

## KONSTRUKSI DAN KLONING GEN *CelE* PENYANDI ENZIM SELULASE SEBAGAI KANDIDAT ENZIM BAGI INDUSTRI PANGAN DAN AGROINDUSTRI

[Construction and Cloning of the *CelE* Gene Encoding the Cellulase Enzyme as A Candidate Enzyme For the Food Industry and Agroindustry]

Sukarne<sup>1)</sup>, Hasma<sup>1)</sup>, Raudatul Jannah<sup>2)</sup>, Muhammad Aidil Fitriyan Fadjar Suryadi<sup>1)</sup>,  
Lalu Unsunnidhal<sup>3)</sup>\*

<sup>1)</sup>Fakultas Peternakan, Universitas Mataram, Mataram, NTB, Indonesia

<sup>2)</sup>Program Studi Diploma Kebidanan, STIKES Yarsi Mataram, Mataram, NTB, Indonesia

<sup>3)</sup>Fakultas Teknologi Pangan dan Agroindustri, Universitas Mataram, Mataram, NTB, Indonesia

\*email: [lalu.unsunnidhal@unram.ac.id](mailto:lalu.unsunnidhal@unram.ac.id)

### ABSTRACT

Research on the construction and cloning of the *CelE* gene, which encodes the cellulase enzyme from *Ruminococcus plavefaciens*, emerged as a response to the urgent need for efficient enzyme resources in the food industry and agro-industry. Cellulase enzymes, with a focus on *CelE*, have a vital role in the degradation process of cellulose, a main component in plant cell walls. The existence of *Ruminococcus plavefaciens* as a source of the *CelE* gene is of interest because this microorganism is found in the digestive system of ruminant animals and has great potential to produce efficient cellulase enzymes. This research aimed to create and clone the pET15b plasmid with the *CelE* gene. Confirmation of the *CelE* gene in recombinant DNA was carried out by identifying host bacterial resistance in media with antibiotics and colony PCR. This research was carried out by applying the following methods: Implementation of Codon Optimization and Recombinant Plasmid Construction (*CelE*), Preparation of Competent Cells, Cell Transformation, and Transformant Colony PCR Test. The results of the research show that this research has succeeded in obtaining the expected transformant bacteria with the results of the Transformant Colony PCR Test. obtained the appropriate product size, namely 205 bp, so it can be concluded that the pET15b plasmid with the optimized *CelE* gene was successfully constructed and cloned.

**Keywords:** *CelE*, Cellulase Enzyme, Recombinant DNA Cloning, Recombinant DNA Construction.

### ABSTRAK

Penelitian konstruksi dan kloning gen *CelE*, yang merupakan penyandi enzim selulase dari *Ruminococcus plavefaciens*, muncul sebagai respons terhadap kebutuhan mendesak akan sumber daya enzim yang efisien dalam industri pangan dan agroindustri. Enzim selulase, dengan fokus pada *CelE*, memiliki peran vital dalam proses degradasi selulosa, sebuah komponen utama dalam dinding sel tanaman. Keberadaan *Ruminococcus plavefaciens* sebagai sumber gen *CelE* menarik perhatian karena mikroorganisme ini terdapat dalam sistem pencernaan hewan ruminansia dan memiliki potensi besar untuk menghasilkan enzim selulase yang efisien. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuat dan mengkloning plasmid pET15b dengan gen *CelE*. Konfirmasi gen *CelE* pada DNA rekombinan dilakukan dengan metode identifikasi resistensi bakteri *host* pada media dengan antibiotik dan koloni PCR. Penelitian ini dilaksanakan dengan menerapkan metode sebagai berikut: Pelaksanaan Optimasi Kodon dan Konstruksi Plasmid Rekombinan (*CelE*), Persiapan Sel Kompeten, Transformasi Sel, Uji PCR Koloni Transforman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penelitian ini telah berhasil mendapatkan bakteri transforman yang diharapkan dengan hasil Uji PCR Koloni Transforman mendapatkan *product size* yang sesuai yaitu 205 bp, sehingga dapat disimpulkan plasmid pET15b dengan gen *CelE* yang telah dioptimasi berhasil dikonstruksi dan dikloning.

**Kata Kunci:** *CelE*, Enzim Selulase, Kloning DNA Rekombinan, Konstruksi DNA Rekombinan.

## PENDAHULUAN

Industri pangan dan agroindustri semakin dihadapkan pada kebutuhan mendesak untuk meningkatkan efisiensi produksi dan menghadapi tantangan berkelanjutan dalam pengelolaan sumber daya. Dalam rangka memenuhi kebutuhan tersebut, penelitian konstruksi dan kloning gen *CelE* dari *Ruminococcus flavefaciens* menjadi langkah penting dalam pengembangan sumber daya enzim selulase yang efisien. Enzim selulase, terutama yang difokuskan pada *CelE*, memainkan peran sentral dalam degradasi selulosa, komponen utama dinding sel tanaman (Datta, 2024).

Keberadaan *Ruminococcus flavefaciens* sebagai sumber gen *CelE* memberikan aspek unik dan menarik dalam penelitian ini. Mikroorganisme ini, yang ditemukan dalam sistem pencernaan hewan ruminansia, menunjukkan potensi besar dalam menghasilkan enzim selulase dengan efisiensi tinggi (Hua et al., 2022). Sehingga, penelitian ini memiliki tujuan utama untuk mengembangkan konstruksi dan kloning gen *CelE* dari *Ruminococcus flavefaciens*, dengan harapan dapat menciptakan enzim selulase yang lebih efisien.

Proses pendegradasi selulosa menjadi komponen yang dapat dimanfaatkan di dalam industri menjadi fokus utama. Melalui pendekatan rekayasa genetika, langkah awal yang esensial adalah konstruksi dan kloning gen *CelE* ke dalam plasmid pET15b. Plasmid ini memiliki peran krusial dalam menyediakan platform untuk ekspresi dan produksi enzim selulase secara efisien (Arthur et al., 2011). Oleh karena itu, penelitian ini memiliki kepentingan strategis dalam menciptakan solusi berkelanjutan untuk industri pangan dan agroindustri.

