

**SUBKLONING GEN  $\alpha$ -L-ARABINOFURANOSIDASE (*abfA*)  
DALAM VEKTOR EKSPRESI pYES2**

**I Nengah Wirajana<sup>1)</sup>, Eddy Bagus Wasito<sup>2)</sup>,  
H.M. Soekry Erfan Kusuma<sup>2)</sup>, dan Ni Nyoman Tri Puspaningsih<sup>3)</sup>**

<sup>1)</sup>*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran*

<sup>2)</sup>*Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya*

<sup>3)</sup>*Jurusan Kimia Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya*

**ABSTRAK**

Gen pengkode  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*abfA*) yang telah dikloning dalam *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 rekombinan disubkloning ke sistem ragi *Saccharomyces cerevisiae*. Subkloning gen *abfA* ke dalam *S. cerevisiae* bertujuan untuk ekspresi enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AbfA) termotabil dalam sel inang yang sering diistilahkan sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS), sehingga enzim ini dapat diaplikasikan lebih luas seperti dalam industri makanan dan minuman. Gen *abfA* disubkloning dengan cara amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dari templet plasmid pTP510. Sepasang gen primer pFSacI-Af (*forward*) dan pXhoI-Af (*reverse*) yang merupakan hasil disain dari penelitian ini digunakan untuk amplifikasi. Kondisi PCR dilakukan sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit; siklus PCR 30 kali yang terdiri dari denaturasi (94°C selama 1 menit), *annealing* (55°C selama 30 detik), dan polimerisasi/ekstensi 72°C selama 2 menit; serta ekstensi akhir 72°C selama 7 menit. Gen *abfA* hasil amplifikasi disisipkan di antara promotor *GALI* dan terminator *CYT1* dalam vektor ekspresi ragi pYES2. Hasil ligasi ini ditransformasikan ke dalam sel inang *E. coli* TOP10. Analisis restriksi plasmid rekombinan dari hasil konstruksi ini, yang dinamakan plasmid pY-Af, menunjukkan ukuran yang sesuai, sekitar 7,4 kb, yang sudah sesuai dengan penjumlahan ukuran plasmid induk (5,9 kb) dan fragmen DNA sisipan (1,5 kb).

Kata kunci :  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; *Saccharomyces cerevisiae*; subkloning, vektor ekspresi; *Polymerase Chain Reaction*

**ABSTRACT**

A Gene encoding  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*abfA*) that had been cloned into recombinant *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 was subcloned into *Saccharomyces cerevisiae* yeast system. The aim of subcloning of *abfA* gene into *S. cerevisiae* is to express the thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AbfA) enzyme in the host that is often termed as *Generally Recognized As Safe* (GRAS), so that this enzyme earn the broader application like in food and beverage industries. The gene of *abfA* was subcloned by the amplification of *Polymerase Chain Reaction* (PCR) from plasmid pTP510 templat. A pair of primers, pFSacI-Af (*forward*) and pXhoI-Af (*reverse*) from designed this research was used for the amplification. The PCR condition was performed as follows : beginning denaturation at 94°C for 5 min; PCR cycle 30 times that consisted of denaturation (94°C for 1 min), *annealing* (55°C for 30 s), and polymerization/extension at 72°C for 2 min; and than final extension at 72°C for 7 min. The *abfA* gene, resulted was inserted between *GALI* promoter and *CYT1* terminator in the pYES2 expression vector. This ligation product was transformed into *E. coli* TOP10 host. Restriction analysis of recombinant plasmid from this construction, the designated as plasmid pY-Af, showed the expected size, about 7,4 kb, which was the summation of sizes of parental plasmid ( 5,9 kb) and fragment of DNA insert (1,5 kb).

