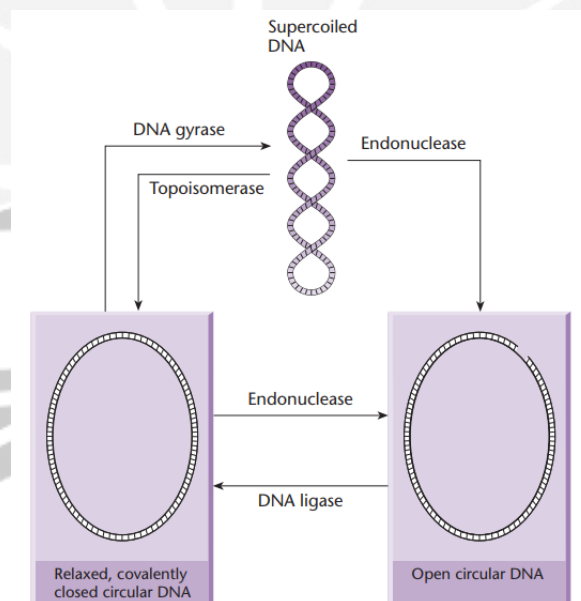


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Pengertian, Fungsi, dan Manfaat Plasmid

Plasmid pertama kali diperkenalkan oleh Joshua Lederberg pada tahun 1952. Plasmid merupakan molekul DNA ekstrakromosomal yang memiliki ukuran bervariasi dari kurang dari 1 kb hingga lebih dari 200 kb. Plasmid umumnya berantai ganda, molekul sirkuler, dan tertutup secara kuat dengan ikatan kovalen. Plasmid dapat diisolasi dari sel bakteri dalam bentuk superheliks (Sambrook dan Russel, 2001). Struktur plasmid dapat dilihat pada Gambar 1. (Primrose dkk., 2001).



Gambar 1. Struktur plasmid (Sumber : Primrose dkk., 2001)
Keterangan : Bentuk plasmid dapat berupa DNA *supercoil* (tengah atas), DNA sirkuler tertutup (kiri bawah), dan DNA sirkuler terbuka (kanan bawah)

Plasmid dapat juga ditemukan pada eukariota, seperti khamir. Plasmid hanya mengandung sedikit gen dan biasanya digunakan oleh bakteri dalam keadaan tertentu, (Reece dkk., 2011). Gen yang terkandung dalam plasmid

biasanya memberikan keuntungan bagi sel bakteri, seperti resistensi terhadap antibiotik, produksi toksin, dan produksi enzim restriksi (Sambrook dan Russel, 2001). Sifat resistensi antibiotik yang dibawa oleh plasmid dapat dimanfaatkan dalam proses kloning gen sebagai penanda seleksi hasil transformasi (Casali dan Preston, 2003). Salah satu contoh plasmid yang memiliki resistensi antibiotik dapat dilihat pada Gambar 2 (Brown, 2010).



Gambar 2. Plasmid dengan resistensi antibiotik (Sumber : Brown, 2010)
Keterangan : Plasmid RP4 memiliki sifat resistensi antibiotik ampisilin, kanamisin, dan tetrasiklin

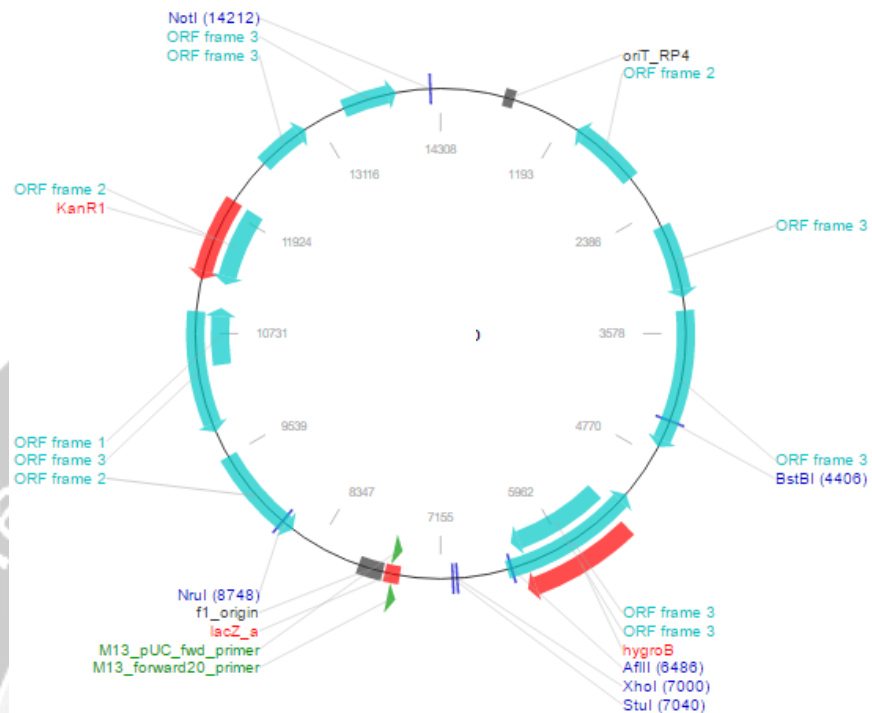
Plasmid digunakan oleh para peneliti untuk menyisipkan DNA dari sumber lain ke dalam plasmid membentuk molekul DNA rekombinan. Sel bakteri yang telah tertransformasi dengan plasmid rekombinan akan menjadi bakteri rekombinan. Sel tunggal bakteri akan bereproduksi melalui pembelahan sel berulang-ulang untuk membentuk klon sel (populasi sel yang identik secara genetis) dan plasmid akan diwariskan kepada generasi berikutnya, sehingga DNA asing dan gen-gen yang dibawanya akan turut dikloning. Produksi banyak salinan dari satu gen tunggal disebut kloning gen (Reece dkk., 2011).

B. Plasmid pTA7002 dan gen *AtRKD4*

1. Plasmid pTA7002

Plasmid pTA7002 merupakan plasmid hasil rekayasa plasmid alami yang terdapat pada *Agrobacterium tumefaciens*, sehingga sering dimanfaatkan untuk modifikasi tanaman tertentu menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Kang dkk.,1999). Plasmid pTA7002 memiliki tiga unit transkripsi. Unit transkripsi pertama (35S-GVG-E9) memiliki promotor 35S, domain pengikat *GAL4 DNA*, domain transaktivasi *VP16*, domain regulator reseptor glukokortikoid, dan sekuens subunit ribulosa bifosfat karboksilase *rbcS-E9* poli(A) tambahan. Unit transkripsi kedua (NOS-HPT-NOS) memiliki gen promotor nofaline sintase (*NOS*), sekuens higromisin fosfotransferase (*HPT*), dan terminator *NOS*. Sementara itu, unit transkripsi ketiga mengandung 6 kopi sekuens aktivasi *GAL4* yang terletak di arah hulu dari promotor 35 S, region TATA, dan sisi restriksi *XhoI-SpeI*, serta subunit kecil ribulosa bifosfat karboksilase *rbcS-3A* (Zuo dkk., 1999).

