

## Kloning Gen Penyandi Trehalosa Sintase dari *Arthrobacter psychrolactophilus* di *Escherichia coli* DH5- $\alpha$

Hendra Kusnadi<sup>1</sup>, Nurul Izzati<sup>1\*</sup>, Isa Nuryana<sup>2</sup>, dan Fina Amreta Laksmi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu dan Teknologi Hayati, Universitas Teknologi Sumbawa

<sup>2</sup>Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

\*Correspondence email : nurul.izzati@uts.ac.id

### ABSTRACT

Trehalose is a disaccharide sugar composed of two glucose molecules linked by a covalent bond. Trehalose plays a crucial role in various industries as a stabilizer, preservative, sugar substitute, and protector against stress and dehydration, making it valuable in the food, pharmaceutical, cosmetic, and biotechnology industries. Trehalose synthase enzyme (TreS) can be utilized to enzymatically convert maltose into trehalose. This study aims to clone the TreS gene from the bacterium *Arthrobacter psychrolactophilus* into *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ . The research commenced with the isolation of the TreS gene from the genome of *Arthrobacter psychrolactophilus* using PCR. Subsequently, the base sequence was confirmed through sequencing methods. The study then proceeded with the cloning stage in *E. coli* DH5- $\alpha$ . The results of the research demonstrated that the isolated TreS gene using PCR had a size of approximately 1439 bp. Based on the sequencing results using the Clustal Omega tool, it was confirmed that the TreS gene did not undergo any mutations. Moreover, the insert (pET-28a-TreS) could be successfully replicated, as indicated by the growth of *E. coli* DH5- $\alpha$  colonies on kanamycin antibiotic selection medium. These findings indicate that the TreS gene can be isolated using PCR and successfully cloned in *E. coli* DH5- $\alpha$ . After ensuring the successful cloning of the TreS gene, the next step would be to express and characterize the gene.

Keywords: *Arthrobacter psychrolactophilus*, *Escherichia coli*, gene cloning, trehalose, trehalose synthase

### ABSTRAK

Trehalosa merupakan gula disakarida yang disusun oleh dua molekul glukosa secara kovalen. Trehalosa berperan penting dalam industri sebagai stabilisator, pengawet, pengganti gula, dan perlindungan terhadap kondisi stres dan dehidrasi, sehingga digunakan dalam berbagai industri termasuk industri pangan, farmasi, kosmetik, dan bioteknologi. Enzim trehalosa sintase (TreS) dapat dimanfaatkan untuk memproduksi maltose menjadi trehalose melalui metode enzimatik. Penelitian ini bertujuan untuk mengkloning gen TreS dari bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* ke dalam *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ . Penelitian ini diawali dengan tahap isolasi gen TreS dari genom bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* dengan PCR. Kemudian dilakukan tahap konfirmasi urutan basa dengan metode sekuensing. Setelah itu dilanjutkan dengan tahap kloning pada *E. coli* DH5- $\alpha$ . Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa gen TreS yang diisolasi menggunakan teknik PCR memperoleh ukuran sekitar 1439 bp, gen TreS tidak mengalami mutasi berdasarkan hasil sekuensing menggunakan tool Clustal Omega, dan insert (pET-28a-TreS) dapat diperbanyak yang terindikasi dengan adanya koloni *E. coli* DH5- $\alpha$  yang tumbuh pada medium seleksi antibiotik kanamisin. Dari hasil tersebut, menunjukkan bahwa gen TreS dapat diisolasi menggunakan teknik PCR dan dapat dikloning di dalam *E. coli* DH5- $\alpha$ . Setelah memastikan keberhasilan tahap kloning gen TreS, maka tahap selanjutnya gen TreS dapat diekspresi dan dikarakterisasikan.

Kata kunci: *Arthrobacter psychrolactophilus*, *Escherichia coli*, kloning gen, trehalosa, trehalosa sintase

### PENDAHULUAN

Trehalosa adalah disakarida non-pereduksi yang terdiri dari dua molekul glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1, 1 glikosidik [1]. Trehalosa memiliki banyak manfaat seperti stabilisator, pengawet, pengganti gula, dan perlindungan terhadap kondisi stres dan dehidrasi [2]. Oleh karena itu, trehalosa berpotensi digunakan dalam industri makanan, kosmetik,

dan farmasi sebagai agen retensi air yang tinggi, yang dapat membantu mencegah hilangnya kadar air dari produk [3].

Trehalosa dapat diproduksi dari maltosa melalui proses enzimatik menggunakan trehalosa sintase (TreS). Produksi enzim trehalosa sintase dapat dilakukan secara rekombinan. Teknologi DNA rekombinan dilakukan menggunakan sel *heterologous* yang aman dan mudah dibudidayakan, sehingga protein dapat

diproduksi dalam skala besar [4]. Salah satu bakteri yang umum dijadikan sel inang adalah *Escherichia coli* [5]. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa gen TreS telah berhasil direkombinasi dari beberapa isolat bakteri ke dalam *E. coli*. Beberapa bakteri diantaranya *Arthrobacter aurescens* [6], *Corynebacterium glutamicum* [7], *Deinococcus geothermalis* [8], *Thermomonospora curvata* [9], *Rhodococcus opacus* [10], dan *Arthrobacter chlorophenolicus* [11]. Namun belum memenuhi untuk skala industri [12], masih ditemukan beberapa kendala. Salah satu faktor penyebabnya adalah stabilitas enzim yang belum memadai [13]. Oleh karena itu, dibutuhkan kandidat bakteri yang memiliki kemampuan stabilisator, salah satunya adalah *Arthrobacter psychrolactophilus*. Bakteri ini memiliki kemampuan stabilisasi enzim, dan diharapkan gen TreS yang mengkode enzim trehalose sintase dapat memproduksi enzim trehalose sintase yang stabil [14]

Dalam penelitian ini dilakukan kloning gen TreS dari isolat bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* di *Escherichia coli* sebagai tahap awal proses produksi enzim trehalosa sintase (TreS).