Keywords :  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; *Saccharomyces cerevisiae*; subcloning, exspression vector; *Polymerase Chain Reaction*

## PENDAHULUAN

Teknologi enzim mempunyai prospek yang cerah untuk pengembangan teknologi bioproses yang ramah lingkungan dalam konversi skala besar limbah pertanian seperti hemiselulosa menjadi produk yang bermanfaat. Komponen utama hemiselulosa umumnya adalah xilan, manan, arabinan, dan arabinogalaktan. Pemecahan sempurna pada polimer hemiselulosa tersebut, khususnya xilan, arabinan, dan arabinogalaktan memerlukan aktivitas sinergis dari beberapa enzim hemiselulase, salah satunya adalah  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. (Saha, 2003; Numan & Bhosle, 2006).

Enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) menghidrolisis rantai terminal dan samping dari arabinofuranosida dalam arabinan (ikatan  $\alpha$ -1,5-arabinofuranosida), juga arabinosil dalam arabinogalaktan dan arabinosilan (Kaji, 1984; Taylor *et al.*, 2006). Penelitian tentang  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ini diperlukan karena berperan penting sebagai enzim kunci pendegradasi xilan dalam hemiselulosa. Enzim ini bersama enzim xilanolitik yang lain semakin menarik diteliti dalam tahun belakangan ini karena aplikasinya dalam konversi berbagai substrat hemiselulosa menjadi monomernya yang dapat difermentasi lebih lanjut menjadi produk yang bermanfaat, seperti etanol, xilitol, 2,3-butanediol, dan produk-produk fermentasi lainnya (Saha, 2000).  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase juga digunakan dalam produksi arabinosa sebagai *antiglycemic agent*; produksi senyawa antimetastatik dan antikarsinogenik; peningkatan kualitas roti, aroma anggur (*wine*), penjernihan jus buah, dan pakan ternak; *biobleaching* dari pulp dan kertas untuk mengurangi penggunaan senyawa kimia klorin; dan sintesis oligosakarida (Numan & Bhosle, 2006).

Enzim yang bersifat termostabil lebih sesuai untuk proses industri, karena tingginya temperatur yang diperlukan, dan kelarutan dari substrat yang mudah dicapai pada suhu tinggi (Debeche *et al.*, 2000; Birgisson *et al.*, 2004). Gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase termostabil telah diisolasi dari berbagai mikroba termofilik dan diklon sebagian besar di sel inang *Escherichia coli*. Gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari *Geobacillus*

*caldoxylylolyticus* TK4 (*AbfATK4*) telah diklon di *E. coli* dan enzimnya aktif pada rentang pH 5 – 10 dan suhu 40–85°C. Enzim ini bekerja optimum pada pH 6,0 dan temperatur 75-80°C (Canakci *et al.*, 2007). Gen *AbfAC26Sari*, penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari, telah diklon di *E. coli*. Karakteristik enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase rekombinan yang diproduksi di *E. coli* BL21 menunjukkan optimum pada pH 5,5 dan suhu 65°C (Canakci *et al.*, 2008).

Gen  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 termofilik telah berhasil diklon ke plasmid pTP510 dalam *E. coli* DH5 $\alpha$ . Enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari *G. thermoleovorans* IT-08 maupun yang terekspresi intraseluler di *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 rekombinan menunjukkan kesamaan sifat, yang memiliki aktivitas optimum pada temperatur 70°C dan stabilitas pH pada kisaran 5-8. Namun perbedaannya pada pH optimum, enzim yang dihasilkan dari *G. thermoleovorans* IT-08 memiliki pH optimum 7, sedangkan yang diproduksi dari *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 mempunyai pH optimum 6. Gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ini juga telah berhasil diklon dan diekspresi tinggi dalam sistem pET101/D-TOPO di *E. coli*. Dalam sistem ekspresi ini  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase juga terekspresi intraseluler dan memiliki karakteristik yang sama seperti yang terekspresi di *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 (Puspaningsih *et al.*, 2004; Puspaningsih *et al.*, 2005).