Plasmid pTA7002 merupakan salah satu jenis plasmid yang mempunyai promotor yang diinduksi oleh deksametason. Selain itu, plasmid ini juga memiliki gen *HPT* yang menandakan sifat resistensi terhadap antibiotik higromisin (Aoyama dan Chua, 1997). Selain itu, plasmid ini juga memiliki sekuens *KanR1* yang menandakan sifat resistensi terhadap antibiotik kanamisin. Struktur plasmid pTA7002 dengan panjang 14000 bp dapat dilihat pada Gambar 3 (Addgene, 2016).



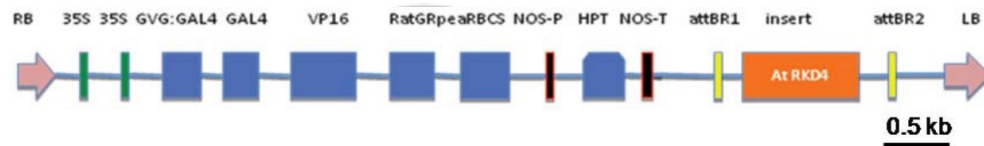
Gambar 3. Struktur plasmid pTA7002 (Sumber : Addgene, 2016)

Keterangan : ORF Frame 1, 2, 3 = daerah *open reading frame*; M13_pUC_fwd_primer = primer *forward* untuk M13 pUC; M13_forward20_primer = primer *forward* untuk M13; KanR1 = gen resistensi kanamisin; hygroB = gen resistensi higromisin; lacZ_a = fragmen gen ekspresi lacZ-alfa; AfIII, XhoI, StuI, NruI, BstBI, dan NotI = enzim restriksi endonuklease

2. Gen *AtRKD4*

Gen *AtRKD4* atau gen *RKD4* merupakan gen yang merangsang proses embriogenesis pada tanaman. Gen *AtRKD4* akan merangsang germinasi pada biji. Selain itu, mutasi pada gen *AtRKD4* akan menyebabkan germinasi tidak dapat membentuk akar dan bentuk kotiledon yang tidak normal (Nakajima dkk., 2010). Ekspresi gen *AtRKD4* secara berlebihan akan menyebabkan sel somatik mampu melakukan proses embriogenesis (Waki dkk., 2011). Gen *AtRKD4* yang telah diinsersi ke dalam plasmid

pTA7002 disusun dalam T-DNA dengan konstruksi 35S::GAL4::*AtRKD4*::GR. Struktur ini dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur T-DNA yang membawa 35S::GAL4::*AtRKD4*::GR (Sumber : Mursyanti dkk., 2015)

Keterangan : RB = *right border*; 35S = promoter 35 S dari *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV); GVG = gen pengaktif transkripsi; GAL4 = domain pengikatan DNA; VP16 = domain pengaktif DNA; RatGRpe = Gen mitokondria tikus; aRBCs = *Rubisco Small Subunit*; NOS-P = gen promoter nofalin-sintase; HPT = gen higromisin fosfotransferase; NOS-T = gen terminator nofalin-sintase; attBR1 = gen penempelan BR1; insert = gen rekombinan berupa *AtRKD4*; attBR2 = gen penempelan BR2; LB = *left border*

C. Kloning Gen

Kloning gen adalah teknik untuk memperbanyak gen. Teknik ini dilakukan dengan insersi fragmen DNA rekombinan melalui suatu pembawa gen berupa plasmid, bakteriofage, dan kosmid (Sudjadi, 2008). Setelah itu, pembawa gen diinsersi ke dalam sel inang, kemudian DNA rekombinan diperbanyak melalui propagasi atau pembelahan organisme inang (Brown, 2010).

Kloning gen juga merupakan tahapan pertama yang selalu dilakukan dalam penelitian molekuler yang bertujuan untuk mempelajari karakteristik suatu gen (An dkk., 2007). Kloning gen umumnya dilakukan dengan plasmid. Plasmid memiliki sisi restriksi yang dapat digunakan untuk kloning gen. Keberhasilan kloning gen dipengaruhi oleh kecocokan plasmid dengan gen

rekombinan dan kecocokan sel inang dengan plasmid rekombinan (Souii dkk., 2013).

D. Transformasi Plasmid ke Sel Inang dan Efisiensi Transformasi

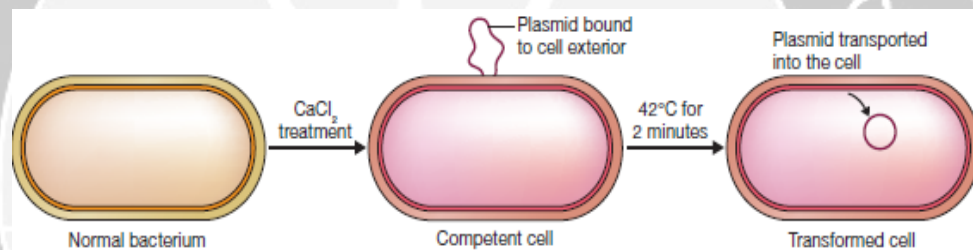
1. Transformasi plasmid

Transformasi merupakan salah satu kemampuan bakteri untuk mengambil DNA asing ke dalam sel. Kemampuan ini dimanfaatkan oleh peneliti untuk memperbanyak suatu gen. Gen yang telah diinsersikan ke dalam plasmid dimasukkan ke dalam bakteri dengan metode transformasi (Brown, 2010).

Transformasi yang terjadi pada DNA rekombinan dalam plasmid ini tidak terjadi secara alami, melainkan harus diinduksi oleh zat-zat tertentu. Sel bakteri yang telah mengalami suatu perlakuan fisik sehingga dapat memperoleh kemampuan untuk mengambil DNA asing adalah sel kompeten (Brown, 2010). Selain itu, sel kompeten ini juga dapat mengambil DNA plasmid sirkuler. Sel biasa hanya dapat melakukan transformasi DNA linier (Sword, 2003).

Salah satu metode sederhana untuk membuat sel menjadi kompeten (siap untuk ditransformasi) dengan cara merendam sel bakteri ke dalam larutan garam dalam kondisi dingin, contohnya kalsium klorida (CaCl_2). Larutan garam ini dapat mengikat DNA dan komponen lipopolisakarida dari dinding sel bakteri yang bermuatan negatif, sehingga DNA terikat dengan dinding sel bakteri. Selain itu, larutan lain yang dapat digunakan untuk pembuatan sel kompeten adalah polietilene glikol (Sword, 2003).

Transformasi dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu *heatshock* atau kejutan panas, elektroporasi (Casali dan Preston, 2003), dan *coldshock* atau kejutan dingin (Ng, 2009). Metode kejutan panas merupakan metode transformasi yang paling mudah dilakukan dibandingkan metode lainnya. Metode ini menggunakan prinsip kejutan suhu, yaitu 42°C, selama 90 detik (Hanahan dkk., 1983) atau 120 detik sehingga dinding sel bakteri terbuka dan plasmid dapat masuk dalam sel (Sambrook dan Russel, 2001). Proses transformasi kejutan panas yang terjadi pada sel bakteri dapat dilihat pada Gambar 5. (Brown, 2010).



