nomor Accession	Deskripsi Spesies	E-value	Identitas (%)
CP000547.1	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 10247 chromosome II, complete sequence	0,0	99
CP000545.1	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 10229 chromosome II, complete sequence	0,0	99
CP003782.1	<i>Burkholderia pseudomallei</i> BPC-006 chromosome II, complete sequence	0,0	99

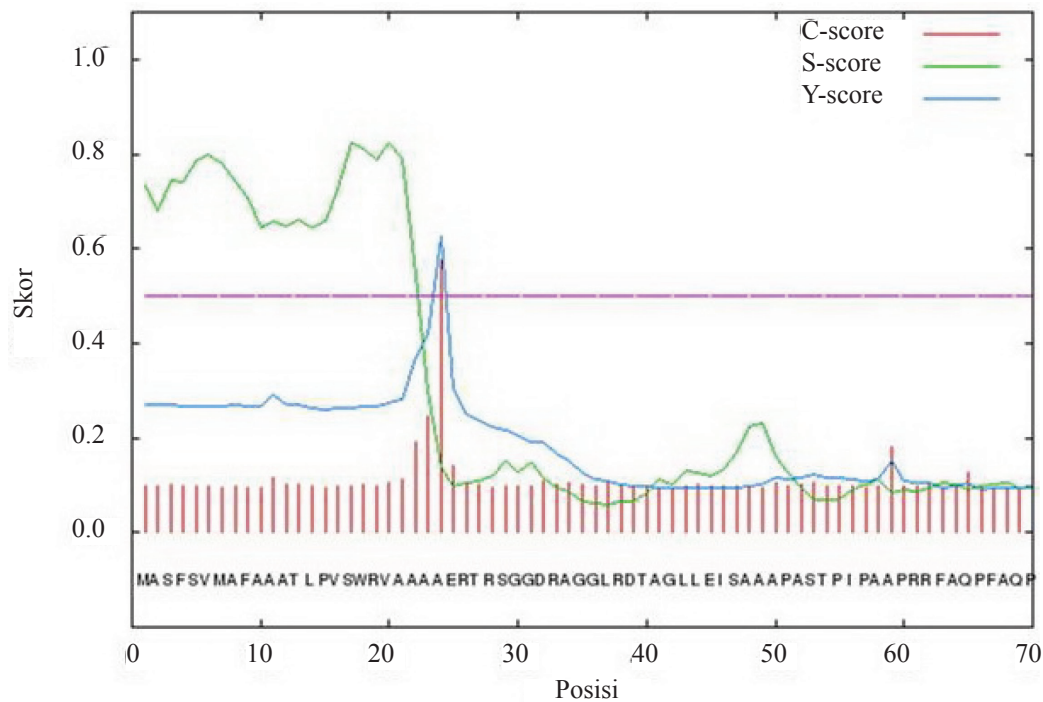
Tabel 2 Hasil BlastX gen β -1,4-glukanase

Nomor <i>Accession</i>	Deskripsi Spesies	<i>E-value</i>	Identitas (%)
WP 011857778.1	Endo-1,4-D-glukanase <i>B. mallei</i>	0,0	99
WP 011832151.1	Endo-1,4-D-glukanase <i>B. mallei</i>	0,0	99
WP 011204605.1	Endo-1,4-D-glukanase <i>B. mallei</i>	0,0	99