## METODE

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juli 2022 – Oktober 2022 di Laboratorium Genomik, Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Kabupaten Bogor.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi freezer (-20°C dan -80°C), keranjang, mesin es, mikropipet dengan variasi volume (1-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, dan 0,5-5 mL), tip dengan variasi volume (10 µL, 200 µL, 1000 µL, dan 5 mL), mikrotube dengan variasi volume (0,2 mL dan 1,5 mL), gelas beker dengan variasi volume (100 -1000 mL), spidol, rak untuk tabung/mikrotube, *Laminar Air Flow* (LAF), rak stainless, *spin down*, *thermocycler*, gelas ukur dengan variasi volume (10-1000 mL), erlenmeyer dengan variasi volume (100 mL, 125 mL, dan 500 mL), kulkas (4°C), timbangan analitik, spatula dengan variasi panjang, mikrowave, perangkat elektroforesis, *UV-trasillumillator*, kater, tabung reaksi, hot magnetik stirrer, magnetik stirrer, pH meter, autoklaf, pipet, cawan petri, *dry-heating block*

*thermostat*, vortex, sentrifuge, NucleoSpin Gel dan kolom pembersihan PCR, *collection tube* (2 mL), nanodrop, jarum ose, bunsen, korek, falcon dengan variasi volume (15 dan 50 mL), nampan, *cryo tube*, inkubator dengan variasi jenis (*shaker* dan statis), spleet loop, QIAprep 2.0 spin column, water bath, sonikator, kamera, pinset, kim wipe, isolasi (bening, kertas), lakban, dan kertas timbangan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi primer (*forward* dan *reverse*), *buffer* TE 1X pH 7,4, *Nukleat Free Water* (NFW), DNA genom *Arthrobacter psychrolactophilus* JCM 12399, DNA plasmid pET-28a(+), alkohol (70%), *buffer* TBE, akuades, bubuk agarosa, marker (*gene ruler* 1 kb, 100 bp), 6X *green loading dye*, sybr, media Luria Bertani (LB) agar instan dan LB cair (*triphon*, sodium chlorida / NaCl, *yeast extract*), NaOH, pH *buffer* (pH 07.00, 09.21, dan 04.01), kanamisin, *CloneAmp HiFi Kit PCR Premix* (Takara, Bio Jepang), *buffer* NTI, *buffer* NT3, *buffer* NE, *buffer* EB, freezing solution, media SOC, *buffer* TTS, lyse blue, *buffer* P1, RNase, *buffer* PE, *buffer* P2, *buffer* N3, *custmart buffer* 10X, enzim restriksi NdeI, enzim restriksi BamHI, 5X in-fusion HD enzim, Kb *control insert*, pUC19 *control vector*, kapas, kertas label, plastik wrapping, aluminium foil, parafilm, tisu, plastik tahan panas, dan gloves.

### Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu isolasi, amplifikasi, dan purifikasi gen TreS, pemotongan plasmid pET-28a(+), konstruksi gen TreS ke dalam plasmid pET-28a(+), serta transformasi dan kloning.

### Isolasi, Amplifikasi dan Purifikasi Gen TreS

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan isolasi DNA genom dari bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* JCM 12399 yang diperoleh dari Pusat Penelitian BioResource RIKEN, Jepang. Tahap isolasi dimulai dengan menumbuhkan bakteri pada medium Tryptic soy broth yang diinkubasi pada suhu 28°C. Setelah mencapai kepadatan sel yang berkisar antara 10<sup>8</sup> hingga 10<sup>9</sup> sel per mililiter (sel/mL), dilakukan isolasi DNA genom menggunakan DNA extraction ZYMO Research. Setelah berhasil diisolasi, selanjutnya adalah merancang primer yang spesifik terhadap gen TreS yang ingin diisolasi. Primer yang digunakan dalam penelitian ini telah diuji kelayakannya menggunakan *software* Primer-BLAST dari

program *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Setelah primer berhasil didesain, dilakukan amplifikasi gen TreS dengan teknik *Polimerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan kit *CloneAmp™ HiFi PCR Premix* dari Takara Bio. Amplifikasi bertujuan untuk menghasilkan banyak salinan gen TreS sehingga dapat digunakan dalam skala produksi yang lebih besar. Komposisi reaksi PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Komposisi Campuran Reaksi PCR

| Reagen                                     | Komposisi |           |
|--------------------------------------------|-----------|-----------|
|                                            | 1x        | 2x        |
| <i>CloneAmp HiFi Kit PCR Premix 2X</i>     | 12,5      | 25        |
| Primer Forward                             | 2         | 4         |
| Primer Reverse                             | 2         | 4         |
| Template gDNA <i>A. psychrolactophylus</i> | 1         | 2         |
| Nuklease Free Water (NFW)                  | 7,5       | 15        |
| <b>Total (μL)</b>                          | <b>25</b> | <b>50</b> |