Gambar 5. Transformasi kejutan panas (Sumber : Brown, 2010)

Keterangan : Bakteri normal diberi perlakuan CaCl_2 akan menjadi sel kompeten. Ketika diberi kejutan panas, plasmid yang menempel pada dinding sel bakteri akan masuk ke dalam sel.

Transformasi kejutan panas memerlukan persiapan sel yang siap ditransformasi atau sel kompeten. Sel kompeten dibuat dalam kondisi dingin 4°C, sehingga terjadi kejutan suhu pada sel kompeten ketika ditempatkan pada suhu 42°C. Sel kompeten dibuat dengan cara merendam sel dalam larutan garam klorida, seperti CaCl_2 , MnCl_2 , dan MgCl_2 , untuk meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga plasmid dapat masuk ke dalam sel (Brown, 2010).

Sel kompeten yang diberikan kejutan panas 42°C tetap hidup karena mengekspresikan protein kejutan panas, yaitu *heat-shock proteins* (HSPs). Protein ini akan diekspresikan oleh sel apabila sel dalam kondisi stress suhu (Arsene dkk., 2000). Secara umum, protein kejutan panas dapat dikelompokkan menjadi tujuh kelompok berdasarkan fungsinya, yaitu *chaperon* molekuler (protein pelipat), organisasi sel, transport dan detoksifikasi, degradasi protein, metabolisme dan regulasi sel (Ritcher dkk., 2010).

Eksresi respon kejutan panas *Escherichia coli* diatur oleh faktor sigma-32 yang dikode oleh gen *rpoH*. Faktor ini akan berikatan dengan promotor kejutan panas pada lokasi *upstream* dari gen kejutan panas. Ketika kejutan panas terjadi, ekspresi faktor sigma-32 akan meningkat sehingga ekspresi gen ini juga semakin banyak (Strauss dkk., 1987). Gen *rpoH* dalam kondisi normal diekspresikan oleh satu promotor, sedangkan dalam kondisi stress suhu, gen ini akan diaktifkan oleh tiga promotor. Akibatnya, ekspresi gen *rpoH* pun akan meningkat dari 50 molekul menjadi 30000 molekul (Yoo, 2010).

Protein kejutan panas bersifat sebagai *chaperone*, sehingga dapat melipat protein-protein lain dalam sel, sehingga protein sel tidak rusak ketika terkena paparan panas (Arsene dkk., 2000). Sel *Escherichia coli* memiliki sistem *chaperon* yang berperan penting dalam kelangsungan hidup sel, yaitu hsPs70 (Singh dan Gupta, 2009). Protein ini diekspresikan pada seluruh bagian sel, termasuk sitoplasmik, periplasmik dan membran sel.

Ekspresi protein hsPs70 tertinggi pada membran sel dibandingkan bagian sitoplasmik dan periplasmik (Urban-Chmiel dkk., 2013). Kompleks protein hsPs ini dapat bekerja optimum pada suhu 40-45°C. Apabila suhu melebihi 45°C, kompleks protein ini mulai terdenaturasi (Thomas dan Baneyx, 1998).

2. Efisiensi transformasi

Efisiensi transformasi adalah perbandingan jumlah plasmid yang digunakan terhadap jumlah transforman yang digunakan. Efisiensi transformasi dinyatakan dalam satuan koloni/ μg plasmid (CFU/ μg) (Lim dkk., 2015). Efisiensi transformasi setiap mikroorganisme berbeda-beda. Hal ini karena efisiensi transformasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu waktu inkubasi dingin setelah kejutan panas, konsentrasi plasmid (Liu dkk., 2014), waktu kejutan panas, suhu kejutan panas, dan ukuran plasmid (Inoue dkk., 1990).

Waktu kejutan panas dapat mempengaruhi efisiensi transformasi (Inoue dkk., 1990). Kejutan panas akan membuka dinding sel bakteri, sehingga plasmid akan masuk ke dalam sel. Apabila waktu pembukaan dinding sel terlalu pendek, plasmid tidak dapat masuk seluruhnya ke dalam sel bakteri, sehingga efisiensi transformasi akan kecil. Sementara itu, apabila waktu pembukaan dinding sel terlalu lama, struktur dinding sel bakteri akan rusak, sehingga bakteri akan mati (Brown, 2010). Waktu kejutan panas berkisar antara 30 hingga 240 detik (Froger dan Hall, 2007; Hanahan, 1983; Inoue dkk., 1990; dan Yoo, 2010).

Suhu kejutan panas yang digunakan dalam proses transformasi berfungsi sebagai pengejut, sehingga dinding sel akan terdenaturasi dalam kurun waktu tertentu. Hal ini akan membuat plasmid dapat masuk ke dalam sel bakteri. Suhu kejutan panas biasanya diberikan pada rentang suhu optimum hingga suhu maksimum pertumbuhan bakteri, sehingga bakteri tidak akan mati akibat suhu yang terlalu tinggi (Brown, 2010). Suhu kejutan panas untuk proses transformasi berkisar antara 42° hingga 52°C (Bergès dan Barreau, 1989; Sambrook dan Russel, 2001).

Ukuran plasmid yang digunakan dalam proses transformasi akan mempengaruhi efisiensi transformasi. Semakin besar ukuran plasmid, semakin kecil nilai efisiensi transformasi (Inoue dkk. 1990). Sementara itu, semakin tinggi konsentrasi plasmid yang diinduksi ke dalam sel inang, semakin tinggi efisiensi transformasi plasmid tersebut (Liu dkk., 1990). Konsentrasi plasmid dapat diketahui dengan cara mengukur nilai absorbansi plasmid pada panjang gelombang 260 dan 280 nm berdasarkan jumlah pasang basa yang terdapat pada plasmid (Yoo, 2010).

Bentuk DNA plasmid yang digunakan dalam proses transformasi juga dapat mempengaruhi efisiensi transformasi. Bentuk plasmid yang paling baik untuk transformasi adalah bentuk *supercoil* karena bentuk ini stabil dan tidak rusak oleh kontaminan ataupun enzim. Bentuk *nicked* menunjukkan plasmid sirkuler telah terpotong oleh enzim polimerase. Bentuk *linear* menunjukkan plasmid yang telah terpotong oleh enzim restriksi. Sementara itu, bentuk sirkuler menunjukkan plasmid telah

terdenaturasi ketika proses isolasi alkali berlangsung membentuk plasmid - berpita satu (Sinden, 2012).

Faktor lain yang mempengaruhi efisiensi transformasi adalah larutan garam yang digunakan dalam pembuatan sel kompeten. Larutan garam yang dapat digunakan adalah larutan CaCl_2 , BaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , dan SrCl_2 . Larutan garam ini akan meningkatkan kemampuan transformasi sel bakteri. Hasil penelitian oleh Liu dkk. (2014) menunjukkan bahwa beberapa jenis *Escherichia coli* memiliki efisiensi transformasi yang berbeda terhadap larutan garam yang berbeda. Sel kompeten *Escherichia coli* BL21(DE3), JM109, TG1, dan HB101 memiliki efisiensi transformasi yang paling optimal ketika direndam dalam larutan CaCl_2 (Liu dkk., 2014).

