

**Pemotongan dan Menyambung DNA dalam Kloning Gen,
Studi pada Kloning Gen Prolidase dari Bakteri Asam Laktat**
*DNA Restriction and Ligation in Gene Cloning, a Study Case in Prolidase Gene
Cloning from Lactic Acid Bacteria*

Ketut Suriasih*

Fakultas Peternakan, Universitas Udayana,
Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Kode pos : 80361; Telp/Fax : (0361) 702771

Diterima 27 Maret 2015 / Disetujui 10 April 2015

ABSTRACT

Gene cloning in lactic acid bacteria (LAB) is crucial in term to increase their ability to hydrolyze milk protein such as proline. This proline could be hydrolyzed when the LAB undergone cloning on their genome coding the enzyme. The cloning process need technology to separate/isolate the gene capable of proline hydrolyze. Isolation of DNA containing prolidase gene, need DNA genome cutting. After isolation of DNA gene coding prolidase, it is then recombined with other bacterial DNA to obtained recombinant gene. The process need ligase. In gene cloning, knowledge of cutting and joining the DNA should be understood.

The enzyme take the role in cutting and joining the DNA were restriction endonuclease and ligase. The restriction enzyme function (1) in inserting a gen into plasmid contained in a vector during gene cloning, and gene expression experiment, and (2) to identify the gene. It is important that the researcher already have standardized sequenced gene as control. The DNA contained target gene was cut using some restriction enzyme, then the gene was arrayed in electrophoresis gel using southern blot technique. DNA sequence was elucidated by addition of ethidium bromide. To identify/characterize the isolated gene, this DNA sequence was encountered the control DNA.

Key words: *cutting, joining, DNA, gene, cloning*

*Korespondensi Penulis:

Email: ketutsuriasih@gmail.com

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat membutuhkan sejumlah asam amino disamping energi dari hidrolisis karbohidrat dan faktor pertumbuhan lainnya untuk dapat tumbuh dengan optimal. Jumlah asam amino yang terdapat dalam susu hanya memenuhi 20% dari kebutuhan tersebut (Thomas dan Mills, 1981, dalam Suriasih 1995). Oleh karena itu agar dapat tumbuh dengan baik bakteri asam laktat harus mampu menghidrolisis protein dari dari susu dimana dia tumbuh. Untuk mencapai tujuan tersebut bakteri asam laktat memiliki enzim ekstraseluler proteinase dan intraseluler peptidase yang menghidrolisis protein susu menjadi senyawa peptida dan selanjutnya senyawa peptida ini dihidrolisis menjadi asam amino yang dimanfaatkan untuk membangun tubuh dari bakteri tersebut (Axelson, 1998).

Bakteri asam laktat banyak dimanfaatkan sebagai kultur bakteri untuk starter pembuatan produk-produk hasil fermentasi susu, misalnya : yoghurt, yakult, kefir, krim asam dan keju. Dalam proses pembuatan keju, susu segar dipasteurisasi pada suhu 65°C selama 30 menit, kemudian didinginkan sampai suhu 43°C . Susu kemudian diinokulasi dengan bakteri asam laktat sebanyak 3-5 % (v/v), diperam selama 3-5 jam pada suhu 43°C atau selama 18-20 jam pada suhu ruang untuk pembuatan yoghurt dan kefir (Rahman *et al.* 1995). Selama proses pemeraman ini bakteri asam laktat akan menghidrolisis laktosa (gula susu) dan menghasilkan energi untuk pertumbuhan. Disamping itu juga

dihasilkan asam laktat yang menyebabkan pH susu turun sehingga protein susu menjendal sehingga terbentuk 'curd' atau tahu susu.

Dalam pertumbuhannya pada proses fermentasi tersebut bakteri asam laktat membutuhkan asam amino untuk membangun komponen-komponen seluler, dan ini diperoleh dari degradasi protein susu. Selain menghasilkan asam amino degradasi protein susu oleh bakteri asam laktat juga menghasilkan senyawa pembentuk aroma dan flavor seperti acetaldehyde dan menghasilkan senyawa yang menyebabkan rasa pahit pada produk keju yaitu senyawa peptida yang mengandung prolin. Bakteri asam, laktat yang biasa digunakan sebagai kultur starter pada pembuatan keju diantaranya adalah *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* (Stanley, 1995).

Pada penelitian ini dipelajari bagaimana peran pemotongan dan penyambungan DNA dalam cloning gen prolidase dari bakteri asam laktat.

METODE

Materi

Materi berasal dari beberapa sumber seperti buku teks, jurnal dan artikel ilmiah dari internet.