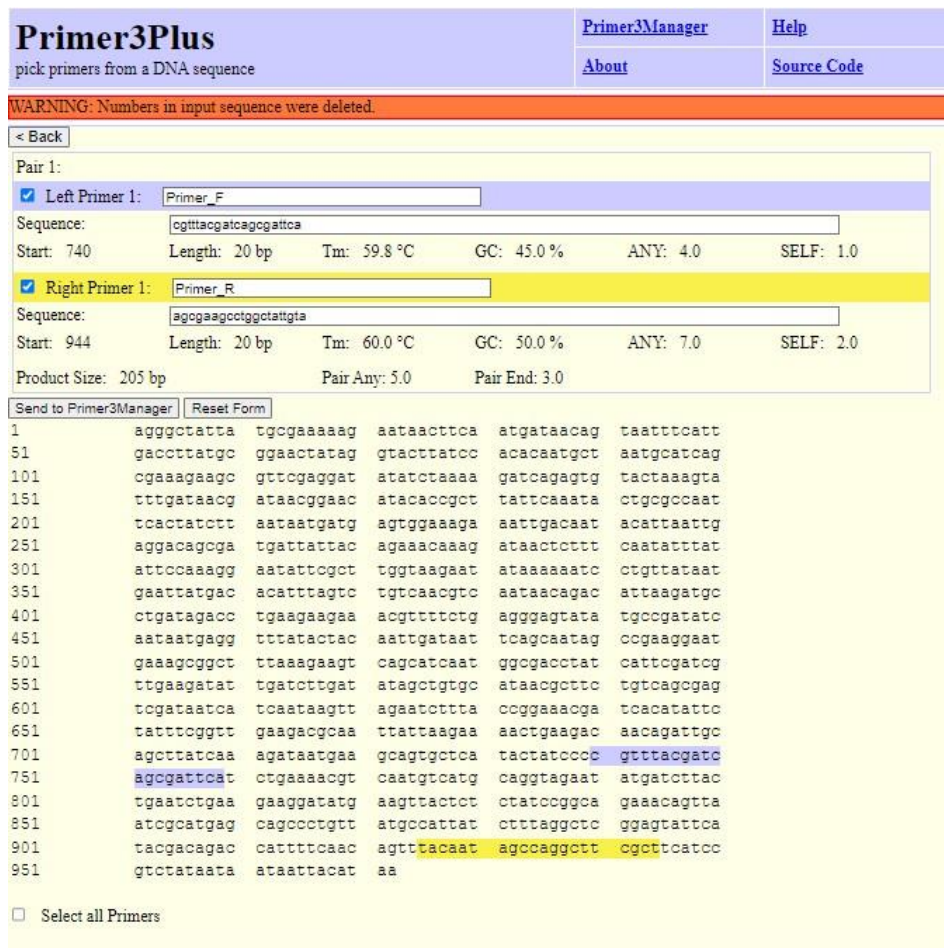
Dengan pencapaian tujuan ini, penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan enzim selulase yang memiliki potensi aplikasi luas dalam industri pangan dan agroindustri. Keseluruhan pendekatan ini menjadi langkah yang signifikan dalam menghadapi tantangan industri dan memberikan kontribusi pada pengembangan teknologi yang berkelanjutan. Melalui integrasi yang mendalam antara latar belakang dan tujuan penelitian, penelitian konstruksi dan kloning gen *CelE* menjadi langkah awal yang penting menuju solusi inovatif dan berkelanjutan.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut: plasmid rekombinan pET-15b-*CelE*, primer ORF pET-*CelE*-F (Sequence Left Primer pada Gambar 1) dan pET-*CelE*-R (Sequence Right Primer pada Gambar 1), *E. coli* BL21 (DE3), Media Luria Bertani (LB) broth (HIMEDIA M1245) dan agar (HIMEDIA M1151). Selain itu, bahan-bahan lain yang digunakan adalah ampisilin 50 µg/mL (Sigma), MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, *Nuclease Free Water*, Gel Agarosa, Mix PCR (PowerPol), Marker DNA 100 bp (SMOBIO Technology, Inc.), pewarna SYBR safe (SMOBIO Technology, Inc.), Tris Borate EDTA (TBE) dan DNA *loading dye*.

Plasmid rekombinan pET-15b-*CelE* yang digunakan memiliki *Mapping* sebagai berikut: *Ruminococcus flavefaciens* cellulase (*celE*) gen GenBank: L03800.1 (Gambar 2) yang akan digunakan sebagai sumber gen selulase disisipkan pada vektor pET15b dengan sisi restriksi *NdeI* dan *XhoI* yang sebelumnya telah dilakukan optimasi kodon dengan target host *E. coli* sehingga menghasilkan DNA rekombinan pET15b-*celE* (Gene Universal, USA) pada Gambar 3.