E. *Escherichia coli* Strain BL21(DE3) Sebagai Sel Inang untuk Proses Transformasi

Escherichia coli merupakan salah satu jenis bakteri yang cukup sering digunakan dalam proses transformasi. Hal ini dikarenakan *Escherichia coli* dapat bereplikasi sangat cepat, yaitu setiap 20-30 menit sekali. Selain itu, *Escherichia coli* juga dapat tumbuh pada medium sederhana ataupun medium khusus, sehingga mudah dikulturkan (Casali dan Preston, 2003).

Escherichia coli dapat diinokulasikan pada medium Luria-Bertani (LB). Medium ini sangat cocok sebagai medium pertumbuhan berbagai jenis mikrobial karena mikrobial dapat tumbuh dengan cepat dan baik. Medium ini memiliki pH 7 dan tersusun atas tripton, ekstrak khamir, NaCl, dan aquabides.

Sumber karbon utama dari medium adalah asam amino terkarboksilasi (Sezonov dkk., 2007).

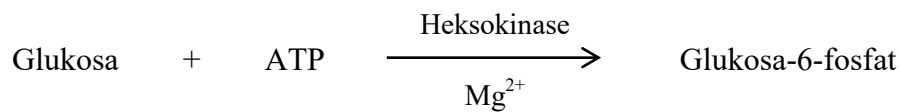
Escherichia coli yang tumbuh pada medium memiliki fase log dan fase lag. Kedua fase ini disebut juga sebagai *steady state*, yaitu keadaan sel mendapatkan sumber nutrisinya paling baik, sehingga dapat tumbuh dengan optimal. Kondisi *steady* ini didapatkan setelah *E. coli* berada dalam OD₆₀₀ 0,3 hingga OD₆₀₀ 7. Nilai OD₆₀₀ ini berlawanan dengan laju pertumbuhan *E. coli*. Laju pertumbuhan *E. coli* akan semakin menurun seiring bertambahnya nilai OD₆₀₀. Nilai OD₆₀₀ yang paling baik untuk transformasi plasmid ke dalam *E. coli* adalah 0,4 (Sezonov dkk., 2007). Nilai OD₆₀₀ 0,4 dapat dicapai dalam waktu inkubasi 3 jam (Sekse dkk., 2012) hingga 4 jam (Casali dan Preston, 2013).

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek (Tang dkk., 2015). Bakteri Gram negatif memiliki kandungan peptidoglikan yang lebih sedikit pada dinding selnya dibandingkan bakteri Gram positif. Warna bakteri Gram positif dan Gram negatif tetap sama ketika diberi cat Gram A (*Hucker's Violet*) dan cat Gram B (*Lugol's Iodine*), yaitu ungu kebiruan. Sementara itu, ketika diberi cat Gram C (*Acetone Alcohol*) bakteri Gram negatif tidak dapat mengikat zat pewarna karena dinding peptidoglikan yang tipis, sehingga warna ungu kebiruan akan luntur. Akibatnya, ketika diwarnai dengan cat Gram D (*Safranin*), bakteri Gram negatif akan terwarnai merah (Tortora dkk., 2007).

Escherichia coli dapat hidup pada suhu 4 - 55°C dengan suhu optimum 37°C. Bakteri ini bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium agar berbentuk bulat, berwarna putih keabu-abuan dan permukaannya rata (Tang dkk., 2015). *E. coli* strain B, seperti BL21 dan BL21(DE3) bersifat non-motil karena tidak memiliki gen biosintesis flagella dan mengekspresikan gen *motility-related* dalam jumlah rendah (Yoon dkk., 2009).

Escherichia coli dapat memfermentasi glukosa, fruktosa, galaktosa, laktosa, maltosa, arabinosa, xilosa, rhamnosa, dan mannitol dengan menghasilkan asam dan gas. Sementara itu, fermentasi sukrosa terjadi dengan menghasilkan asam saja (Tang dkk., 2015). Uji fermentasi karbohidrat dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri di dalam cairan medium berisi karbohidrat (glukosa, sukrosa, atau laktosa) yang telah diberi indikator *phenol red* dan tabung Durham. Apabila terjadi fermentasi, medium yang awalnya berwarna merah akan berubah menjadi kuning dan terbentuknya gas di dalam tabung Durham (Madigan dkk., 2013).

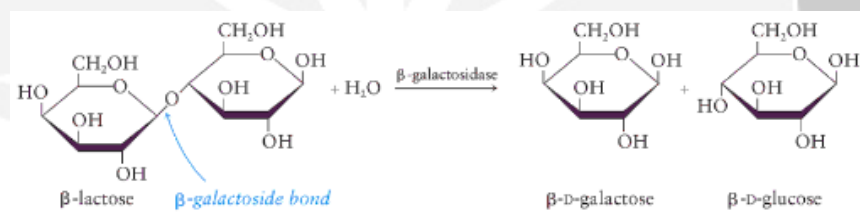
Kemampuan *Escherichia coli* dalam memfermentasi glukosa dikarenakan adanya enzim heksokinase. Enzim ini akan menambahkan satu gugus fosfat ke glukosa menjadi glukosa-6-fosfat dan menghidrolisis ATP menjadi ADP (Gambar 6). Glukosa-6-fosfat akan digunakan dalam proses glikolisis (Pakoskey dkk., 1965).



Gambar 6. Reaksi pemecahan glukosa oleh heksokinase (Sumber : Pakoskey dkk., 1965)

Keterangan : Heksokinase akan merubah glukosa menjadi glukosa-6-fosfat

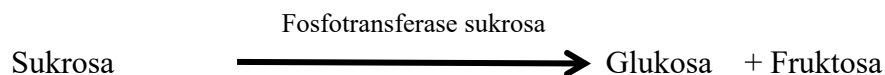
Escherichia coli dapat memfermentasi laktosa karena memiliki enzim β -galaktosidase yang diinduksi oleh keberadaan laktosa. Laktosa dalam medium dapat merangsang aktifnya operon *lac* dan mengekspresikan enzim tersebut. Enzim β -galaktosidase dapat memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa (Gambar 7). Apabila kadar laktosa dalam medium semakin sedikit, kadar enzim β -galaktosidase juga akan semakin berkurang (Seager dan Slabaugh, 2010).



Gambar 7. Reaksi pemecahan laktosa oleh β -galaktosidase (Sumber : Seager dan Slabaugh, 2010)

Keterangan : β -galaktosidase akan memotong β -ikatan glikosidik untuk memecah laktosa menjadi β -galaktosa dan β -glukosa

Bakteri *Escherichia coli* dapat melakukan metabolisme sukrosa. *Escherichia coli* strain W dapat memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dengan adanya enzim fosfotransferase sukrosa (Gambar 8). Namun, tidak semua strain *E. coli* dapat melakukan metabolisme sukrosa, contohnya *E. coli* BL21(DE3) (O'Hara dan Mundree, 2016).



Gambar 8. Reaksi pemecahan sukrosa oleh enzim fosfotransferase sukrosa (Sumber : O'Hara dan Mundree, 2016).