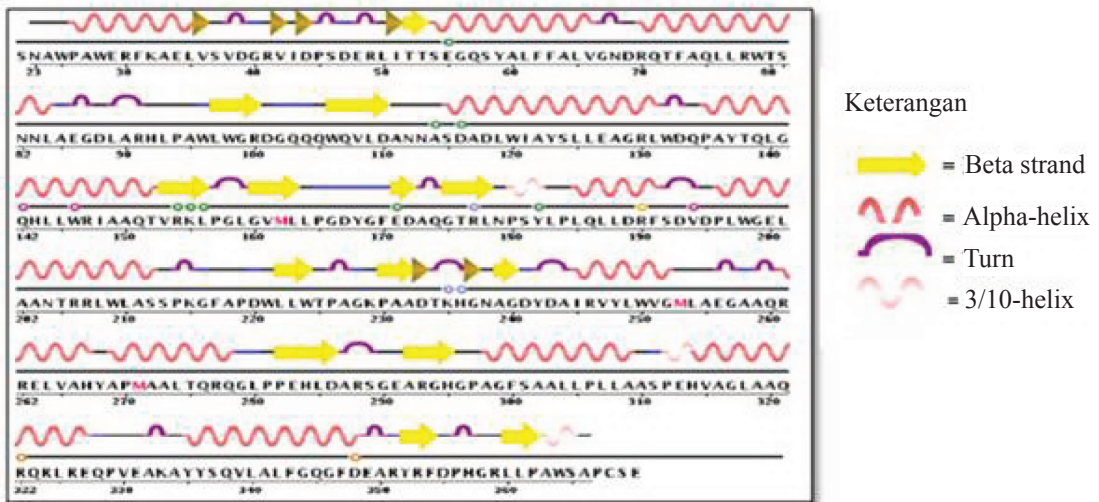
terhadap ampisilin. Plasmid ini mengandung *Multiple Cloning Site* (MCS) dan memiliki kelebihan timin yang menggantung di ujung terbuka plasmid (*T overhang*). Plasmid ini sering digunakan sebagai vektor untuk produk PCR yang selalu memiliki kelebihan adenin pada ujungnya tanpa memerlukan tahapan pemotongan terlebih dahulu. Plasmid pGEM-T *Easy* juga termasuk plasmid *high copy number* yang cocok untuk menyimpan gen sisipan dalam suatu inang. Proses skrining koloni positif menggunakan X-Gal untuk seleksi koloni warna putih-biru. Setelah seleksi koloni positif pada media seleksi yang mengandung antibiotik ampisilin, kemudian dilakukan proses

PCR koloni pada koloni bakteri yang tumbuh (koloni positif) berwarna putih (Sambrook dan Russell 2001).

Sebanyak lima koloni positif hasil transformasi diambil untuk kemudian dilakukan isolasi plasmid untuk memastikan bahwa koloni positif hasil transformasi membawa sisipan gen glukunase. Pada isolasi plasmid, pemisahan DNA plasmid dari DNA kromosom bakteri yang juga terdapat dalam sel didasarkan pada perbedaan konformasi antara DNA plasmid dan DNA bakteri. Bentuk plasmid tidak selalu sirkular, tetapi plasmid juga dapat berbentuk *supercoiled* (berlilitan), sedangkan DNA kromosom bakteri berbentuk sirkular dan pada saat terjadi



Gambar 4 Peptida sinyal gen β -1,4-glukanase (*Server Expsy Proteomic*)