Kelemahan ekspresi di sel inang *E. coli* adalah sel inang ini tidak merupakan mikroba unggulan yang aman untuk produksi skala komersial. Pada mulanya, produksi komersial protein-protein rekombinan telah diperoleh dengan menggunakan *E. coli* sebagai sel inang. Namun ekspresi pada sel inang ini ternyata memiliki kelemahan. Secara umum organisme prokariot ini mempunyai pirogen-pirogen dinding sel yang toksik (endotoksin), sehingga protein rekombinan yang dihasilkan akan terkontaminasi dan menimbulkan keraguan dalam aplikasi medis, walaupun teknologi pemurnian protein sudah semakin canggih. Sel inang yang dianggap paling aman untuk

keperluan komersial adalah ragi *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* telah dimanfaatkan selama berabad-abad dalam produksi makanan dan minuman. Ragi ini telah menjadi mikroorganisme yang secara umum dikenal aman atau sering diistilahkan sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS). (Domínguez *et al.*, 1998; Glick and Pasternak, 2003; López-López *et al.*, 2010). Ekspresi protein rekombinan atau heterolog dalam *S. cerevisiae* yang menghasilkan glikosilasi enzim dapat mempengaruhi termostabilitasnya. Efek glikosilasi terhadap termostabilitas beberapa enzim telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Enzim pitase rekombinan yang diproduksi dalam *S. cerevisiae* memiliki termostabilitas lebih besar daripada pitase *wild type* dan yang diproduksi dalam *E. coli* (Han *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006). Namun aktivitas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dan  $\beta$ -xilosidase dari *Trichoderma reesei* yang diproduksi dalam *S. cerevisiae* tidak secara signifikan berpengaruh. Walaupun demikian, keuntungannya adalah sel inang *S. cerevisiae* tidak menghasilkan aktivitas hidrolase terhadap substrat hemiselulosa, sehingga penggunaannya sebagai sel inang untuk ekspresi gen-gen hidrolase baru meningkat akhir-akhir ini (Clark *et al.*, 1996).

Penelitian tentang bagaimana ekspresi enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AbfA) termostabil dari *G. thermoleovorans* IT-08 di *S. cerevisiae* belum pernah dilakukan. Ekspresi enzim AbfA di *S. cerevisiae* dapat terjadi apabila gen *abfA* telah masuk dalam sistem genetika sel inang ragi ini dan tersisip diantara promotor dan terminator transkripsi yang sesuai. Salah satu teknik yang dapat digunakan adalah dengan menyisipkan gen *abfA* di antara promotor *GALI* dan terminator *CYT1* dalam vektor ekspresi ragi pYES2.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Semua bahan kimia yang digunakan mempunyai kualitas pro-analisis (p.a) dan biologi molekuler, kecuali apabila disebutkan lain. Bakteri *E. coli* galur DH5 $\alpha$  pembawa DNA plasmid pTP510 diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya (Puspaningsih, 2004). Sel inang *E.*

*coli* galur Top10 yang digunakan untuk perbanyakan plasmid rekombinan dan plasmid pYES2 diperoleh atas kebaikan Prof. Kazuo Sakka dan Asct. Prof. Tetsuya Kimura dari *Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Bioresources, Mie University, Jepang*. Pertumbuhan sel inang *E. coli* dilakukan pada media Luria Bertani (LB) cair dengan komposisi : *bacto-triptone* 1% (b/v), *yeast extract* 0,5% (b/v), dan NaCL 1% (b/v). Media LB padat memiliki komposisi yang sama seperti LB cair dengan penambahan *bacto-agar* 2% (b/v). Semua transforman *E. coli*, baik yang membawa plasmid pTP510, pYES2, dan plasmid rekombinannya ditumbuhkan dalam media LB dengan penambahan ampisilin (100  $\mu$ g/mL).

### Peralatan

Peralatan gelas dan non-gelas serta instrumen dalam penelitian ini adalah yang umum digunakan di laboratorium biokimia dan biologi molekuler. Instrumen penelitian terdiri dari peralatan Spektrofotometer uv-vis, pH-meter, timbangan analitik, *thermocycle*, inkubator, penangas air, sentrifuga, microsentrifuga, *laminar air flow cabinet*, *shaker*, vorteks, *autoclave*, peralatan elektroforesis DNA, dan lampu UV.