Gambar 1. Desain Primer Left dan Right dengan target Gen *CelE* menggunakan Software Primer3Plus

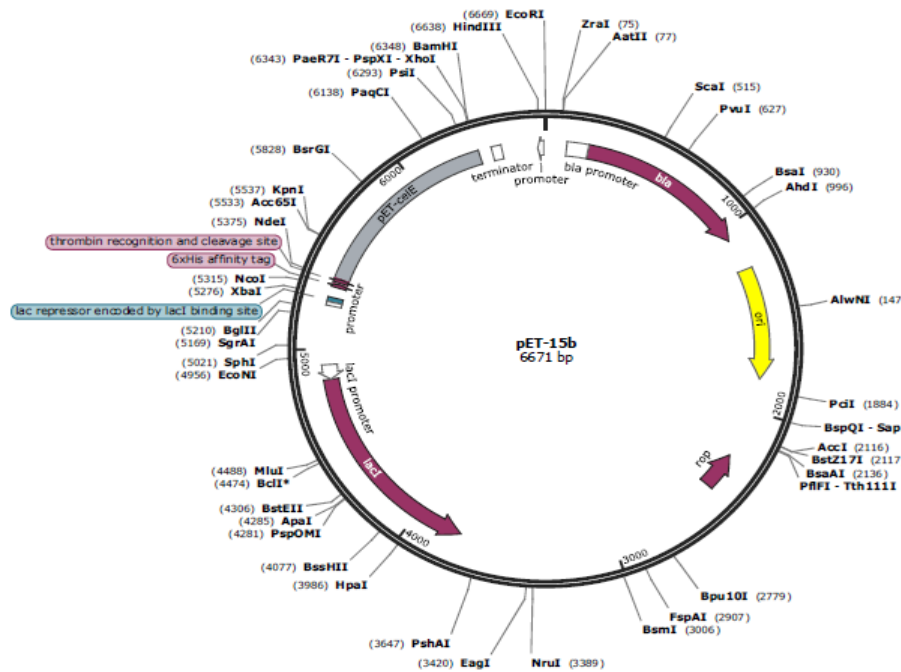
ORIGIN

```

1 agatccagag cctttttaca agtgcttgtc ttattttggat ggaaagccat atatgacaga
61 ggtcattgcg tgtgctgcag aaaaagtacg tttggaatta aagtaagtat gcttaatata
121 aagaaccgat aattcatact cataaaacgc caagagcgtt caattcatag tcagagggtga
181 tactaatgtg gatttttaaat aatgatgtat agaaaaacaa ttttgattgg agggctatta
241 tgogaaaaag aataacttca atgataacag taattttcatt gaccttatgc ggaactatag
301 gtacttatcc acacaatgct aatgcatcag cgaaagaagc gttogaggat atatctaaaa
361 gatcagagtg tactaaagta tttgataacg ataacggaac atacaccgct tattcaaata
421 ctgogccaat tcactatcct aataatgatg agtggaaaga aattgacaat acattaattg
481 aggacagcga tgattattac agaaacaaag ataactcttt caatattta attccaaagg
541 aatattcgct tggtaagaat ataaaaaatc ctgttataat gaattatgac acatttagtc
601 tgtcaacgtc aataacagac attaagatgc ctgatagacc tgaagaagaa acgttttctg
661 agggagtata tgccgatata aataatgagg tttatactac aattgataat tcagcaatag
721 ccgaaggaat gaaagcggct ttaaagaagt cagcatcaat ggcgacctat cattcgatcg
781 ttgaagatat tgatcttgat atagctgtgc ataacgcttc tgtcagcgag tcgataatca
841 tcaataagtt agaactotta coggaaacga tcacatattc tatttcgggtt gaagacgcaa
901 ttattaagaa aactgaagac aacagattgc agcttatcaa agataatgaa gcagtgctca
961 tactatcccc gtttacgac agcgattcat ctgaaaacgt caatgtcatg caggtagaat
1021 atgatcttac tgaatctgaa gaaggatatg aagttactct ctatccggca gaaacagtta
1081 atcgcatgag cagccctggt atgccattat ctttaggctc ggagtattca tacgacagac
1141 cattttcaac agtttacaat agccaggctt cgcttcatcc gtctataata ataattacat
1201 aagtagtagga aatgaagcta ataatagtta tcatactata ggatcgtttc tcgaagattt
1261 ttctttttat ggtccatacg ttagaatagt agattcgaca ttttattatt atgtaacttc
1321 cttagtagtagga aatgaagcta ataatagtta tcatactata ggatcgtttc tcgaagattt

```

Gambar 2. Urutan Nukleotida dari Gen *CelE* yang digunakan (**Bold Cokelat**)



Gambar 3. Detail Mapping DNA rekombinan pET15b-*celE*

## Metode

### ***Pelaksanaan optimasi kodon dan konstruksi plasmid rekombinan (CelE)***

Optimasi kodon dilakukan pada sekuens nukleotida gen *celE* (GenBank: L03800.1) dari *Ruminococcus flavefaciens*. Selanjutnya, gen yang telah dioptimasi dikonstruksi pada plasmid vektor pET-15b dengan menggunakan jasa dari Gene Universal Inc. Konstruksi sekuens gen-*celE* hasil optimasi dilakukan dengan menambahkan daerah restriksi *NdeI* (CATATG) di bagian *Upstream* dengan ATG sebagai *Start Codon* dan diakhiri dengan kodon TAA sebagai *Stop Codon* disertai daerah restriksi *XhoI* (CTCGAG) di bagian *Downstream*, sehingga membentuk *Double Digestion*.

### ***Persiapan sel kompeten***

Bakteri *E. coli* BL21(DE3) yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram pada 100 mL media LB broth, kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 170 RPM pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya, sejumlah 1% *pre-culture* dipindahkan ke media LB cair yang baru dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam. Setelah nilai *Optical Density* (OD) mencapai 0,4, kultur bakteri diinkubasi dalam boks berisi es selama 10 menit. Untuk pemanenan bakteri, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2.700 rcf dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan dituangkan 100 mM CaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub> sebanyak 1,6 mL pada pelet, kemudian diresuspensi. Selanjutnya, diinkubasi dalam boks yang berisi es selama 30 menit dengan sesekali digoyang-goyangkan. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2.700 rcf dengan suhu 4 °C selama 10 menit. Dituangkan sebanyak 100 mM CaCl<sub>2</sub> sebanyak 1,6 mL pada pelet untuk resuspensi. Diinkubasi kembali di dalam boks berisi es selama 20 menit. Kedua kultur dicampurkan ke dalam satu tabung falcon dan ditambahkan dengan 0,5 mL gliserol untuk disimpan dalam *freezer* (Ishak et al., 2019; Jannah & Unsunnidhal, 2019; Unsunnidhal et al., 2019, 2021b; Barokah et al., 2023; Unsunnidhal & Jannah, 2019; Unsunnidhal et al., 2021c, 2021a).