Gambar 5 Struktur sekunder 4q2b.2.A (Endo-1,4-beta-D-glucanase)

```

>E. pseudomallei 1 -----TLPVSWRVAA AAERTRSGGERAGGLRDTAGLIEISAAAAPASTPIPAAP
>E. pseudomallei 1 -----TLPVSWRVAA AAERTRSGGERAGGLRDTAGLIEISAAAAPASTPIPAAP
>E. mallei 1 -----TLPVSWRVAA AAERTRSGGERAGGLRDTAGLIEISAAAAPASTPIPAAP
>E. mallei 1 -----TLPVSWRVAA AAERTRSGGERAGGLRDTAGLIEISAAAAPASTPIPAAP
>E. mallei 1 -----TLPVSWRVAA AAERTRSGGERAGGLRDTAGLIEISAAAAPASTPIPAAP
>E. cepacia 1 MASFSVMAFAAM TLPVSWRVAA AAERTRSGGERAGGLRDTAGLIEISAAAAPASTPIPAAP

>E. pseudomallei 49 RRFAQPFAQPARAFAVASACA PSWPRWDRFKRDFVSADGRVIDVGSADER TVSEGQAYGL
>E. pseudomallei 49 RRFAQPFAQPARAFAVASACA PSWPRWDRFKRDFVSADGRVIDVGSADER TVSEGQAYGL
>E. mallei 49 RRFAQPFAQPARAFAVASACA PSWPRWDRFKRDFVSADGRVIDVGSADER TVSEGQAYGL
>E. mallei 49 RRFAQPFAQPARAFAVASACA PSWPRWDRFKRDFVSADGRVIDVGSADER TVSEGQAYGL
>E. mallei 49 RRFAQPFAQPARAFAVASACA PSWPRWDRFKRDFVSADGRVIDVGSADER TVSEGQAYGL
>E. cepacia 61 RRFAQPFAQPARAFAVASACA PSWPRWDRFKRDFVSADGRVIDVGSADER TVSEGQAYGL

>E. pseudomallei 109 FFALVANDRAAFDALLRWTEENLAQGDLSARLPWLWGRAADGAWRVLDANAA3DADLWL
>E. pseudomallei 109 FFALVANDRAAFDALLRWTEENLAQGDLSARLPWLWGRAADGAWRVLDANAA3DADLWL
>E. mallei 109 FFALVANDRAAFDALLRWTEENLAQGDLSARLPWLWGRAADGAWRVLDANAA3DADLWL
>E. mallei 109 FFALVANDRAAFDALLRWTEENLAQGDLSARLPWLWGRAADGAWRVLDANAA3DADLWL
>E. mallei 109 FFALVANDRAAFDALLRWTEENLAQGDLSARLPWLWGRAADGAWRVLDANAA3DADLWL
>E. cepacia 121 FFALVANDRAAFDALLRWTEENLAQGDLSARLPWLWGRAADGAWRVLDANAA3DADLWL

>E. pseudomallei 169 AYALLEAGRLWRERSYTARGALLAKRVLDEETATLPGLGLVLLPGPMGFR PARDAWRLNF
>E. pseudomallei 169 AYALLEAGRLWRERSYTARGALLAKRVLDEETATLPGLGLVLLPGPMGFR PARDAWRLNF
>E. mallei 169 AYALLEAGRLWRERSYTARGALLAKRVLDEETATLPGLGLVLLPGPMGFR PARDAWRLNF
>E. mallei 169 AYALLEAGRLWRERSYTARGALLAKRVLDEETATLPGLGLVLLPGPMGFR PARDAWRLNF
>E. mallei 169 AYALLEAGRLWRERSYTARGALLAKRVLDEETATLPGLGLVLLPGPMGFR PARDAWRLNF
>E. cepacia 181 AYALLEAGRLWRERSYTARGALLAKRVLDEETATLPGLGLVLLPGPMGFR PARDAWRLNF

>E. pseudomallei 229 SYSPPQAIRGIGAHVDDARWARLAAGVGRVLTDSAPRGFAPDWALYRAGR GFEPDAETH
>E. pseudomallei 229 SYSPPQAIRGIGAHVDDARWARLAAGVGRVLTDSAPRGFAPDWALYRAGR GFEPDAETH
>E. mallei 229 SYSPPQAIRGIGAHVDDARWARLAAGVGRVLTDSAPRGFAPDWALYRAGR GFEPDAETH
>E. mallei 229 SYSPPQAIRGIGAHVDDARWARLAAGVGRVLTDSAPRGFAPDWALYRAGR GFEPDAETH
>E. mallei 229 SYSPPQAIRGIGAHVDDARWARLAAGVGRVLTDSAPRGFAPDWALYRAGR GFEPDAETH
>E. cepacia 241 SYSPPQAIRGIGAHVDDARWARLAAGVGRVLTDSAPRGFAPDWALYRAGR GFEPDAETH

>E. pseudomallei 289 AVSAYNAIRVYLVAGMLDAGDPLARPLVAHFAPFAEHVAAHGAPPEAVDATTGAAAAPRDG
>E. pseudomallei 289 AVSAYNAIRVYLVAGMLDAGDPLARPLVAHFAPFAEHVAAHGAPPEAVDATTGAAAAPRDG
>E. mallei 289 AVSAYNAIRVYLVAGMLDAGDPLARPLVAHFAPFAEHVAAHGAPPEAVDATTGAAAAPRDG
>E. mallei 289 AVSAYNAIRVYLVAGMLDAGDPLARPLVAHFAPFAEHVAAHGAPPEAVDATTGAAAAPRDG
>E. mallei 289 AVSAYNAIRVYLVAGMLDAGDPLARPLVAHFAPFAEHVAAHGAPPEAVDATTGAAAAPRDG
>E. cepacia 301 AVSAYNAIRVYLVAGMLDAGDPLARPLVAHFAPFAEHVAAHGAPPEAVDATTGAAAAPRDG

>E. pseudomallei 349 MAGFSAAAAPVFLFARGERASADAQLARVARLERETASGYGANVLTLPGLGWRDGRYRFAA
>E. pseudomallei 349 MAGFSAAAAPVFLFARGERASADAQLARVARLERETASGYGANVLTLPGLGWRDGRYRFAA
>E. mallei 349 MAGFSAAAAPVFLFARGERASADAQLARVARLERETASGYGANVLTLPGLGWRDGRYRFAA
>E. mallei 349 MAGFSAAAAPVFLFARGERASADAQLARVARLERETASGYGANVLTLPGLGWRDGRYRFAA
>E. mallei 349 MAGFSAAAAPVFLFARGERASADAQLARVARLERETASGYGANVLTLPGLGWRDGRYRFAA
>E. cepacia 361 MAGFSAAAAPVFLFARGERASADAQLARVARLERETASGYGANVLTLPGLGWRDGRYRFAA

>E. pseudomallei 409 DGTLLRVWSEPCSTPAR
>E. pseudomallei 409 DGTLLRVWSEPCSTPAR
>E. mallei 409 DGTLLRVWSEPCSTPAR
>E. mallei 409 DGTLLRVWSEPCSTPAR
>E. mallei 409 DGTLLRVWSEPCSTPAR
>E. cepacia 421 DGTLLRVWSEPCSTPARS
    
```