Campuran reaksi PCR dibuat sebanyak 50 μL. Hal ini dilakukan untuk mengatasi jumlah sampel yang terbatas dan dapat memudahkan untuk membagi campuran reaksi dengan rata ke dalam beberapa tabung. Setelah campuran reaksi PCR selesai, langkah selanjutnya adalah menyiapkan kondisi atau tahap reaksi PCR. Tahap reaksi PCR yang digunakan akan diatur sesuai dengan protokol *CloneAmp HiFi Kit PCR Premix* (Takara Bio). Detail tahapan reaksi PCR dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Tahap Reaksi PCR Gen TreS

| Segmen | Tahapan         | Suhu (°C) | Waktu     | Siklus |
|--------|-----------------|-----------|-----------|--------|
| 1      | Denaturasi awal | 98        | 5 menit   | -      |
| 2      | Denaturasi      | 98        | 10 detik  | 30     |
| 3      | Annealing       | 65        | 15 detik  | 30     |
| 4      | Elongasi        | 72        | 1,5 menit | 30     |
| 5      | Elongasi Akhir  | 72        | 10 menit  | -      |
| 6      | Preservasi      | 4         | ∞         |        |

Hasil PCR dari gen TreS kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% menggunakan *buffer* TBE 1x. Sebanyak 5 μL

hasil PCR dicampur dengan 1,5 μL 6X *green loading dye*, dan 1 μL sybr, serta proses ini dilakukan sebanyak 2 kali ulangan. Selanjutnya, 2,5 μL marker (*gene ruler* 1 kb) dicampur dengan 1,5 μL 6X *green loading dye*, dan 1 μL sybr. Kemudian mesin elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 V selama 45 menit. Setelah itu, gel hasil elektroforesis diamati pada UV-*Transilluminator*. Jika hasil analisis menunjukkan ukuran pita yang sesuai dengan ukuran fragmen DNA target, maka produk PCR tersebut dapat dimurnikan. Namun sebelum dimurnikan, produk PCR tersebut difoto terlebih dahulu sebagai hasil isolasi dan amplifikasi gen TreS.

Selanjutnya, tahap purifikasi atau pemurnian gen TreS dilakukan sesuai protokol *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up*. Setelah tahap purifikasi DNA selesai, fragmen DNA atau gen TreS murni yang didapatkan diukur konsentrasinya menggunakan NanoDrop dan divisualisasikan dengan elektroforesis seperti pada tahap sebelumnya. Jika pada hasil visualisasi ditemukan ukuran pita yang sesuai dengan ukuran fragmen DNA target, maka produk PCR tersebut dapat disisipkan pada vektor DNA untuk ditransformasikan ke dalam sel bakteri.

### Pemotongan Plasmid pET-28a(+)

Tahap pemotongan plasmid pET-28a dilakukan dengan menggunakan *CutSmart® Buffer* dan dua enzim restriksi, yaitu BamHI dan NdeI dengan ujung yang klebrigen (*sticky end*). Komposisi campuran reaksi pemotongan plasmid dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Komposisi Campuran Reaksi Pemotongan DNA plasmid pET-28a

| Reagen                     | Cut 1     | Cut 2     |
|----------------------------|-----------|-----------|
| NFW                        | 33        | 31        |
| 10X <i>Cutsmart Buffer</i> | 5         | 5         |
| Enzim BamHI                | 2         | -         |
| Enzim NdeI                 | -         | 2         |
| DNA Plasmid pET-28a        | 10        | 10        |
| <b>Total (μL)</b>          | <b>50</b> | <b>48</b> |

Campuran reaksi dihomogenkan menggunakan *spindown*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam di dalam inkubator statis. Informasi mengenai enzim restriksi dan urutan pengenalannya dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Enzim Restriksi dan Urutan Pengenalannya

| Nama Enzim | Sumber Bakteri                    | Urutan Pengenalannya |
|------------|-----------------------------------|----------------------|
| BamHI      | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | G↓GATCC              |
| NdeI       | <i>Neisseria denitrificans</i>    | CATAT↓G              |

#### Konstruksi Gen TreS ke dalam Plasmid pET-28a(+)

Tahap konstruksi dilakukan sesuai protokol *In-Fusion® HD Cloning Kit*. Adapun komposisi campuran reaksi *In-Fusion Cloning* dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Komposisi Campuran Reaksi *In-Fusion Cloning*

| Reagen                                   | Kloning   | Kontrol Negatif | Kontrol Positif                                    |
|------------------------------------------|-----------|-----------------|----------------------------------------------------|
| Purified PCR fragment                    | 1,5       | -               | (2 kb control insert) 4 (pUC19 control vector) 1,5 |
| Linearized vector                        | 5         | 1               |                                                    |
| 5X <i>In-Fusion HD Enzyme Premix</i> NFW | 2         | 2               | 2                                                  |
|                                          | 1,5       | 7               | 2,5                                                |
| <b>Total (µL)</b>                        | <b>10</b> | <b>10</b>       | <b>10</b>                                          |

Tahapan konstruksi dimulai dengan campuran reaksi *in-fusion cloning* dispin-down selama 5 detik, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 45 menit dan 60 menit. Selanjutnya, semua sampel diambil dengan menggunakan pipet sebanyak 5 µL dan dipindahkan ke masing-masing mikrotube berukuran 1,5 mL. Setelah itu, mikrotube diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Hasil reaksi konstruksi kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5-α yang telah dikompetensikan.