### **Transformasi sel**

Sejumlah 150  $\mu\text{L}$  sel kompeten dimasukkan ke dalam *microtube*. Gen sintetik ditambahkan 2  $\mu\text{L}$  ke dalam *microtube* yang telah berisi sel kompeten. *Microtube* diletakkan ke dalam *freezer* selama 30 menit. Setelah itu, dilakukan metode *heat shock* dengan merendam *microtube* ke dalam *water bath* dengan suhu 42  $^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik. Selanjutnya, *microtube* diletakkan kembali ke dalam boks berisi es selama 2 menit. LB broth ditambahkan 1 mL ke dalam masing-masing *microtube*, selanjutnya *microtube* diletakkan ke dalam *shaker incubator* selama 1 jam dengan suhu 37  $^{\circ}\text{C}$  dan kecepatan 170 RPM. Setelah itu, dilakukan metode *spread* kultur dengan volume bertingkat 20  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{L}$ , 80  $\mu\text{L}$ , dan 160  $\mu\text{L}$  masing-masing di atas 4 cawan petri yang berisi dengan media LB agar dan telah ditambahkan ampisilin (100  $\mu\text{L}$  dalam 100 mL LB agar). Kultur diinkubasi semalam pada inkubator dengan suhu 37  $^{\circ}\text{C}$  (Unsunnidhal et al., 2019, 2021a, 2021b; Jannah & Unsunnidhal, 2019; Unsunnidhal & Jannah, 2019; Unsunnidhal et al., 2021c; Barokah et al., 2023; Ishak et al., 2019).

### **Uji PCR koloni transforman**

Tahap persiapan dilakukan dengan mencampurkan 12,5  $\mu\text{L}$  PowerPol, 11,5  $\mu\text{L}$  *Nuclease Free Water* (NFW), 0,5  $\mu\text{L}$  Primer Left, dan 0,5  $\mu\text{L}$  Primer Right ke dalam *tube* PCR. Kemudian, koloni diambil menggunakan tusuk gigi dan disuspensikan ke dalam *tube* PCR yang berisi mix PCR. Untuk kontrol Negatif, koloni *E. coli* BL21(DE3) kosong ditambahkan sebagai pengganti koloni *E. coli* BL21(DE3) transforman. Kemudian, untuk kontrol positif, ditambahkan dengan 0,5  $\mu\text{L}$  gen sintetik. Proses uji PCR dijalankan sesuai protokol PowerPol dengan suhu pre-denaturasi sebesar 98  $^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik, suhu denaturasi sebesar 98  $^{\circ}\text{C}$  selama 10 detik, suhu annealing sebesar 54,2  $^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, suhu extension 72  $^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, 16 post-extension dengan suhu 72  $^{\circ}\text{C}$  selama 7 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil amplifikasi PCR selanjutnya dielektroforesis dengan gel agarosa 1%, proses running dilakukan dengan tegangan 100 V selama 20 menit. Untuk visualisasi hasil, gel hasil elektroforesis diletakkan di bawah sinar UV menggunakan alat UV illuminator sebagai proses verifikasi keberadaan pita DNA gen *CelE* (Unsunnidhal et al., 2019, 2021a, 2021b; Jannah & Unsunnidhal, 2019; Unsunnidhal et al., 2023; Fathurrahman et al., 2022; Unsunnidhal & Jannah, 2019; Unsunnidhal et al., 2021c; Ishak et al., 2019; Rahman et al., 2022; Barokah et al., 2023).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Optimasi Kodon**

Hasil konstruksi dan kloning gen *celE* pada plasmid pET15b dapat dilihat pada Gambar 4. Sistem ekspresi yang digunakan adalah dengan menggunakan inang *E. coli* (*Expression System: Escherichia coli*) dengan panjang gen sebanyak 963 pasang basa (*Gene Length: 963 bp*). Dari hasil optimasi tersebut diperoleh CAI sebelum adjustment adalah 0,77 dan CAI setelah adjustment adalah 0,96.

Optimasi kodon dilakukan dalam rangka merekayasa gen dengan cara mengubah kodon yang ada dengan *Synonymous Codon* untuk meningkatkan produksi protein yang dikodekannya. Optimasi kodon dalam konteks rekayasa genetika merujuk pada upaya untuk meningkatkan efisiensi ekspresi gen melalui penggunaan kodon yang optimal. Kodon adalah rangkaian tiga nukleotida pada RNA yang mengode satu asam amino dalam polipeptida atau protein. Setiap kodon koresponden dengan satu asam amino atau memberikan sinyal penghentian translasi. Dalam penelitian ini, optimasi kodon dilakukan dengan cara mengganti kodon-kodon yang kurang efisien atau jarang digunakan dengan kodon-kodon yang lebih sering digunakan dalam sistem ekspresi *E. coli* yang merupakan *Host* ekspresi dalam penelitian ini (Unsunnidhal et al., 2019; Ishak et al., 2019; Unsunnidhal et al., 2021b). Optimasi kodon dilakukan dengan memanfaatkan layanan jasa *Gene Universal Corp.* Urutan basa Gen (*CelE*) yang dioptimasi berasal dari urutan basa nukleotida gen (*GenBank: L03800.1*) dari *Ruminococcus flavefaciens* yang diperoleh dari bank gen.