Keterangan : Sukrosa dipecah menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim fosfotransferase sukrosa

Escherichia coli tidak dapat menghidrolisis dekstrin, pati, glikogen, dan inositol (Tang dkk., 2015) karena bakteri ini tidak memiliki enzim amilase (Mijts dan Patel, 2002). Uji hidrolisis pati umumnya dilakukan dengan menumbuhkan bakteri ke dalam medium pati padat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, medium pati berisi bakteri ditetesi dengan iod. Apabila iod berwarna biru pekat, pati dalam medium sama sekali tidak terhidrolisis menjadi dekstrin, maltosa ataupun, glukosa (Madigan dkk., 2013).

Pati dapat terhidrolisis apabila bakteri memiliki enzim α -amilase. Enzim ini dapat memecah pati menjadi oligosakarida dan dekstrin dengan cara memutuskan ikatan α -1,4-glikosidik pada rantai interior pati (Gambar 9) . Enzim ini bekerja optimum pada suhu 75°-90°C dan pH 6-9 (Aehle, 2007).

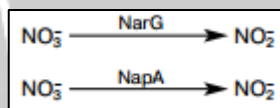


Gambar 9. Reaksi hidrolisis pati (Sumber : Aehle, 2007)

Keterangan : Enzim amilase akan memecah pati menjadi oligosakarida dan dekstriin

Escherichia coli dapat mereduksi nitrat (Tang dkk., 2015). Uji reduksi nitrat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam medium nitrat cair. Setelah inkubasi, medium berisi bakteri ditambahkan dengan reagen sulfanilamida dan α -naphyletilenediamine. Apabila bakteri dapat mereduksi

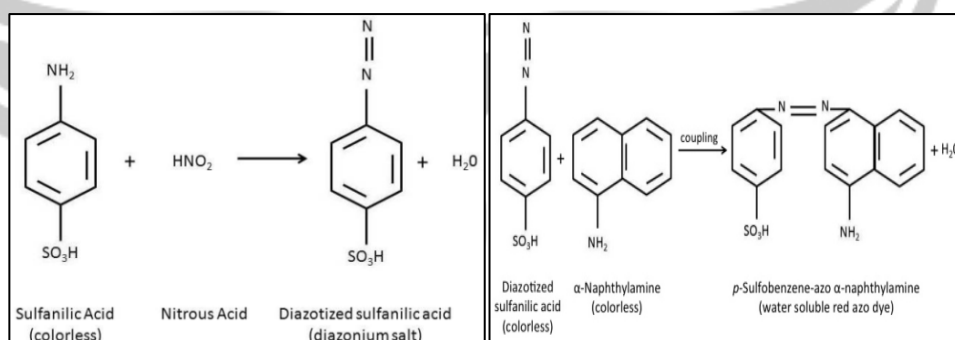
nitrat, medium akan berubah menjadi warna merah gelap (Madigan dkk., 2013). Nitrat akan direduksi menjadi nitrit oleh enzim nitrat reduktase yang terdapat di bagian membrane sel dan periplasmik bakteri (Morozkina dan Zvyagilskaya, 2007) (Gambar 10).



Gambar 10. Reaksi reduksi nitrat oleh nitrat reduktase (Sumber : Morozkina dan Zvyagilskaya, 2007)

Keterangan : NarG adalah nitrat reduktase di membran sel; NapA adalah nitrat reduktase di bagian periplasmik

Nitrit yang telah direduksi oleh nitrat reduktase diuji keberadaannya dalam medium menggunakan reagen sulfanilamide (SA). SA akan berikatan dengan nitrit membentuk garam diazonium. Setelah itu, garam diazonium ditambahkan dengan α -naphthylenediamine (NED) membentuk senyawa azo yang berwarna merah (MacFaddin, 2000). Reaksi pengikatan SA dan NED dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Reaksi pengikatan SA dan NED dalam uji reduksi nitrat (Sumber : MacFaddin, 2000)

Keterangan : SA akan berikatan dengan nitrit membentuk garam diazonium, kemudian garam ini berikatan dengan NED membentuk senyawa azo

Escherichia coli dapat bereaksi positif terhadap katalase, tetapi negatif terhadap oksidase, sitrat, urease, dan hidrogen sulfat (Tang dkk., 2015). Katalase adalah enzim yang dapat memecah peroksida (H_2O_2) yang dimiliki oleh bakteri aerobik. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan peroksida ke atas goresan bakteri. Apabila bakteri memiliki enzim katalase akan terbentuk gelembung udara (Madigan dkk., 2013). Katalase akan memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen bebas. Reaksi pemecahan H_2O_2 dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Reaksi pemecahan H_2O_2 oleh katalase (Sumber : Marks dkk., 1996)
Keterangan : Katalase akan memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen bebas

Salah satu jenis *Escherichia coli* yang digunakan dalam transformasi adalah *Escherichia coli* BL21(DE3). Bakteri ini digunakan sebagai sel inang berbagai jenis plasmid, contohnya pRSETB (Saraniya dkk., 2012), pET-32b(+)-IFN α 2a (Kusumawati dkk., 2013), dan pGEM-T (Retnoningrum, dkk., 2010). *Escherichia coli* BL21(DE3) memiliki kemampuan transformasi yang cukup baik pada OD_{600} 0,4. Efisiensi transformasi oleh sel kompeten *E. coli* BL21(DE3) akan semakin baik dengan adanya penambahan larutan garam $CaCl_2$ sebanyak 1,5% ($^{b}/_{v}$). Efisiensi transformasi bakteri ini sebesar $1,9 \times 10^5$ CFU/ng/mL untuk 15 ng pBR322 dan 2×10^5 CFU/ μ g untuk 1 μ g pUC19 (Liu dkk., 2014).

Escherichia coli BL21(DE3) memiliki mutasi pada gen *gal*, *hsdS_B*, dan *ompT*. Bakteri ini dapat digunakan untuk meningkatkan ekspresi protein

rekombinan (Casali dan Preston, 2003). Jenis mutasi yang terdapat pada *Escherichia coli* BL21(DE3) dapat dilihat pada Tabel 1. Bakteri ini dapat dideteksi menggunakan fragmen gen 22,4 yang spesifik untuk *E. coli* strain B dan turunannya (Bauer dkk., 2007).

Tabel 1. Mutasi yang terdapat pada *Escherichia coli* BL21(DE3)

Mutasi Gen	Deskripsi	Keterangan
<i>Gal</i>	Mutasi pada galaktosa oksidase	Menghambat pembentukan galaktosa
<i>hsdS</i>	Inaktivasi aktivitas pengenalan sisi <i>Eco</i>	Menghambat restriksi <i>Eco</i> dan metilasi ($r^- m^-$)
<i>ompT</i>	Mutasi pada protease di membran luar	Meningkatkan ekspresi beberapa protein rekombinan

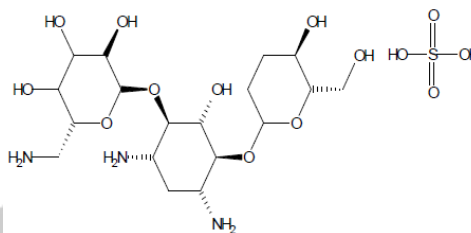
Sumber : Casali dan Preston (2003)

Escherichia coli BL21(DE3) juga mengandung RNA Polimerase (RNAP) bakteriofage T7. RNAP ini diekspresikan oleh promotor IPTG-inducible *lac* UV5. Promoter tersedia di dalam sel oleh lisogen λ (DE3) (Casali dan Preston, 2003).