#### Transformasi dan Kloning

Proses transformasi dilakukan pada bakteri *E. coli* DH5-α yang kompeten menggunakan metode *heat shock*. Sebanyak 50 µL sel *E. coli* DH5-α kompeten dicampur dengan 5 µL hasil konstruksi, kemudian diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Selanjutnya, larutan hasil

inkubasi tersebut diberi perlakuan *heat shock* pada suhu 42°C selama 45 detik di dalam *water bath*, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 3 menit. Campuran selanjutnya diambil dan ditransfer ke dalam cawan petri yang berisi 20 mL medium Luria-Bertani Agar (LBA) yang mengandung 30 ppm kanamisin, kemudian sampel disebarluaskan menggunakan L-ops sampai kering. Setelah itu, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam di dalam inkubator statis.

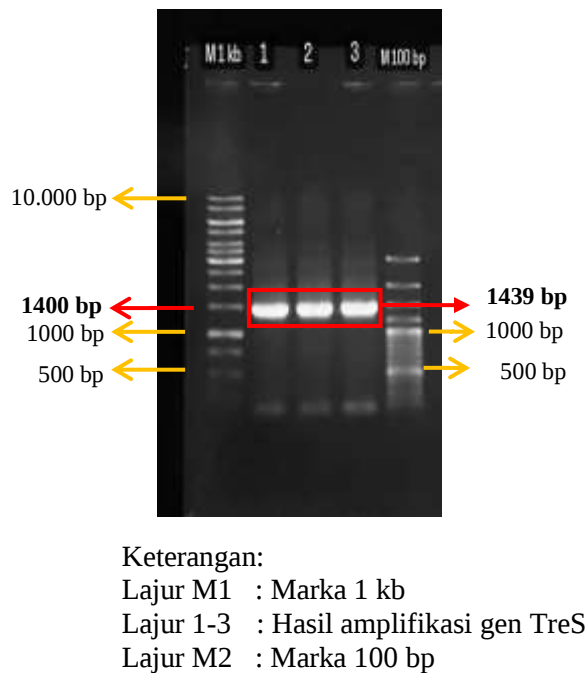
#### Konfirmasi Urutan Basa Gen TreS

Konfirmasi urutan basa dapat dilakukan dengan cara PCR dan sekuensing. Metode PCR mengikuti metode yang telah dijelaskan sebelumnya, sedangkan sekuensing dilakukan setelah produk PCR dihasilkan, tahap selanjutnya sekuensing menggunakan primer *forward* T7 promotor dan primer *reverse* T7 terminator. Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa fragmen DNA yang diisolasi adalah gen TreS yang diharapkan. Sampel kemudian dikirim ke perusahaan base 1 di Singapura untuk dilakukan sekuensing. Data sekuensing mentah berupa sekuen DNA dari gen TreS disimpan dalam format file (ab1). Kemudian, data tersebut digunakan untuk menghasilkan hasil sekuen utuh dengan menggunakan *software generate consensus*. Data sekuensing kemudian dianalisis menggunakan *software* Clustal Omega.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Analisis Gen TreS dengan PCR

Tahap awal dalam penelitian ini adalah persiapan fragmen DNA target gen TreS yang berasal dari DNA genom bakteri *A. psychrolactophilus*. Persiapan tersebut dilakukan dengan melakukan isolasi dan amplifikasi fragmen DNA menggunakan teknik PCR dengan primer *forward* dan *reverse* TreS-F (5'CGCGGCAGCCATATGATGACCGGCAAGCCGGCCCTC-3') dan TreS-R (5'GCTCGAATTCGGATCCTCATTCAGTTCGGCCTCCTGTTGG-3'), yang dirancang berdasarkan hasil penyelarasan beberapa urutan primer pada NCBI. Gen TreS diketahui memiliki ukuran sekitar 1439 bp [15]. Hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% dapat dilihat pada Gambar 1.

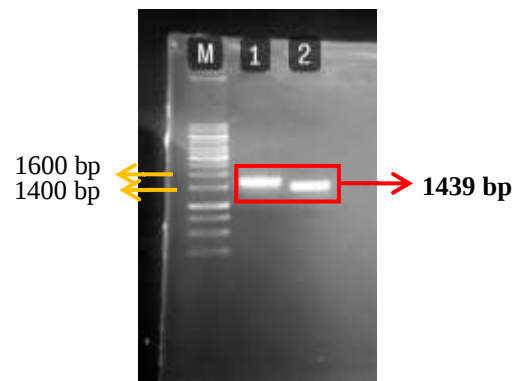


**Gambar 1.** Visualisasi Hasil Amplifikasi Gen TreS

Proses amplifikasi gen TreS dengan teknik PCR berhasil dilakukan. Hal ini ditandai dengan adanya pita DNA gen TreS pada gel agarosa dengan ukuran yang sesuai dengan yang diharapkan, yaitu sekitar 1439 bp [15]. Keberhasilan amplifikasi tergantung pada kemurnian DNA yang digunakan dalam reaksi PCR. Selain itu, juga dipengaruhi oleh tingkat spesifitas dengan suhu penempelan primer [15]. Suhu penempelan primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah 65°C, dimana pada suhu tersebut berhasil terjadi proses penempelan primer. Hal ini ditandai dengan ketebalan pita DNA pada hasil amplifikasi.