### Cara Kerja

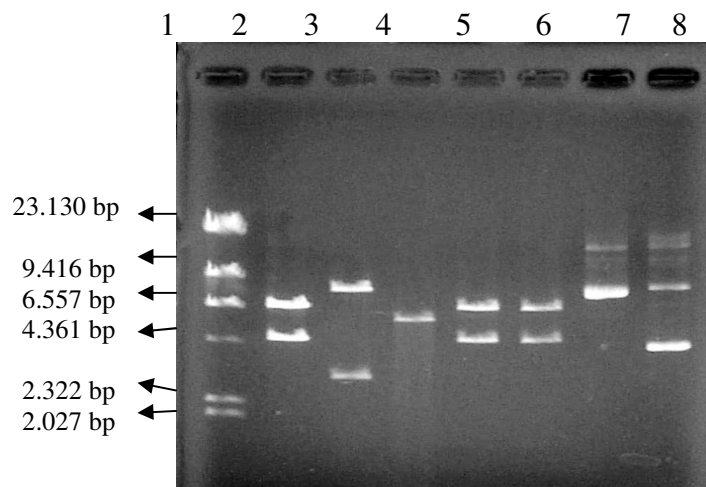
Penelitian ini dirancang dengan mengkonstruksi vektor ekspresi yang menggunakan vektor ekspresi pYES2 sebagai induk vektor. Plasmid pTP510 digunakan sebagai cetakan atau templet DNA untuk amplifikasi gen *abfA* dengan teknik PCR. Konstruksi plasmid rekombinan dilakukan dengan menyisipkan fragmen DNA pengkode gen *abfA* ke vektor ekspresi pYES2, yang meliputi sebelas tahap pekerjaan. Pertama, perbanyakan plasmid pTP510 dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  dan pYES2 dalam *E. coli* TOP10 dengan cara kultivasi dalam media LB ampisilin. Kedua, isolasi dan pemurnian plasmid dari *E. coli* DH5 $\alpha$  dan pYES2 dari *E. coli* TOP10. Ketiga, analisis restriksi plasmid pTP510 dan pYES2 dengan cara pemotongan dengan enzim restriksi endonuklease dan ditentukan ukurannya dengan elektroforesis agarosa. Keempat, desain sepasang primer pFSacI-Af (*forward*) dan pXhoI-Af

(reverse) dengan bantuan program *Clone Manager* dan selanjutnya sepasang primer ini digunakan untuk amplifikasi gen *abfA* dari cetakan DNA plasmid pTP510 dengan teknik PCR. Kelima, ampikon atau hasil PCR dielektroforesis agarosa dan pemurnian fragmen DNA gen *abfA* (berukuran sekitar 1,5 kb) dari gel agarosa. Keenam, pemotongan fragmen DNA gen *abfA* dan plasmid pYES2 dengan enzim restriksi endonuklease *SacI* dan *XhoI*. Ketujuh, elektroforesis dan pemurnian hasil pemotongan fragmen DNA gen *abfA* dan plasmid pYES2. Kedelapan, fragmen DNA gen *abfA* dan plasmid pYES2 yang telah dipotong dengan enzim restriksi endonuklease *SacI* dan *XhoI* diligasi atau disambung dengan enzim T4 ligase. Kesembilan, transformasi hasil ligasi ke dalam sel inang *E. coli* TOP10. Kesepuluh, kultivasi transforman *E. coli* TOP10, isolasi dan pemurnian plasmid rekombinan atau plasmid hasil ligasi. Kesebelas, analisis restriksi plasmid rekombinan dengan cara pemotongan DNA ini dengan enzim restriksi endonuklease dan dielektroforesis agarose 1% (b/v) untuk diketahui ukurannya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Plasmid pTP510 dan pYES2 diperbanyak dalam sel inangnya masing-masing, berturut-turut dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  dan *E. coli* TOP10. Hasil isolasi plasmid dan pemotongan dengan enzim restriksi *SacI* dan *XhoI* dilihat menggunakan elektroforesis gel agarosa (Gambar 1).