F. Kanamisin

Kanamisin atau kanamisin monosulfat merupakan kelompok antibiotik amino glikosida berspektrum luas. Kanamisin dihasilkan oleh *Streptomyces kanamycetes* (Tong dan Kim, 2004). Struktur kanamisin monosulfat dapat dilihat pada Gambar 13.

Kanamisin mudah larut dalam etanol dan air. Kanamisin A memiliki spektrum ultraviolet maksimum pada 274-280 m μ . Kanamisin akan terlihat bening pada larutan cair (Korzybski dkk., 1967).



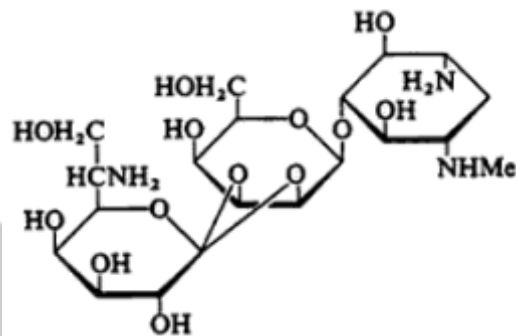
Gambar 13. Struktur kimia kanamisin monosulfat (Sumber : Patel dkk., 2014)

Kanamisin dapat digunakan sebagai salah satu senyawa seleksi dalam pertumbuhan mikroorganisme. Antibiotik ini dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun negatif, seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Bacillus subtilis*. Konsentrasi hambat minimum kanamisin untuk *Escherichia coli* sebesar 25 ppm (Korzybski dkk., 1967).

Kanamisin dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengikat rRNA 16s sehingga menyebabkan kesalahan pembacaan ekspresi kodon ketika translasi. Selain itu, kanamisin juga dapat menghambat sintesis DNA pada bakteri dan menghancurkan struktur membran sel (Faraji dkk., 2006).

G. Higromisin

Higromisin atau higromisin B adalah salah antibiotik yang termasuk ke dalam asam lemah. Higromisin memiliki rumus molekul $C_{25}H_{33}O_{13}N_3$. Molekul higromisin dapat dilihat pada Gambar 14. Higromisin diproduksi oleh *Streptomyces hygroscopicus* (Bycroft, 1988).



Gambar 14. Struktur kimia higromisin (Sumber : Bycroft, 1988)

Higromisin mudah larut dalam etanol dan air, dan hampir tidak larut dalam pelarut yang kurang polar. Higromisin memiliki spektrum ultraviolet maksimum pada $272\text{ m}\mu$ dan $214\text{ m}\mu$ serta minimum pada $248\text{ m}\mu$. Higromisin akan berwarna pada larutan cair (Korzybski dkk., 1967).

Higromisin dapat digunakan sebagai salah satu senyawa seleksi dalam pertumbuhan mikroorganisme. Antibiotik ini dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun negatif (Bycroft, 1988). Higromisin akan menghambat translokasi mRNA dan tRNA pada ribosom bakteri dengan cara mengikat subunit kecil ribosom (subunit 30S) (Borovinskaya dkk., 2008), sehingga menghambat pembentukan rantai peptida pada ribosom (Cabañas dkk., 1978). Akibatnya, ribosom mengalami kesalahan dalam pembacaan kodon (*miscoding*), sehingga elongasi peptida dalam sintesis protein juga terhambat (Corcoran dan Hahn, 1974).

H. Isolasi plasmid

Plasmid biasanya diisolasi secara langsung dari bakteri untuk mendapatkan isolat murni sebagai vektor kloning gen. Metode isolasi plasmid memiliki perbedaan dengan metode isolasi DNA genom. Hal ini dikarenakan

konfigurasi plasmid yang sirkuler sehingga plasmid lebih rentan terhadap tekanan mekanis (penggojogan dengan vorteks) setelah lisis sel. Seluruh tahapan isolasi plasmid harus dilakukan dengan metode inversi tabung selama beberapa kali. Selain itu, apabila sel yang lisis dan larutan sel masih lisis tersisa cukup banyak, hasil isolasi plasmid dapat berkurang (Das dan Dash, 2015).

Prinsip dasar isolasi plasmid adalah pemisahan komponen sel dan DNA genom dengan DNA plasmid berdasarkan berat molekulnya. DNA plasmid yang sirkuler memiliki berat molekul yang lebih rendah dibandingkan DNA genom yang linear dan komponen sel lainnya. Pengaturan pH berperan penting dalam tahapan isolasi plasmid karena hal ini membuat struktur plasmid yang sirkuler tertutup tetap terjaga dalam larutan, sedangkan komponen kontaminan lain diendapkan. Kontaminan dapat dihilangkan dengan cara melarutkan plasmid dalam etanol dan diendapkan dengan sentrifugasi. Plasmid dapat dipurifikasi lebih lanjut menggunakan filtrasi gel (Das dan Dash, 2015).

Isolasi DNA plasmid menggunakan tiga jenis buffer lisis. Buffer lisis I terdiri atas 50 glukosa, 25 mM Tris-Cl pH 8 dan 10 mM EDTA. Glukosa berfungsi untuk menjaga osmolaritas dan mencegah buffer untuk memecahkan sel bakteri. Tris-EDTA berfungsi untuk menjaga pH selama penambahan reagen lain. Selain itu, EDTA juga dapat mengkelat kation, seperti Mg^{2+} . Kation ini merupakan kofaktor dalam nuklease bakteri. Oleh karena itu, penambahan EDTA dapat menghambat kerja nuklease, sehingga dinding sel dan membran sel pecah (Das dan Dash, 2015).

Buffer lisis II terdiri atas 200 mM NaOH dan Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 1% ($\frac{b}{v}$). NaOH digunakan untuk memisahkan DNA genom dan DNA plasmid. Penambahan NaOH akan membuat medium menjadi basa, sehingga molekul dsDNA akan terdenaturasi dan basa komplemennya tidak akan saling berikatan lagi. Namun, DNA plasmid yang terdenaturasi tidak mengalami pemisahan basa komplemen karena strukturnya yang sirkuler, sehingga dapat kembali terdenaturasi ketika larutan basa dinetralkan. Penambahan SDS berfungsi untuk mengikat protein-protein sel (Das dan Dash, 2015).

Buffer lisis III terdiri atas 5 M potasium asetat dan asam asetat glasial. Potasium asetat berfungsi untuk mengendapkan DNA genom dan komponen selular bakteri. Selain itu, potasium asetat juga dapat mengikat SDS menjadi Potasium Dodesil Sulfat (KDS) sehingga kontaminan protein dapat lebih mudah dibuang. Sementara itu, asam asetat glasial dapat menetralkan medium sehingga DNA plasmid dapat terdenaturasi (Das dan Dash, 2015).

Secara umum, tahapan isolasi plasmid meliputi pemanenan sel dengan sentrifugasi, resuspensi sel dengan buffer TE dan buffer lisis I, lisis sel dengan buffer lisis II, netralisasi dengan buffer lisis III dan pemisahan DNA plasmid dengan DNA genom dan komponen sel menggunakan sentrifugasi. Berikutnya DNA plasmid dipisahkan dengan kontaminan protein dan dicuci dengan etanol 70% ($\frac{v}{v}$) dingin, kemudian DNA plasmid disimpan dalam larutan buffer TE (Das dan Dash, 2015).