Sampel gen target hasil amplifikasi perlu dimurnikan atau dipurifikasi untuk memastikan bahwa hasil amplifikasi benar-benar mewakili produk yang diinginkan dan menghilangkan kontaminasi atau produk sampingan yang tidak diinginkan. Proses purifikasi juga sangat penting dilakukan dalam langkah-langkah selanjutnya dalam analisis molekuler. Selain itu, dalam tahap analisis biologis sangat penting mengukur konsentrasi gen target murni. Hal ini dilakukan untuk mengetahui berapa banyak DNA target yang ada dalam sampel. Adapun konsentrasi DNA hasil purifikasi yang diukur dengan NanoDrop adalah sebesar 57,6 ng/μL dan 49,8 ng/μL dengan kemurnian masing-masing 1.94 dan 1.97 pada absorbansi A260/280. Hasil purifikasi gen TreS divisualisasi dengan

elektroforesis gel agarosa 0,8% dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Visualisasi Hasil Purifikasi Gen TreS

Proses purifikasi gen TreS berhasil dilakukan, diketahui dengan adanya pita DNA murni dengan ukuran yang sama seperti pada saat amplifikasi sekitar 1439 bp. Namun dalam gambar pita sampel gen TreS, terlihat bahwa ulangan pertama dan kedua menunjukkan perbedaan. Padahal seharusnya keduanya menghasilkan hasil akhir yang sama. Kemungkinan terjadinya kesalahan ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor, seperti ketidakpastian dalam pengukuran, kesalahan dalam proses pengerjaan di laboratorium, dan faktor-faktor lainnya. Meskipun perbedaan ukuran pita antara ulangan 1 dan 2 sangat kecil, tidak perlu dikhawatirkan karena ini bisa dianggap sebagai variasi teknis yang wajar. Tujuan dilakukan visualisasi gen TreS murni dengan elektroforesis adalah untuk memvalidasi hasil amplifikasi yang sebelumnya telah diuji, sehingga dapat memverifikasi produk amplifikasi sesuai dengan yang diharapkan. Hasil purifikasi tersebut siap digunakan pada tahap konstruksi plasmid rekombinan.

### Konfirmasi Urutan Basa Melalui Metode Sekuensing

Metode Sekuensing sangat penting dilakukan untuk memastikan bahwa gen yang telah diisolasi adalah benar-benar gen yang ditargetkan dan diinginkan. Hal ini penting untuk menghindari kemungkinan kontaminasi atau kesalahan dalam proses isolasi dan amplifikasi. Primer *forward*

T7 promotor dan primer *reverse* T7 terminator digunakan dalam metode sekuensing ini untuk menentukan urutan basa DNA target. T7 Promotor memulai replikasi dari ujung 5', dan T7 Terminator menghentikan replikasi pada ujung 3'. Teknik ini menggunakan polymerase DNA, dideoxynucleotida (ddNTPs) dan dNTPs untuk menghasilkan fragmen DNA yang diakhiri pada setiap posisi nukleotida. Sekuen DNA dari gen TreS yang disimpan dalam format file (ab1), digunakan untuk menghasilkan hasil sekuens utuh menggunakan *software generate consensus*. Sekuens utuh ini adalah hasil gabungan dari beberapa hasil sekuensing yang dilakukan pada DNA yang sama. Setelah menghasilkan sekuens utuh menggunakan *software generate consensus*, data sekuensing tersebut dapat dianalisis lebih lanjut menggunakan beberapa perangkat lunak, salah satunya menggunakan *software* Clustal Omega yang dapat digunakan untuk melakukan *multiple sequence alignment* pada beberapa sekuens DNA. Hasil alignment dapat dilihat pada Gambar 3.

[illegible]

|                                      |                                                           |      |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------|
| Tref_Arthrobacter_psychrolactophilus | TTTACGCGCCGCGATGACATCAAGTCGCGCGCTCTGTCAACCGCGACACATGAC    | 1384 |
| Thymers_Sequencing                   | TTTACGCGCCGCGCGATGACATCAAGTCGCGCGCTCTGTCAACCGCGACACATGAC  | 1386 |
| *****                                |                                                           |      |
| Tref_Arthrobacter_psychrolactophilus | GGCTCAAACTGCGCATATAGCGCGCTCGCTCTCTCCCGGGAATCGAGCGCGCG     | 1344 |
| Thymers_Sequencing                   | GGCTCAAACTGCGCATATAGCGCGCTCGCTCTCTCCCGGGAATCGAGCGCGCG     | 1400 |
| *****                                |                                                           |      |
| Tref_Arthrobacter_psychrolactophilus | ATGCGGCGCATGCGCTGTCAGCTCTCAAGCGCATGATCCAGCTCTGAGAGAGATTC  | 1404 |
| Thymers_Sequencing                   | ATGCGGCGCATGCGCTGTCAGCTCTCAAGCGCATGATCCAGCTCTGAGAGAGATTC  | 1506 |
| *****                                |                                                           |      |
| Tref_Arthrobacter_psychrolactophilus | CTTGGACATCTCAACAGAGGCGCAATCTAGTA                          | 1848 |
| Thymers_Sequencing                   | CTTGGACATCTCAACAGAGGCGCAATCTAGTAAGAGATTCGATCTGAGCTCTGTGCA | 1849 |
| *****                                |                                                           |      |
| Tref_Arthrobacter_psychrolactophilus | *****                                                     | 1448 |
| Thymers_Sequencing                   | CAAGTCTGTGCGCGCACTAGAGACACACATACATACATAGATTCGAGTGTGATACAA | 1620 |