Gambar 6 Hasil peninjauan urutan asam amino (*Clustal W*)

preparasi, ekstrak sel akan pecah menjadi fragmen-fragmen linear (Brown 2010).

Karakterisasi selanjutnya dari gen β -1,4-glukanase dengan ukuran 1300 bp dilakukan dengan proses sekuensing DNA hasil rekombinan. Hasil sekuensing (Gambar 3) yang diperoleh berupa kromatogram yang dilanjutkan dengan analisis *Blast* untuk mengetahui dan memastikan identitas lengkap gen penyandi β -1,4-glukanase. Hasil sekuensing gen penyandi β -1,4-glukanase diubah ke dalam bentuk *FASTA Format* menggunakan *software Bioedit*. Hasil BlastN yang dihasilkan dari sekuen gen glukanase yang ditunjukkan pada Tabel 2 terlihat bahwa fragmen DNA rekombinan mempunyai tingkat homologi yang tinggi dengan *Burkholderia mallei* dan *Burkholderia pseudomallei* pada *database* yaitu sekitar 99%.

Selain melakukan analisis BlastN, juga dilakukan analisis BlastX untuk menentukan homologi di tingkat proteinnya. Hasil yang diperoleh pada analisis BlastX (Tabel 2) menunjukkan kemiripan dengan data hasil analisis BlastN. Hasil BlastX juga menunjukkan fragmen DNA rekombinan mempunyai tingkat homologi yang tinggi dengan gen endo-1,4-D-glukanase pada *B. mallei* dan *B. pseudomallei*. Secara teoritis hasil analisis Blast dengan nilai $E\text{-value} \geq e^{-04}$ mengindikasikan tingkat kemiripan yang tinggi (Claverie & Notredame 2007).

Analisis dari hasil urutan asam amino yang terbentuk dilakukan menggunakan *Server ExPasy Proteomic* yang ada pada web <http://web.expasy.org/protparam/>. Parameter yang terdapat pada server ini adalah jumlah asam amino, bobot molekul dan titik isoelektrik (pI). Gen hasil rekombinan *glukanase* memiliki jumlah asam amino 451. Untuk bobot molekul

48.363 kDA dan memiliki titik isoelektrik (pI) sekitar 5.87.