Hasil isolasi plasmid dapat divisualisasi menggunakan elektroforesis gel dengan konsentrasi agarosa 0,8% ($\frac{b}{v}$). Hasil visualisasi akan terlihat

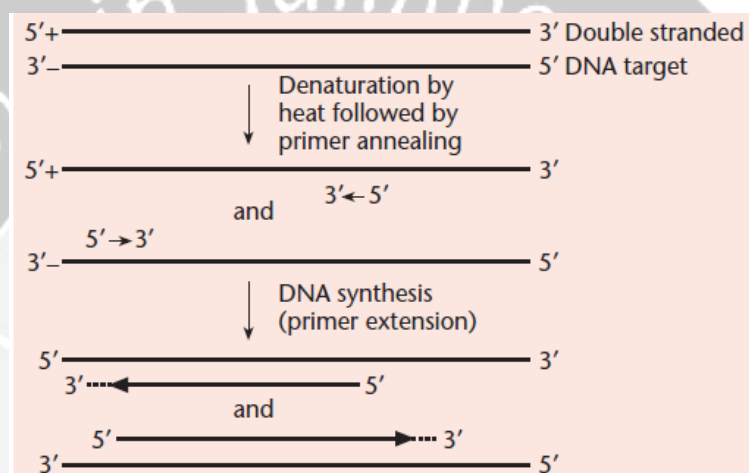
dengan urutan dari atas ke bawah sesuai dengan laju migrasinya, yaitu DNA plasmid, DNA genom, dimer, timer, dan selanjutnya. Setelah itu, plasmid hasil isolasi dapat diukur pada absorbansi 260 dan 280 nm untuk melihat kuantitas dan kualitasnya. DNA murni akan memiliki nilai $OD_{260/280}$ 1,8 dan RNA murni akan memiliki nilai $OD_{260/280}$ 2. Apabila hasil pengukuran $OD_{260/280} < 1,8$ terdapat kontaminan protein, sedangkan hasil pengukuran $OD_{260/280} > 1,8$ terdapat kontaminan RNA (Das dan Dash, 2015).

I. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase chain reaction (PCR) adalah metode perbanyak suatu sekuens DNA menggunakan enzim dan suhu. Reaksi dasar PCR (Gambar 15.) melibatkan dua primer oligonukleotida dengan panjang 17-30 basa. Primer ini akan melakukan hibridisasi dengan bagian komplementnya pada sekuens DNA yang telah terdenaturasi. Setelah itu, enzim DNA polimerase akan mensintesis rantai DNA baru antara daerah dalam dua primer tersebut. Reaksi *extension* akan menghasilkan dua DNA untai ganda baru yang dapat digunakan pada siklus berikutnya. Jumlah DNA pada siklus ke-28 akan mencapai 10^6 DNA untai ganda (Primrose dkk., 2001).

PCR memiliki empat komponen yang harus diperhatikan selama proses berlangsung, yaitu fragmen DNA yang akan diperbanyak (cetakan DNA), primer oligonukleotida, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP, serta enzim DNA polimerase. Komponen penting lainnya dalam reaksi PCR adalah larutan buffer. Larutan

buffer yang digunakan dalam proses PCR adalah Tris-HCl dengan konsentrasi 10-50 mM dan pH 8,3-8,8 pada suhu 20°C. Selain itu, larutan buffer juga ditambahkan dengan larutan 1,5 M MgCl₂, gelatin, *bovine serum albumin* (BSA) atau Tween 20 (deterjen non-ionik) sebanyak 0,05-0,1% (v/v) untuk menstabilkan enzim DNA Polimerase (Yuwono, 2006).



Gambar 15. Reaksi dasar PCR (Sumber : Primrose dkk., 2001)

Keterangan : DNA didenaturasi oleh panas. Berikutnya, primer menempel pada DNA, kemudian terjadi sintesis rantai DNA baru pada tahap *extension*

Enzim DNA Polimerase yang paling sering digunakan dalam proses PCR adalah enzim *Taq* polimerase. Enzim ini memiliki kelebihan utama, yaitu tahan terhadap suhu tinggi yang diperlukan untuk memisahkan rantai DNA cetakan. Suhu optimum enzim ini adalah 75-80°C. Aktivitas spesifik enzim ini adalah menggabungkan nukleotida dengan kecepatan 150 nukleotida/detik/molekul enzim. Enzim ini juga mampu menambahkan satu nukleotida, terutama dATP, pada ujung -3' fragmen DNA hasil polimerasi sehingga ujung fragmen DNA hasil polimerisasi PCR tidak memiliki *blunt end*.

Akibatnya, DNA hasil PCR dapat langsung disambungkan dengan plasmid tanpa bantuan enzim DNA ligase (Yuwono, 2006).

Enzim DNA Polimerase lain yang dapat digunakan dalam reaksi PCR adalah enzim *KOD* Polimerase. Enzim ini diisolasi dari archaea hipertermofil *Thermococcus kodakaraensis*. Enzim ini memiliki kemampuan amplifikasi sekuens DNA lebih baik dibandingkan dengan enzim *Taq* Polimerase karena laju mutasinya rendah, yaitu sekitar 0,35%. Selain itu, laju ekstensinya juga tinggi, yaitu sebesar 106-138 basa nukleotida/detik. Enzim ini juga dapat mengamplifikasi sekuens langsung dari sampel tanpa perlu diekstraksi, seperti darah, daun, beras, ekor tikus, koloni bakteri, koloni kapang dan koloni khamir (Imanaka, 2010).

J. PCR Koloni

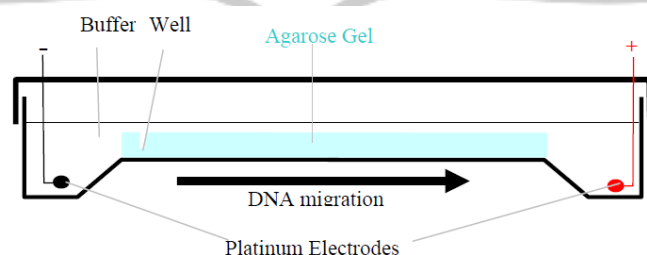
PCR koloni merupakan salah satu metode yang digunakan untuk melakukan deteksi sel atau koloni yang telah mengalami transformasi gen. Metode ini membutuhkan kultur bakteri yang telah ditumbuhkan selama semalam. Hal ini bertujuan untuk memperoleh sumber DNA yang cukup untuk analisis PCR (Casali dan Preston, 2003).

PCR koloni yang menggunakan vektor bakteri *Escherichia coli* harus melakukan tahapan awal dengan suhu 95°C selama 3 menit. Hal ini akan menghancurkan dinding sel bakteri sebelum siklus PCR dimulai. Produk PCR akan dianalisis lebih lanjut dengan elektroforesis pada gel agarosa. PCR koloni hanya menggunakan bakteri dalam jumlah sedikit karena terlalu banyak bakteri

dalam campuran larutan PCR akan menghambat reaksi (Casali dan Preston, 2003). Primer yang dapat digunakan untuk identifikasi koloni *Escherichia coli* hasil transformasi berasal dari gen *HPT* pada plasmid pTA7002 (500 bp), gen *AtRKD4* (380 bp) (Mursyanti dkk., 2015), dan gen 22,4 (232 bp) dari *Escherichia coli* BL21(DE3) (Bauer dkk., 2007).

K. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan komponen atau molekul berdasarkan perbedaan muatannya dalam suatu medan listrik (Westermeyer, 2004) yang digunakan untuk pemisahan dan purifikasi makromolekul, berupa protein dan asam nukleat yang memiliki perbedaan ukuran, kadar ion, dan molekul-molekul penyusunnya (Langga, 2012). Molekul protein dan asam nukleat bermuatan negatif dan akan bergerak menuju kutub positif (katoda) dari alat elektroforesis (Basim dan Basim, 2001). Model migrasi elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Arah migrasi pada gel agarosa (Sumber : Basim dan Basim, 2001)
Keterangan : DNA bermigrasi dari kutub negatif ke kutub positif

Elektroforesis dapat dibedakan menjadi tiga kelompok berdasarkan medium elektroforesis, yaitu elektroforesis kertas, elektroforesis kapiler dan elektroforesis gel. Elektroforesis kapiler merupakan elektroforesis yang terdiri

atas pipa kapiler sebagai fase diamnya. Elektroforesis ini sering juga disebut sebagai *reverse-phase high performance liquid chromatography* (HPLC) (Camilleri, 1998). Elektroforesis kertas merupakan elektroforesis yang terdiri atas kertas sebagai fase diamnya dan partikel bermuatan yang terlarut akan sebagai fase gerak (Sulaiman, 2007). Sementara itu, elektroforesis gel adalah tipe elektroforesis yang menggunakan gelatin atau gel agar sebagai fase diam untuk memisahkan molekul-molekul (Stryer, 2000).

Penggunaan gel dalam elektroforesis lebih sering digunakan karena gel dapat mengurangi arus listrik yang timbul akibat perbedaan suhu yang kecil yang diperlukan agar pemisahan menjadi efektif, gel bertindak sebagai saringan molekul yang meningkatkan pemisahan (Stryer, 2000), gel juga dapat menjaga molekul yang telah terpisah supaya tidak berdifusi terlalu cepat ke dalam fase cair (Lehninger, 1982). Elektroforesis gel awalnya dilakukan dengan medium gel kanji (sebagai fase diam) untuk memisahkan biomolekul yang lebih besar seperti protein-protein. Saat ini, elektroforesis gel berkembang dengan menjadikan agarosa dan poliakrilamida sebagai gel media (Yepyhardi, 2009).

Elektroforesis DNA menggunakan gel berupa agarosa. Gel agarosa adalah senyawa kopolimer antara 1,3- β -D-galaktosa dan 1,4-3,6-anhidro- α -L-galaktosa, yang dapat ditukar dengan karboksilat, piruvat atau senyawa sulfat. Molekul agarosa berada dalam larutan dengan struktur lilitan acak (*random coil*) pada suhu lebih dari 35°C. Selama pendinginan, rantai-rantai agarosa akan

membentuk kumpulan serat heliks yang terikat oleh ikatan hidrogen nonkovalen (Stellwagen, 2009).

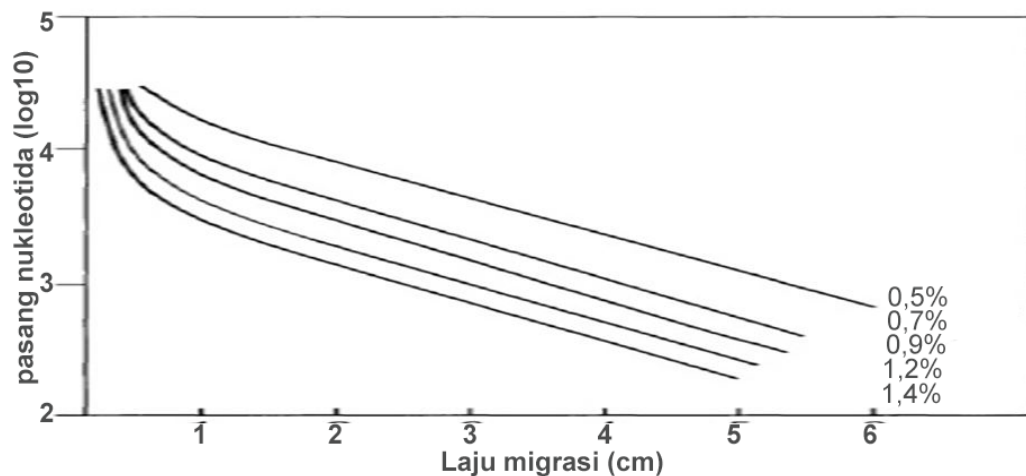
Konsentrasi dan jenis gel agarosa dapat bervariasi tergantung dari ukuran DNA yang akan dianalisis dan keperluan analisis dan manipulasi setelah elektroforesis. Pemisahan DNA biasanya menggunakan bubuk agarosa (Lee dan Bahaman, 2012). Konsentrasi agarosa dapat memisahkan DNA dengan ukuran berbeda tergantung dengan konsentrasinya sesuai dengan Tabel 2. (Sambrook dan Russell, 2001). Selain itu, semakin banyak kuantitas DNA, semakin tebal pita yang terlihat pada visualisasi elektroforesis (Yuwono, 2006).

Tabel 2. Hubungan konsentrasi agarosa yang diperlukan untuk memisahkan fragmen DNA dengan ukuran tertentu

Konsentrasi agarosa (1%, v/v)	Ukuran fragmen DNA untuk membentuk resolusi efektif (kb)
0,5	30 hingga 1
0,7	12 hingga 0,8
1,0	10 hingga 0,5
1,2	7 hingga 0,4
1,5	3 hingga 0,2

Sumber : Sambrook dan Russell (2001)

Konsentrasi gel agarosa juga mempengaruhi porositas gel agarosa. Hal ini mempengaruhi ukuran molekul DNA yang dapat dipisahkan dengan gel agarosa ketika dipisahkan dengan alat elektroforesis. Fragmen DNA yang sama akan bermigrasi (berpindah ke arah katoda) dengan kecepatan yang berbeda seiring dengan konsentrasi gel agarosa yang berbeda pula (Sambrook dan Russel, 2001), seperti pada Gambar 17.



Gambar 17. Grafik hubungan ukuran DNA terhadap mobilitas elektroforesisnya dengan variasi konsentrasi gel agarosa (Sumber : Sambrook dan Russell, 2001)

L. Hipotesis

1. Variasi konsentrasi inokulum awal dan kecepatan agitasi akan mempercepat laju pertumbuhan *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan konsentrasi inokulum awal *Escherichia coli* BL21(DE3) yang paling cepat mencapai nilai OD₆₀₀ 0,4 sebanyak 2% (v/v) dengan agitasi 220 rpm.
2. Variasi suhu dan waktu kejutan panas meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* ke dalam *Escherichia coli* strain BL21(DE3) dengan suhu dan waktu transformasi kejutan panas terbaik adalah 42°C selama 90 detik.