**Gambar 3.** Hasil Alignment Gen TreS Menggunakan Tool Clustal Omega

Dari hasil alignment gen TreS di atas, diperoleh informasi bahwa angka sebelah kanan gambar menunjukkan urutan nukleotida. Tanda (\*) menunjukkan adanya homologi atau kesamaan dalam sekuens dengan referensi *A. psychrolactophilus*, yang ditunjukkan dengan label “TreS\_Arthrobacter\_psychrolactophilus”. Gambar juga menunjukkan hasil sekuensing menggunakan primer T7 dengan label “T7primers\_sequencing”. Hasil alignment menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan atau mutasi pada gen TreS antara sampel yang dianalisis dengan sekuens referensi. Hal ini dapat dilihat dari keselarasan atau pencocokan penuh antara sekuens gen TreS yang dianalisis dan sekuens referensi.

## Konstruksi dan Transformasi Plasmid Rekombinan ke dalam *E. coli* DH5- $\alpha$

Konstruksi merupakan proses menyusun atau menggabungkan sekuens DNA yang berbeda sehingga menghasilkan rekombinan DNA atau struktur molekuler yang diinginkan [16]. Konstruksi mengacu pada vektor linear sebagai sarana untuk menyisipkan gen target ke dalam sel bakteri. Untuk dapat menyisipkan gen target ke dalam vektor linear, ada beberapa syarat yang harus dipenuhi dan langkah-langkah yang harus diikuti, seperti vektor linear dan gen target harus memiliki situs restriksi yang kompatibel, ujung-ujung DNA yang dihasilkan oleh pemotongan dengan enzim pemotong harus kompatibel dengan ujung-ujung DNA di vektor linear, diperlukan enzim pemotong untuk memotong DNA pada situs restriksi yang diinginkan dan enzim ligase untuk menyatukan DNA gen target dengan vektor linear, vektor harus memiliki gen marker yang memungkinkan identifikasi sel inang yang berhasil memasukkan vektor ke dalam genomnya, vektor harus memiliki mekanisme untuk menghindari sel inang yang mengandung vektor tanpa gen target yang

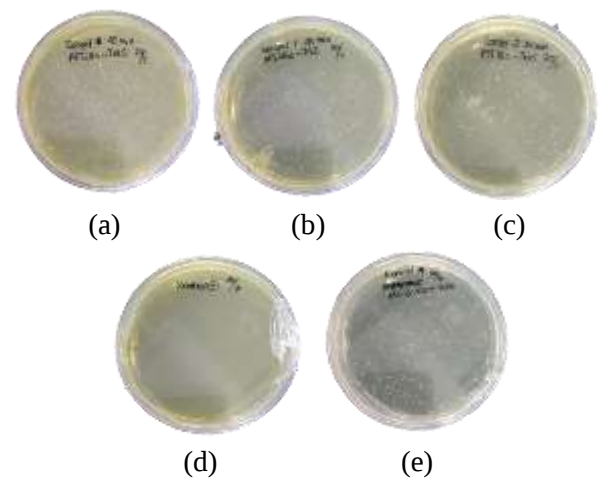
disisipkan, ukuran vektor linear harus mencukupi untuk menampung gen target dan komponen lainnya seperti promotor dan terminator, dan setelah penyisipan gen target, vektor perlu diurutkan (sekuensing) untuk memverifikasi bahwa gen target telah dimasukkan dengan benar dan tidak ada perubahan yang tidak diinginkan [16].

Dalam penelitian ini, plasmid pET-28a digunakan sebagai vektor. Plasmid pET-28a dipotong dengan enzim restriksi yang sesuai untuk menciptakan situs pengenalan baru yang komplementer dengan ujung-ujung produk PCR. Enzim restriksi tersebut, yaitu BamHI dan NdeI. Pemotongan plasmid dengan enzim restriksi dilakukan supaya plasmid pET-28a menjadi linear dan molekul DNA yang mengkode gen TreS bisa disisipkan. Pemotongan dengan dua enzim restriksi dilakukan untuk mencegah terjadinya keterbalikan pada saat penempelan [17]. Pada tahap sebelumnya, primer PCR yang digunakan untuk mengisolasi gen target (TreS), telah dirancang sehingga memiliki ujung-ujung yang sesuai dengan situs pengenalan enzim restriksi yang digunakan pada plasmid pET-28a.