#### Protein Alignment

##### Optimized Protein

```
RKRITSMITVISLTLCTGTIGTYPHNANASAKEAFEDISKRSECTKVFDNDNGTYTAYSNTAPIHYLNNDEWKEIDNTLIED  
SDDYYRNDKNSFNYPKEYSLGKNKPNVIMNYDITFSLSTSIDIKMPDRPEEETFSEGVYADINNEVYTTIDNSAIAEGM  
KAALKKSASMATYHSHVEDIDLDAVHNASVSESIINKLESLEPETITYSISVEDAIKKTEDNRLQLIKDNEAVLILSPFTISD  
SSENVNVMQVEYDLTESEEGYEVTLYPAETVNRMSSPVMPLSLGSEYSYDRPFSTVYNSQASLHPSIIIT**
```

#### DNA Alignment

##### Original DNA

```
CGAAAAAGAATAACTTCAATGATAACAGTAATTTCAATTGACCTTATGCGGAACTATAGGTACTTATCCACACAATG  
CTAATGCATCAGCGAAAAGAAGCGTTCGAGGATATATCTAAAAGATCAGAGTGTACTAAAAGTATTGATAACGATA  
ACGGAACATACACCGCTTATTCAAATACTGCGCCAAATCACTATCTTAATAATGATGAGTGGAAGAAAATGACAA  
TACATTAATTGAGGACAGCGATGATTATTACAGAAAACAAAGATAAECTTTTCAATATTTATATCCAAAGGAATAT  
TCGCTTGGTAAGAATATAAAAAATCCTGTTATAATGAATTATGACACATTTAGTCTGTCAACGTCAATAACAGACA  
TTAAGATGCTGTAGACCTGAAGAAGAAAACGTTTTCTGAGGGAGTATATGCGGATATCAATAATGAGGTTTATAC  
TACAATTGATAATTCAGCAATAGCCGAAGGAATGAAAGCGGCTTTAAAGAAAGTCAAGCATCAATGGCGACCTATCA  
TTGATCGTTGAGATATTGATCTTGATATAGCTGTGCATAACGCTTCTGTCCAGCGAGTTCGATAATCATCAATAAGT  
TAGAATCTTTACCGAAAACGATCACATATTCTATTTCGGTTGAAAGACGCAATTATTAAGAAAACCTGAAGACAACAG  
ATTGACGCTTATCAAAGATAATGAAGCAGTGTCTACTATCCCGTTTACGATCAGCGATTATCTGAAAACGTC  
AATGTCATGCAGGTAGAAATATGATCTTACTGAATCTGAAGAAGGATATGAAGTTACTCTCTATCCGGCAGAAAACAG  
TTAATCGCATGAGCAGCCCTGTTATGCCATTATCTTTAGGCTCGGAGTATTCATACGACAGACCAATTTTCAACAGTT  
TACAATAGCCAGGCTTCGCTTATCCGCTATAATAATAATTACATAATAA
```

##### Optimized DNA

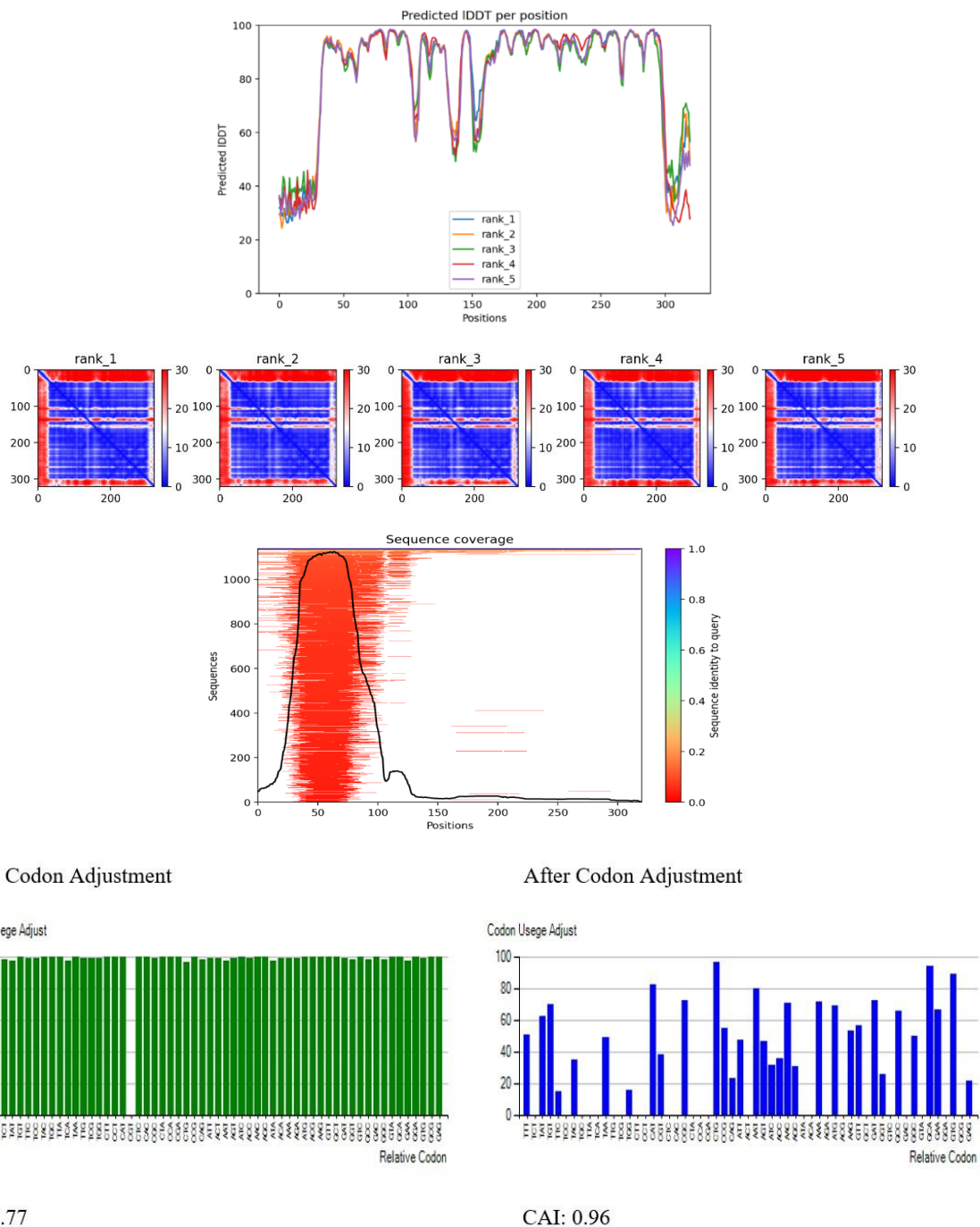
```
CGTAAACGCATTACCAGCATGATTACCGTGATTAGCCTGACCCTGTGTGGCACCATTGGCACCTATCCGCATAATG  
CCAAATGCAAGTGCAAAAGAAGCATTGGAAGATATTAGTAAAGCGCAGTGAATGTACCAAAGTGTGATAATGATA  
ACGGTACCTATACCAGCATATAGTAATACCGCCCCGATTCACTATCTGAATAATGATGAATGGAAGGAAAATCGATAA  
CACCTGATTGAAGATAGCGATGATTATTATCGCAATAAAGATAACAGCTTCAACATTTATATCCGAAAAGAATAT  
AGCCTGGGTAAAAATATTAAGAACCCTGTTATTATGAATACGATAACCTTTAGTCTGAGCACCAGCATTACCGATA  
TTAAAATGCCGGATCGTCCGGAAGAAGAAAACCTTTAGCGAAGGTGTTTATGCAGATATTAATAATGAGGTGATA  
CCACCATTGATAATAGTGCCATTGCGAAGGCATGAAAGCAGCCCTGAAAAAAGCGCAAGCATGGCCACCTATC  
ATAGCATTGTTGAAGATATTGATCTGGATATTGCAGTGCATAATGCAAGCGTTAGTGAAAGTATTATTATCAATAA  
GCTGGAGAGTCTGCCGAAAACCATTAACCTATAGTATTAGCGTGAAGATGCCATTATTAAAAAAACCAGAGATAA  
CCGCTCGCAGCTGATTAAAGATAATGAAGCAGTCTGATTCTGAGCCCGTTTACCATTAGCGATAGCAGCGAAAAT  
GTGAATGTGATGCAGGTGGAATATGATCTGACCGAAAAGCGAAGAAGGCTATGAAGTGACCCTGTATCCGGCAGAA  
ACCGTGAATCGCATGAGTAGCCGGTGTATGCCGCTGAGCCTGGCAGCGAATATAGTTATGATCGTCCGTTTACGA  
CCGTTTATAATAGCCAGGCCAGTCTGCATCCGAGCATTATTATTACCTAATAA
```