Dari elektroforegram di atas (Gambar 1) menunjukkan bahwa analisis restriksi menggunakan enzim restriksi *SacI* terhadap pTP510 menghasilkan dua fragmen DNA berukuran sekitar 8.300 pb dan 3.100 pb. Pemotongan dengan enzim *XhoI* menghasilkan dua fragmen DNA berukuran sekitar 6.500 pb dan 4.500 pb. Hasil ini sesuai dengan ukuran plasmid pTP510, yaitu sekitar 11.400 pb (lihat peta restriksi plasmid pTP510 pada Gambar 2.2). Plasmid pYES2 yang dipotong dengan *XhoI* memberikan satu pita yang terlihat dalam elektroforegram di atas dengan ukuran sekitar 5.900 pb; yang sudah sesuai dengan ukuran plasmid pYES2 (5.900 pb).



Gambar 1. Elektroforegram DNA plasmid pTP510 dan pYES2 serta hasil pemotongan dengan *SacI* dan *XhoI*. (1) DNA penanda  $\lambda$ -*HindIII*; (2), (5), dan (6) pTP510 dipotong dengan *XhoI*; (3) pTP510 dipotong dengan *SacI*, (4) pYES2 dipotong dengan *XhoI*; (7) pTP510; (8). pYES2.

Amplifikasi gen dengan cara PCR membutuhkan sepasang primer yang sesuai. Sepasang primer (primer *forward* dan *reverse*) didesain berdasarkan urutan nukleotida gen yang akan diamplifikasi dan urutan sisi pengenalan enzim restriksi yang terdapat pada *multiple cloning site* (MCS) dari vektor ekspresi yang digunakan (Sambrook & Russel, 2001). Setelah dipelajari, urutan sisi pengenalan enzim restriksi yang sesuai dengan MCS pada vektor pYES2 dan tidak ada dalam gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase *G. thermoleovorans* IT-08 (*abfA*) yang tersisip dalam plasmid pTP510 adalah enzim *SacI* dan *XhoI*. Maka selanjutnya primer *forward* didesain mengandung urutan sisi pengenalan *SacI* pada ujung 5', dan pada ujung 3' didesain sesuai dengan urutan nukleotida ujung 5' gen *abfA* yang diamplifikasi (mulai dari kodon start 5'-ATG-3'). Primer *reverse* didesain mengandung urutan sisi pengenalan *XhoI* pada

ujung 5', dan pada ujung 3' primer didesain sesuai dengan urutan basa komplementernya dari ujung 3' gen *abfA* yang diamplifikasi (mulai diambil dari komplemen kodon stop 5'-TTA-3').

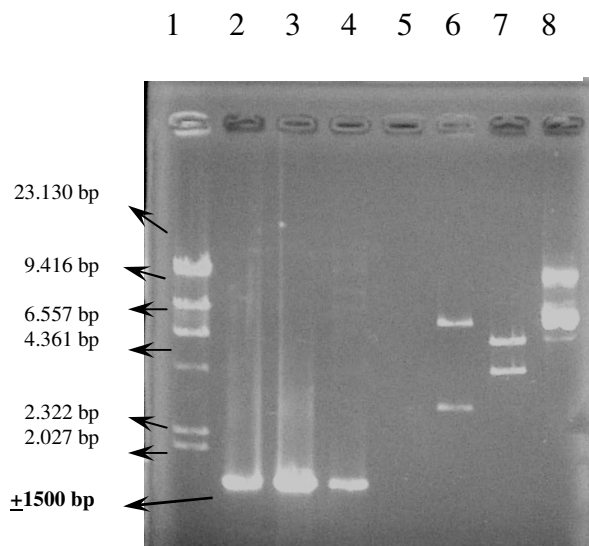
Program *Clone Manager* 6 digunakan untuk membantu perancangan sepasang primer berdasarkan ketentuan yang telah dijelaskan di atas. Hasil desain dan analisis campuran sepasang primer dengan cetakan DNA yang menggunakan simulasi dalam program tersebut menghasilkan sepasang primer pFSacI-Af (*forward*) dan pRXhoI-Af (*reverse*). Urutan basa nukleotida kedua sepasang primer ini dapat dilihat pada Tabel 1. Basa nukleotida yang dicetak tebal dalam primer pFSacI-Af merupakan sisi pengenalan *SacI* (GAGCTC), sedangkan basa yang dicetak tebal dalam primer pRXhoI-Af merupakan sisi pengenalan *XhoI* (CTCGAG).