Umumnya dalam teknik kloning konvensional, gen target dan vektor linear digabungkan dengan bantuan enzim ligase. Namun, metode ini memiliki beberapa kelemahan, seperti memerlukan waktu yang lama, rentan terhadap kesalahan, dan berpotensi menghasilkan banyak vektor yang kosong atau tidak terisi dengan gen target [18]. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan pendekatan alternatif yaitu menggunakan kit klon in-fusion HD untuk menyisipkan gen target ke vektor linear. Kit ini mengandung enzim yang memungkinkan terjadinya *annealing* untai tunggal antara molekul DNA dengan urutan DNA homolog yang pendek di ujungnya, seperti produk PCR dan vektor linear, sehingga membentuk molekul hibrida [19].

Transformasi adalah salah satu metode untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel organisme, termasuk bakteri. Transformasi dapat terjadi pada bakteri yang bersifat kompeten, yaitu mampu mengikat DNA ekstraseluler dan memasukkan materi genetik tersebut ke dalam sitoplasma [20]. Proses transformasi memungkinkan DNA rekombinan dimasukkan ke dalam sel bakteri, di mana plasmid akan direplikasi. Dalam penelitian ini, bakteri *E. coli* DH5- $\alpha$  dipilih dan digunakan sebagai sel inang karena kemampuannya yang dapat mempertahankan plasmid secara efisien dan memungkinkan amplifikasi plasmid untuk

analisis atau ekspresi pada tahap selanjutnya [21]. Untuk memastikan bahwa hanya sel-sel *E. coli* DH5- $\alpha$  yang berhasil membawa plasmid rekombinan yang akan tumbuh, digunakan medium agar LB yang mengandung antibiotik kanamisin sebagai media selektif. Plasmid rekombinan yang telah dimasukkan ke dalam sel *E. coli* DH5- $\alpha$  mengandung resistensi terhadap antibiotik kanamisin. Oleh karena itu, hanya sel-sel yang berhasil memperoleh plasmid rekombinan yang akan mampu bertahan dan tumbuh pada medium selektif tersebut. Adapun hasil transformasi dan kloning *insert* ke *E. coli* DH5- $\alpha$  dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Hasil Transformasi Plasmid Rekombinan ke *E. coli* DH5- $\alpha$ . Ket: (a), (b) plasmid rekombinan pET-28a-TreS diinkubasi selama 45 menit, (c) plasmid rekombinan pET28a TreS diinkubasi selama 60 menit, (d) kontrol negatif pET-28a-TreS diinkubasi selama 45 menit dan (e) kontrol positif pUC19 diinkubasi selama 45 menit.

Proses konstruksi dan transformasi berhasil dilakukan. Hal ini terindikasi dengan adanya koloni *E. coli* DH5- $\alpha$  yang tumbuh pada medium seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin. Koloni bakteri tersebut menunjukkan bahwa *insert* (pET-28a-TreS) telah masuk ke dalam *E. coli* DH5- $\alpha$ . Selain itu, pada kontrol positif terdapat koloni bakteri yang tumbuh yang menunjukkan bahwa kondisi eksperimen dan medium seleksi yang digunakan berfungsi dengan baik. Sementara, pada kontrol negatif tidak terdapat koloni bakteri yang tumbuh. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terjadinya kontaminasi.

Kontrol negatif penting untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh dari pertumbuhan koloni bakteri pada medium seleksi berasal dari transformasi gen yang diinginkan dan bukan dari kontaminasi dengan bakteri lain.

Waktu inkubasi selama 45 menit dan 60 menit digunakan untuk mengetahui pertumbuhan optimal bakteri *E. coli* DH5- $\alpha$ . Hasil menunjukkan bahwa inkubasi selama 45 menit memberikan kondisi yang lebih baik bagi pertumbuhan bakteri pada medium seleksi, sehingga jumlah koloni bakteri yang berkembang lebih banyak dibandingkan dengan waktu inkubasi selama 60 menit. Hal ini terjadi mungkin melibatkan faktor-faktor seperti laju pertumbuhan bakteri, kehadiran atau ketiadaan zat-zat nutrisi yang diperlukan oleh bakteri tertentu, atau interaksi dengan faktor lingkungan lainnya yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan bakteri.

### KESIMPULAN

Gen TreS berhasil dikloning di dalam *E. coli* DH5- $\alpha$ . Penelitian ini menunjukkan bahwa gen TreS berhasil diisolasi dari genom bakteri *A. psychrolactophilus* dengan teknik PCR menggunakan primer *forward* (TreS-PET28a-F) dan *reverse* (TreS-PET28a-R) yang dirancang berdasarkan hasil penyelarasan beberapa urutan primer pada NCBI. Kemudian gen TreS dapat dimasukkan ke dalam plasmid pET-28a yang kompatibel dengan *E. coli* DH5- $\alpha$  melalui proses konstruksi menggunakan kit klon in-fusion HD. Selain itu, juga diketahui dari hasil transformasi, dimana sel-sel *E. coli* DH5- $\alpha$  yang membawa *insert* pET-28a-TreS berhasil tumbuh pada media selektif.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Terima kasih kepada pihak Fakultas Ilmu dan Teknologi Hayati, Universitas Teknologi Sumbawa dan Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Kabupaten Bogor yang telah membantu dan memfasilitasi kegiatan penelitian ini sehingga dapat terlaksana dengan baik dan lancar.