Gambar 4. Hasil Optimasi Kodon Gen (pET15b-*CelE*)

Berdasarkan data hasil optimasi kodon yang dilakukan oleh *Gene Universal Corp.* sebagaimana ditampilkan pada Gambar 4. didapatkan peningkatan nilai *Codon Adaptation Index (CAI)* dari angka 0,77 menjadi 0,96. CAI sendiri menghitung frekuensi penggunaan masing-masing kodon dan menghitung rata-rata geometrik frekuensi penggunaan di setiap protein pada target *Expression System* (Unsunnidhal et al., 2019; Ishak et al., 2019; Unsunnidhal et al., 2021b) sehingga peningkatan CAI dapat mengoptimalkan ekspresi dari gen pET-*CelE* yang mengkode enzim selulase (Gambar 5).

Plasmid DNA rekombinan pET-15b siap untuk disisipkan oleh gen *CelE* pasca optimasi kodon. Preparasi persiapan fragmen backbone tersebut dilakukan dengan restriksi enzim *NdeI* dan *XhoI*. Berdasarkan peta plasmid sirkular sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3 dapat dijelaskan bahwa total jumlah pasang basa plasmid pET15b yang sudah disisipi gen *CelE* adalah 6671 pasang basa. Dimana gen *CelE* sendiri terdiri dari 963 pasang basa. Pada peta plasmid tersebut juga dapat dijelaskan bahwa telah disisipkan 2 titik potong enzim *XhoI* dan *NdeI* (*Multiple Cloning Site*) pada kedua ujung gen target *CelE* (*Double Digestion*). Strategi *Double Digestion* dalam rekayasa genetika bertujuan untuk mempersiapkan ujung-ujung DNA yang kompatibel antara gen yang akan disisipkan dan vektor plasmid. Dua enzim restriksi dengan situs pemotongan yang berbeda telah digunakan, teknik ini memungkinkan terciptanya ujung yang saling mempermudah penggabungan gen ke dalam vektor. Selain itu, *Double Digestion* membantu mencegah rekombinasi tak terduga antara vektor dan insert, memastikan bahwa penyisipan gen berlangsung sesuai rencana tanpa perubahan tak diinginkan. Proses ini juga memberikan penanda pemotongan yang jelas, memudahkan verifikasi keberhasilan pemotongan melalui analisis gel elektroforesis. Kontrol lebih baik terhadap ujung-ujung DNA yang dihasilkan dan peningkatan efisiensi ligasi merupakan keuntungan tambahan dari strategi *double digestion* (Barokah et al., 2023; Unsunnidhal et al., 2019, 2021c; Unsunnidhal & Jannah, 2019; Jannah & Unsunnidhal, 2019; Ishak et al., 2019; Unsunnidhal et al., 2021b, 2021a).