Tabel 1. Hasil desain primer pFSacI-Af dan pRXhoI-Af untuk amplifikasi PCR gen *abfA* dari plasmid pTP510 ke vektor ekspresi pYES2

Nama	Urutan basa nukleotida	Panjang primer	Panjang ampikon
pFSacI-Af	5'-GCGAGCTCATGGCTACAAAAAAGCAACC-3'	29 bp	1525 bp
pRXhoI-Af	5'-GCCTCGAGTTATCGTTTTCTAAACGAATCAC-3'	32 bp	

Kondisi PCR dioptimasi sesuai saran yang diberikan dari program *Clone Manager* 6 pada bagian simulasi analisis campuran primer dan cetakan DNA. Kondisi PCR yang dilakukan adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C, 5 menit; siklus PCR 30 kali yang terdiri dari denaturasi (94°C, 1 menit), *annealing* (55°C, 30 detik), dan polimerisasi/ekstensi 72°C, 2

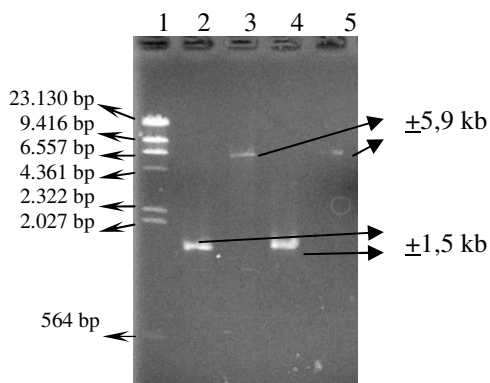
menit; serta ekstensi akhir 72°C, 7 menit. Ampikon yang dihasilkan dalam proses PCR ini dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa (Gambar 2). Hasil elektroforesis agarosa dari ampikon yang diperoleh menunjukkan telah diperoleh ampikon gen *abfA* berukuran sekitar  $\pm 1500$  bp.



Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi PCR pTP510 dengan primer pFSacI-Af dan pRXhoI-Af. (1) DNA penanda  $\lambda$  HindIII; (2), (3), dan (4) amplicon gen *abfA*; (5) Kontrol negatif; (6) pTP510 dipotong *SacI*; (7) pTP510 dipotong *XhoI*; (8) pTP510 *uncut*.

Amplicon gen *abfA* (yang telah dimurnikan) dan vektor pYES2 masing-masing dipotong dengan enzim restriksi yang sama, yaitu *SacI* dan *XhoI*. Pemotongan setiap DNA, baik vektor maupun amplicon, dilakukan secara bersamaan dengan dua enzim restriksi sekaligus

dalam satu tabung Ependorf (*double digest*). Enzim restriksi dinonaktifkan dengan pemanasan 65°C selama 20 menit. Hasil pemotongan dengan kedua enzim tersebut dilihat dengan elektroforesis gel agarosa (Gambar 3).