### REFERENSI

- [1] Chou, H.L., Dai, Z.W., Hsieh, C.Y. and Wang, Y.T. (2019). "Trehalose: an osmolyte that enhances abiotic stress tolerance and anti-oxidant activity in plants". *Frontiers in Plant Science*, 9:1-13.
- [2] Song, H., Ding, M., Jiao, L., dan Zhang, C. (2020). Applications of trehalose in pharmaceutical formulations. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 512.
- [3] Khaerati, S. R. (2022). Pengaruh Efek Pemberian Gula Trehalosa Terhadap Pencegahan Penurunan Fungsi Ginjal Dengan Menilai Kadar Cystatin-C Dan Gambaran Histopatologi Ginjal Pada Tikus Putih Tua (*Rattus Norvegicus* Strain Wistar)= The Effect Of Administration Trehalose Sugar On Renal Impairment Prevention By Assessing Cystatin-C Level And Histopatologic Finding On Old White Rat (*Rattus Norvegicus* Strain Wistar) (Doctoral dissertation, Universitas Hasanuddin).
- [4] Gaffar, S. (2012) Bioteknologi Molekul Konsep dan Aplikasi. Bandung: Widya
- [5] Setyoadji, W. A., E. Sulistyaningsih, dan I. F. Kusuma. 2021. Optimized expression condition of cidra-pfemp1 recombinant protein in *Escherichia coli* bl21(de3): a step to develop malaria vaccine candidate. *Research Shilling*, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1), 214. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>
- [6] Xiuli W, Hongbiao D, Ming Y, Yu Q. 2009. Kloning gen, ekspresi, dan karakterisasi novel trehalose synthase dari *Arthrobacter aurescens*. *Appl Mikrobiol Biotechnol* 83:477–482. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-1863-5>.
- [7] Kim, H. J., Lee, J. Y., Kang, K. H., dan Kim, Y. H. (2010). Enhanced thermostability and catalytic efficiency of *Corynebacterium glutamicum* trehalose synthase by directed

- evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 789-798.
- [8] Pawel, M., Anna, B., Ewa, M., Katarzyna, H., dan Katarzyna, H. (2012). Cloning, expression and characterization of a novel trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 84, 207-214.
- [9] Liang JY, Huang RB, Huang Y, Wang XB, Du LQ. (2013). Cloning, expression, properties, and functional amino acid residues of new trehalose synthase from *Thermomonospora curvata* DSM 43183. *J Mol Catal Benzym* 90: 26-32. doi:10.1016/j.molcatb.2013.01.014.
- [10] Yan, J., Yao, M., Gao, Z., Guo, X., dan Jia, C. (2013). Cloning, expression and characterization of trehalose synthase from *Rhodococcus opacus* for the production of trehalose. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 515-520.
- [11] Cai, X., Liu, D., Chen, X., Wu, Q., Chen, Y., dan Chen, H. (2019). Enhanced thermostability of trehalose synthase from *Arthrobacter chlorophenolicus* by site-directed mutagenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 584-591.
- [12] Liu, H., Yang, S., Wang, X., dan Wang, T. (2019). Production of trehalose with trehalose synthase expressed and displayed on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-1
- [13] Ahmed, M. B. S., Lan, J., dan Zhou, Y. (2020). Protein Engineering of Enzymes for Enhanced Activity, Stability and Function. *Journal of Molecular Biology*, 432(9), 2771-2799. doi: 10.1016/j.jmb.2020.03.009
- [14] Sayuti, K., Hasanah, U., Azhar, A., dan Salam, R. (2019). Karakterisasi Bakteri Termofilik Pendegradasi Trehalosa dari Sumber Air Panas Banjar Banyuwangi. *Jurnal Biologi Tropis*, 19(2), 120-128.
- [15] Pawlak-Szukalska, A., Wanarska, M., Popinigis, A. T., dan Kur, J. (2014). A novel cold-active  $\beta$ -d-galactosidase with transglycosylation activity from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32cB—Gene cloning, purification and characterization. *Process Biochemistry*, 49(12), 2122-2133.
- [16] Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., dan Losick, R. (2013). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [17] Molecular Biology. 5th edition. Robert F. Weaver. McGraw-Hill Education, 2017.
- [18] Tuo, D., Shen, W., Yan, P., Li, X., dan Zhou, P. (2015). Rapid Construction of Stable Infectious Full-Length cDNA Clone of Papaya Leaf Distortion Mosaic Virus Using InFusion Cloning. *Viruses*, 7(12), 6241–6250. <https://doi.org/10.3390/v7122935>
- [19] Irwin, C. R., Farmer, A., Willer, D. O., dan Evans, D. H. (2012). In-Fusion® Cloning with Vaccinia Virus DNA Polymerase (pp. 23–35). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779876-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779876-4_2)
- [20] Teymourian, H., Mohd Azhar, S. H., dan Abdul Rashid, N. A. (2021). Transformation methods and genome editing tools for filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 43(9), 1737-1753.
- [21] Souza, B. M. (2013). Get a new recombination of the LAGT1 complex telephone component recombination from *Leishmania Amazonensis*.