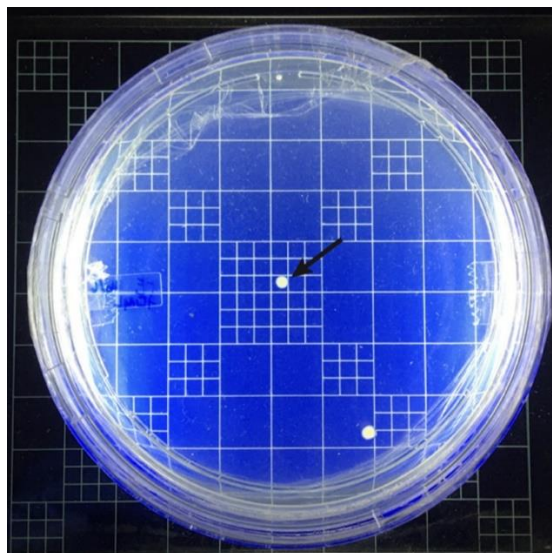


Gambar 5. Optimasi Kodon dan CAI yang Dihasilkan

**Kloning plasmid rekombinan pET-15b-CelE pada *E. coli* BL21(DE3)**

Proses transformasi dilakukan menggunakan *E. coli* BL21(DH3) sebagai sel inang transforman. Transforman selanjutnya ditumbuhkan ke dalam media LB agar yang telah ditambahkan ampisilin sebagai *Selectable Marker*. Hasil pertumbuhan koloni diamati secara morfologi sebagai indikator awal keberhasilan tahap transformasi. Koloni kompeten *E. coli* BL21(DE3) memiliki ciri morfologi yang identik dengan koloni *E. coli* BL21(DE3) *Wild Type*. Morfologi koloni kompeten *E. coli* BL21(DE3) biasanya melingkar atau membulat dengan tepi yang rata. Ciri morfologi lain yang dapat diamati adalah warna pada koloni yang tumbuh pada media agar. Secara umum, koloni kompeten *E. coli* BL21(DE3) berwarna

putih gading dan tidak tembus cahaya. Akan tetapi, warna koloni juga bisa sedikit berbeda tergantung pada media pertumbuhan yang digunakan (Tuttle et al., 2021). Pada penelitian ini, metode *Spread* digunakan untuk menginokulasikan sejumlah 40  $\mu$ L sel kompeten di atas media agar dengan ampisilin (Gambar 6). Tahap awal skrining dilakukan dengan mengamati koloni yang berhasil tumbuh dan memastikan kesesuaian koloni dengan ciri-ciri morfologi sel kompeten *E. coli* BL21(DE3), kemudian dilakukan uji PCR koloni sebagai tahap verifikasi keberadaan plasmid rekombinan pET-15b-*CelE*.



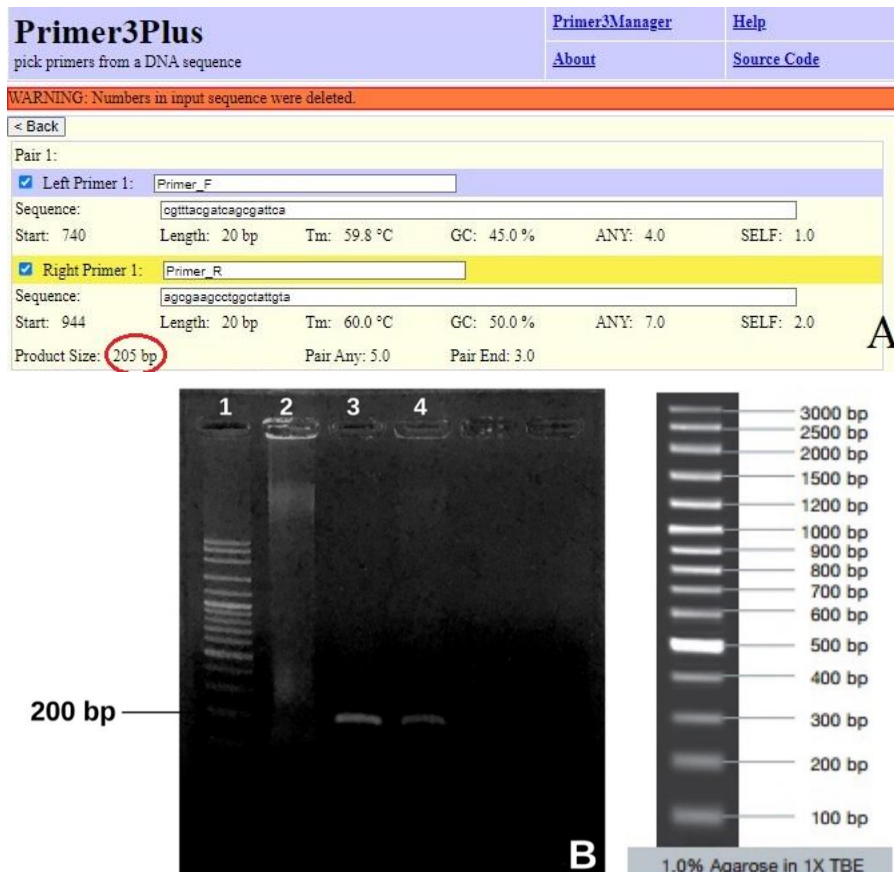
Gambar 6. Hasil transformasi plasmid rekombinan pET-15b-*CelE* pada *E. coli* BL21(DE3)

#### **Verifikasi keberadaan plasmid pET-15b-*CelE***

PCR koloni adalah metode yang umum digunakan untuk skrining transforman *E. coli*. Skrining tahap awal sangat penting untuk dilakukan, mengingat tidak semua koloni yang tumbuh sebagai hasil dari transformasi tersisipi oleh gen target. Selain itu, sisipan gen target juga memiliki kemungkinan berada dalam struktur orientasi yang tidak sesuai meskipun proses transkripsi dan translasi berjalan dengan tepat. PCR koloni merupakan teknik untuk mengidentifikasi bakteri yang mengandung gen target dengan orientasi yang sesuai cepat dan efisien (Unsunidhal et al., 2019; Jannah & Unsunidhal, 2019; Ishak et al., 2019; Unsunidhal et al., 2021b).