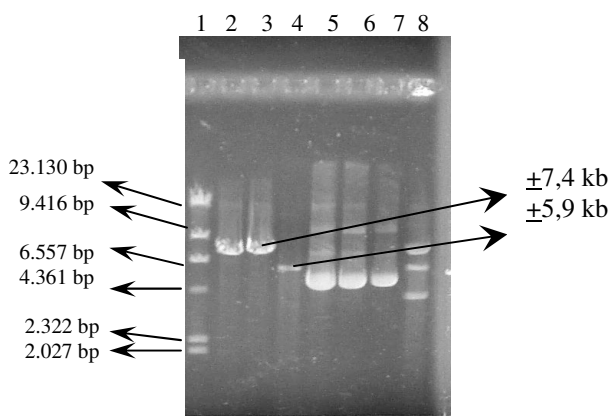


Gambar 3. Elektroforegram hasil pemotongan amplicon gen *abfA* dan vektor pYES2 dengan *SacI* & *XhoI*. (1) DNA penanda  $\lambda$  HindIII; (2) dan (4) amplicon gen *abfA* yang telah dipotong *SacI* dan *XhoI*; (3) dan (5) vektor pYES2 yang telah dipotong *SacI* dan *XhoI*.

Fragmen gen *abfA* dan vektor pYES yang telah dipotong dengan kedua enzim *SacI* dan *XhoI* selanjutnya dimurnikan dari gel dengan *gel clean kit* (Qiagen). Fragmen DNA dan vektor hasil pemurnian tersebut diligasi dengan enzim T4 ligase (TaKaRa) yang diinkubasi pada suhu 16°C selama semalam. Selanjutnya hasil ligasi ini segera ditransformasi ke sel kompeten *E. coli*

TOP10 yang telah disiapkan sebelumnya dengan metode kalsium klorida (CaCl<sub>2</sub>).

Transforman yang tumbuh di media LB ampisilin diisolasi dan dimurnikan DNA plasmidnya dengan cara miniprep untuk dilakukan analisis restriksi. Hasil analisis restriksi dari DNA plasmid transforman dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Elektroforegram DNA plasmid transforman dan pYES2. (1) DNA penanda  $\lambda$  *HindIII*; (2). transforman (a) dipotong dengan *SacI*; (3). transforman b dipotong *SacI*; (4). pYES2 dipotong *SacI*; (5), (6), dan (7) transforman a, b, dan c *uncut*, (8) pYES2 *uncut*.

Berdasarkan data elektroforegram pada Gambar 3.B. di atas dapat disimpulkan bahwa transforman *E. coli* TOP10 telah membawa DNA plasmid pYES2 yang terinsersi gen *abfA*. DNA plasmid hasil isolasi dari transforman yang telah dipotong *SacI* menunjukkan ukurannya sekitar 7,4 kb. Dari gambar peta plasmid pYES2 telah diketahui bahwa ukurannya adalah 5,9 kb, sedangkan ukuran gen *abfA* yang diamplifikasi dari plasmid pTP510 sekitar 1,5 kb. DNA plasmid hasil ligasi ini selanjutnya dinamakan plasmid pY-Af.

Analisis restriksi terhadap plasmid baru pY-Af dilakukan untuk mengetahui apakah fragmen gen *abfA* sudah tersisip ke dalam MCS vektor pYES2. Gambar 3.B. telah menunjukkan bahwa ukuran plasmid pY-Af sekitar 7,4 kb. Hasil ini telah sesuai dengan penjumlahan ukuran kedua DNA fragmen gen *abfA* dan pYES2.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Konstruksi plasmid pY-Af yang membawa fragmen gen  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase yang tersisip ke dalam MCS vektor pYES2 telah berhasil dilakukan. Plasmid rekombinan ini mempunyai ukuran sekitar 7,4 kb. Gen  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dalam plasmid pY-Af ini berada di antara promotor *GALI* dan terminator *CYT1* sebagai salah satu syarat gen ini nantinya dapat diekspresikan dalam sistem ragi *S. cerevisiae*.