Perbedaan urutan asam amino dapat diketahui dengan melakukan penjajaran menggunakan *software ClustalW* (<http://www.genome.jp>) secara *on-line* (Larkin *et al.* 2007). Data hasil penjajaran urutan gen glukanase pada klon rekombinan dengan gen endo-1,4-D-glukanase pada *B. mallei* dan *B. pseudomallei* menunjukkan bahwa pada urutan tertentu terdapat persamaan dan perbedaan. Persamaan kode asam amino antara gen klon rekombinan dengan gen endo-1,4-D-glukanase pada *B. mallei* (No. Accession WP011204605.1, WP011857778.1, WP011832151.1) terdapat pada asam amino Metionin (M) sekuen ke-227 dan Valin (V) sekuen ke-302, selain itu Fenilalanin (F) pada sekuen ke-268 sama dengan sekuen pada *B. mallei* (No. Accession WP011857778.1 dan WP011832151.1). Sedangkan perbedaan asam amino terletak pada asam amino Asam Aspartat (D) sekuen ke-32, Leusin (L) sekuen ke-44, Serin (S) sekuen ke-142, Metionin (M) sekuen ke-205, dan Threonin (T) sekuen ke-306.

Hasil peptida sinyal (Gambar 4) dari gen klon rekombinan menunjukkan nilai sisi pemotongan berada pada posisi 23 dan 24 yang terletak pada asam amino AAA-AE. Hal tersebut berarti enzim rekombinan ini merupakan *mature protein* pada posisi 24. Hasil peptida sinyal diperoleh dengan menggunakan *server SignalIP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk>) secara *on-line* (Petersen *et al.* 2011). Protein dari klon rekombinan diperoleh dari basis data Protein Data Bank (PDB) dengan kode 4q2b.2.A pada model homologi struktur protein menggunakan mode SWISS-MODEL (Arnold *et al.* 2006). Protein ini terdiri atas 349 residu

yang membentuk struktur sekunder berupa 7 pasang *beta-hairpin*, 20 *turn*, 3 *helix*-3/10, dan 17 *alpha-helix* (Gambar 5). Struktur ini terbentuk oleh adanya ikatan hidrogen antara atom oksigen pada gugus karbonil dengan atom hidrogen pada gugus amida. Struktur sekunder dapat membentuk struktur tersier pada protein globular dengan adanya proses pelipatan protein secara keseluruhan.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Laboratorium Biokimia, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian yang telah memfasilitasi penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 22:195-201.
- Budiani A, Susanti I, Mawardi S, Santoso DA, Siswanto. 2004. Ekspresi β -1,3 glukanase dan kitinase pada tanaman kopi arabika (*Coffea arabica* L.) tahan dan rentan karat daun. *Menara Perkebunan* 72(2):57-71.
- Brown TA. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction 6thEd.* Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-8173-0.
- Claverie JM, Notredame C. 2007. *Bioinformatics for Dummies 2ndEd.* New York: Wiley Publishing, Inc.
- Fathin MF. 2012. Pemurnian enzim β -1,3-1,4 glukanase dari Bakteri *Burkholderia cepacia* Endofitik Padi [Skripsi]. Bogor: Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Innis MA, Gelfand DH. 1990. *Optimization of PCRs in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* San Diego: Academic Press.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23:2947-2948.
- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 8:785-786.
- Prince I, Prabakaran P. 2011. Antifungal activity of medicinal plants against plant pathogenic fungus *Colletotrichum falcatum*. *Asian Journal of Plant Science and Research* 1:84-87.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rdEd.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shaikh ZJ. 2005. Cloning and characterization of endoglucanase genes from *Trichoderma spp.* [tesis]. Dharwad: Department of Biotechnology, University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Shetty NP, Jens DJ, Anne K, Christine F, Naomi G, Andreas B, David BC, Hans JLJ. 2009. Effect of β -1,3-glucan from *Setoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60:4287-4300.
- Yuwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction.* Yogyakarta: Penerbit Andi.