Hasil dari PCR koloni kemudian divisualisasikan menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa konsentrasi 1%. Kontrol negatif yang digunakan adalah koloni *E. coli* BL21(DE3) nontransforman, sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah gen sintetik *CelE*. Pita yang berpendar pada gel agarosa menunjukkan bahwa gen target *CelE* telah berhasil terinsersi ke dalam plasmid rekombinan. Hal ini dibuktikan bahwa size product dari amplicon PCR dengan yang berukuran 205 bp terletak di dekat marker dengan ukuran 200 bp (Gambar 7). Sehingga, dapat dikatakan bahwa transforman *E. coli* BL21(DE3) telah berhasil membawa plasmid rekombinan pET-15b-*CelE*.





Gambar 7. Visualisasi hasil PCR koloni. 7A) Ukuran product size sejumlah 205 bp. 7B) Pendaran pita pada elektroforesis gel agarosa (sumuran 1: marker 100 bp, sumuran 2: kontrol negatif, sumuran 3: kontrol positif, sumuran 4: sampel)

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, dapat disimpulkan bahwa konstruksi dan kloning gen *CelE* pada plasmid pET15b telah berhasil dilaksanakan dengan sukses, menunjukkan keberhasilan dalam penyisipan gen yang dioptimalkan ke dalam vektor plasmid dan pembentukan transforman *E. coli* yang membawa plasmid rekombinan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan Dana Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Sumber Dana Internal - Penerimaan Negara Bukan Pajak (PNBP) Universitas Mataram Tahun 2023.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arthur, P.K., Alvarado, L.J. & Dayie, T.K. (2011) Expression, purification and analysis of the activity of enzymes from the pentose phosphate pathway. *Protein Expression and Purification*. 76 (2), 229–237. doi:10.1016/j.pep.2010.11.008.
- Barokah, U., Unsunnidhal, L., Kristianingrum, Y.P. & Kusumawati, A. (2023) Transformation of HBcAg gene of hepatitis B virus using pEGFP-C1 vector. In: *THE 5TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY*. 2023 Mataram, AIP Publishing. p. doi:https://doi.org/10.1063/12.0020985.
- Datta, R. (2024) Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. *Heliyon*. 10 (1), e24022. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e24022.

- Fathurrahman, I., Kusumawati, A., Rahman, A., Ulviani, Y., Prihantoko, K.D. & Unsunnidhal, L. (2022) Molecular sexing in *Bos taurus* using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 976 (1). doi:10.1088/1755-1315/976/1/012002.
- Hua, D., Hendriks, W.H., Xiong, B. & Pellikaan, W.F. (2022) Starch and Cellulose Degradation in the Rumen and Applications of Metagenomics on Ruminal Microorganisms. *Animals*. 12 (21), 1–13. doi:10.3390/ani12213020.
- Ishak, J., Unsunnidhal, L., Martien, R. & Kusumawati, A. (2019) In vitro evaluation of chitosan-DNA plasmid complex encoding Jembrana disease virus Env-TM protein as a vaccine candidate. *Journal of Veterinary Research*. 63 (1), 7–16. doi:https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0018.
- Jannah, R. & Unsunnidhal, L. (2019) KONSTRUKSI DAN KLONING PLASMID PCDNA3 . 1 ( + ) DENGAN SUBGENOTIP B3 HEPATITIS B CORE ANTIGEN ( HBcAg ) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN DNA HEPATITIS B. *Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah Kesehatan*. 5 (2), 125–131.
- Rahman, A., Kusumawati, A., Budiyanto, A., Ulviani, Y., Fathurrahman, I., Prihantoko, K.D. & Unsunnidhal, L. (2022) Molecular Verification of Sex-separated Straw of Simmental Cattle ( *Bos taurus* ) by Polymerase Chain Reaction (PCR) . *Proceedings of the 9th International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP 2021)*. 18 (Istap 2021), 223–226. doi:10.2991/absr.k.220207.046.
- Tuttle, A.R., Trahan, N.D. & Son, M.S. (2021) Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols*. 1 (1), 1–13. doi:10.1002/cpz1.20.
- Unsunidhal, L., Ishak, J. & Kusumawati, A. (2019) Expression of gag-CA Gene of Jembrana Disease Virus with Cationic Liposomes and Chitosan Nanoparticle Delivery Systems as DNA Vaccine Candidates. *Tropical Life Sciences Research*. 30 (3), 15–36. doi:https://doi.org/10.21315/tlsr2019.30.3.2.
- Unsunidhal, L. & Jannah, R. (2019) POTENTIAL OF CATIONIC LIPOSOMES AND CHITOSAN NANOPARTICLES FOR DELIVERY DNA VACCINE MODEL NTC8685-EGFP. *Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah Kesehatan*. 5 (2), 120–124.
- Unsunidhal, L., Jannah, R., Haris, A., Supinganto, A. & Kusumawati, A. (2021a) Potential of Nanoparticles Chitosan for Delivery pcDNA3.1-SB3- HBcAg. *BIO Web of Conferences*. 41 (07003), 1–6.
- Unsunidhal, L., Perdhana, F.F., Utama, Q.D. & Jannah, R. (2023) Identifikasi Kandungan Daging Sapi Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) Pada Pedagang Bakso Tusuk Keliling Di Lingkungan Kota Mataram, Nusa Tenggara Barat. *Pro Food*. 9 (1), 76–81. doi:10.29303/profood.v9i1.312.
- Unsunidhal, L., Wasito, R., Nugraha Setyawan, E.M., Warsani, Z. & Kusumawati, A. (2021b) Potential of polylactic-co-glycolic acid (PLGA) for delivery Jembrana disease DNA vaccine Model (pEGFP-C1-tat). *Journal of Veterinary Science*. 22 (6), 1–15. doi:10.4142/jvs.2021.22.e76.
- Unsunidhal, L., Wasito, R., Setyawan, E.M.N. & Kusumawati, A. (2021c) Potential of Nanoparticles Chitosan for Delivery pcDNA3.1-tat. *BIO Web of Conferences*. 41 (07004), 1–6.