### Saran

Ekspresi gen  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dalam sistem plasmid pY-Af di ragi *S. cerevisiae* perlu dilakukan untuk mengetahui apakah enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dapat diproduksi di sel inang ini. Analisis signal peptida pada ujung N-terminal dari sekuen atau urutan basa nukleotida gen  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase juga perlu

dilakukan untuk mengetahui apakah enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase merupakan enzim ekstraseluler bagi sel inang ragi ragi *S. cerevisiae*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Prof Kazuo Sakka, PhD dan Asct Prof Tetsuya Kimura dari *Mie University*, Jepang, yang telah memberikan fasilitas penelitian program *Sandwich DIKTI* 2008. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ketua Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga dan Ketua *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin dan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Birgisson, H., Fridjonsson, O., Bahrani-Mougeot, F. K., Hreggvidsson, G. O., Kristjansson, J. K., and Mattiasson, B., 2004, A new thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from a novel thermophilic bacterium, *Biotechnol Lett*, 26 : 1347-1351
- Canakci, S., Belduz, A. O., Saha, B. C., Yasar, A., Ayaz, F. A., and Yayli, N., 2007, Purification and characterization of a highly thermostable  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoxylyolyticus* TK4, *Appl Microbiol Biotechnol*, 75 : 813-820
- Canakci, S., Kacagan, M., Inan, K., Belduz, A. O., and Saha, B. C., 2008, Cloning, purification, and characterization of a thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari, *Appl Microbiol Biotechnol*, 81 : 61-68
- Clark, E. M., Tenhanen, M., Setala, T. N., and Penttila, M., 1996, Cloning of Genes Encoding  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase and b-Xylosidase from *Trichoderma reesei* by Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl & Environ Microbiol*, 62 : 3840-3846
- Debeche T., Cummings N., Connerton I., Debeire P., and O'Donohue MJ., 2000, Genetic and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*, *Appl Environ Microbiol*, 66 (4) : 1734-1736
- Dominguez, A., Ferminan E., Sanchez M., Gonzalez, F. J., Campo, F. M. P., Garcia, S., Herrero, A. B., Vicente, A. S., Cabello, J., Prado, M., Iglesias, F. J., Choupina, A., Burguillo, F. J., Lago, L. F., Lopez, M. C., 1998, Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production, *Internatl Microbiol*, 1 : 131-142
- Glick, B. R. and Pasternak J. J., 2003, *Molecular Biotechnology*, 3rd, ASM Press Washington, D. C., pp 163-171
- Han, Y., Wilson, D. B., and Lei, X. G., 1999, Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl & Environ Microbiol* 65 (5) : 1915-1918
- Kaji, A., 1984, L-Arabinosidases. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 42, Academic Press, Inc, USA, pp 398-407
- Kim, Y. O, Kim, H. W., Lee, J. H, Kim, K. K., & Lee, S. J., 2006, Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol Lett*, 28 : 33-38
- López-López, O., Fucinos, P., Pastrana, L., Rúa, M. L., Cerdán, M. E., and González-Siso, M. I., 2010, Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 145 : 226-232
- Margolles, A. and Gavilan, C. G. R., 2003, Purification and Functional Characterization of a Novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667, *Appl. Environ Microbiol* , 69 (9) : 5096-5103
- Numan, M. T. & Bhosle, N. B., 2006,  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase: the potential



- applications in biotechnology, *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 33 : 247-260
- Puspaningsih, N. N. T., 2004, Pencirian Enzim Xilanolitik dan Kloning Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08, *Disertasi*, Institut Pertanian Bogor
- Puspaningsih, N. N. T., Suwanto, A., Suhartono, M. T., Achmadi, S. S., Kimura, T., and Ohmiya, K., 2005, Cloning of Clustered Gene for Thermostable Xylan-Degrading Enzymes,  $\beta$ -Xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Bacillus thermoleovorans* IT-08, *Int. Workshop on Biorefinery and Bioenergy, Kyoto 9-10 February 2005*
- Saha, B. C., 2000,  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, *Biotechnol Advn*, 18 : 403-423
- Saha, B. C., 2003, Hemicellulose bioconversion, *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 30 : 279-291
- Sambrook, J. and Russel, D. W., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA
- Taylor, E. J., Smith, N. L., Turkenburg, J. P., D'Souza, S., Gilbert, H. J., and Davies, G. J., 2006, Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*, *Biochem J.*, 395 : 31-37