Metode

Metode yang digunakan adalah deskriptif argumentatif dan meintroduksikan hasil penelaahan jurnal/buku.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA (*deoxiribonucleic acid*)

DNA merupakan suatu senyawa polimer deoxiribonucleitida yang tersusun secara sistematis. Setiap unit senyawa deoxiribonucleotida ini terdiri dari satu gula pentosa (deoxiribose), satu senyawa phosphodiester dan salah satu dari empat macam basa nitrogen : adenin (A), Guanin (G), thymin (T) dan cytosin (C). Dalam susunan DNA, basa adenin selalu berpasangan dengan thymin; dan basa guanin berpasangan dengan cytosin. Struktur DNA terlihat sebagai dua untaian pita/rantai anti paralel berbentuk helix. Setiap rantai DNA, disebut sebagai sebuah pita, secara kimiawi memiliki arah tertentu yaitu selalu disintesa dengan arah 5' ke 3', artinya bagian awal dari pita DNA tersebut berikatan dengan senyawa fosfodiester (-PO₄) pada senyawa karbon ke 5 dari senyawa deoksiribonucleotida dan pada bagian akhir berikatan pada senyawa karbon ke 3 dari senyawa deoksiribonucleotida. Walaupun molekul DNA terdiri dari dua rantai polinucleotida biasanya hanya ditulis salah satu rantainya, misalnya '5 ATGCAATTCGG3' atau ATGCAATTCGG (dalam hal ini ujung sebelah kiri (A) adalah '5-P, sedangkan ujung sebelah kanan (G) adalah '3-OH (Barnum,2005))

Struktur polimer DNA terdiri dari 2 buah pita paralel yang memiliki arah berlawanan. Satu pita memiliki arah 5' - 3', sedangkan pita yang lain memiliki arah 3'-5'. Sifat kimia inilah yang menyebabkan rantai dobel DNA

membentuk lingkaran "double helix" (Alberts, et al. 1994)

Gen

Gen adalah fragmen atau sekuen dari DNA yang menyandi sintesis protein yang bersifat fungsional pada organisme hidup, diekspresikan dalam bentuk fenotipe atau karakteristik yang dapat dilihat dengan mata telanjang ataupun dibawah mikroskop. Misalnya sifat dapat menghidrolisis gula menjadi alkohol pada *Saccharomyces cerevisiae* yang disebabkan oleh enzim amylase yang dimilikinya; warna bulu pada hewan seperti warna belang hitam putih pada sapi perah friesien Holstein yang bersifat herediter atau morfologi koloni dan sel pada kultur mikroba. Fragmen DNA yang membentuk gene kebanyakan terdiri dari 1000 – 4000 nukleotida.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Untuk keperluan karakterisasi, atau mempelajari ekspresi gen dimana jumlah tidak mencukupi maka perlu dilakukan perbanyakan molekul DNA yang dikehendaki. Cara yang dapat ditempuh adalah melakukan proses PCR terhadap DNA tersebut.

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu teknik untuk memperbanyak (mengamplifikasi) molekul DNA dengan pemanfaatan enzim secara *in vitro*. Teknologi ini digunakan secara luas dalam biologi molekuler dalam proses kloning gene. Dalam proses PCR sekuen/fragmen DNA target yang akan diamplifikasi digunakan sebagai template atau cetakan DNA diperbanyak dalam hitungan eksponensial melalui reaksi berantai.

Dalam proses PCR, DNA target yang akan diamplifikasi dimasukkan kedalam tabung Eppendorf, kemudian ditambahkan enzim DNA polimerase, dinukleotida triphosphat (dNTP: dATP, dTTP, dCTP dan dGTP), primer oligonukleotida dan buffer.

Enzim DNA polimerase berfungsi untuk mengkatalisis reaksi polimerisasi nukleotida menjadi untai DNA. Enzim DNA polimerase yang dipakai biasanya adalah yang tahan terhadap pemanasan sampai suhu 100°C. Enzim yang biasa digunakan dalam PCR adalah enzim *Taq* DNA polymerase.

Primer oligonukleotida pendek yang merupakan DNA single stranded pendek (sekitar 10-30 basa nukleotida) yang diperlukan dalam mengawali proses sintesis DNA. Urutan basa nukleotida dari primer ini ditentukan agar merupakan basa komplementer dari bagian molekul DNA cetakan.

Molekul dinukleotida (dNTP) diperlukan dalam teknik PCR sebagai bahan dasar untuk membuat untai DNA karena molekul DNA disusun oleh keempat nukleotida tersebut.

Proses PCR terdiri dari tiga tahapan yang diulang-ulang selama 20 – 40 menit (Anonymous^d, 2008, Anonymous^c, 2008). Ketiga tahapan tersebut adalah:

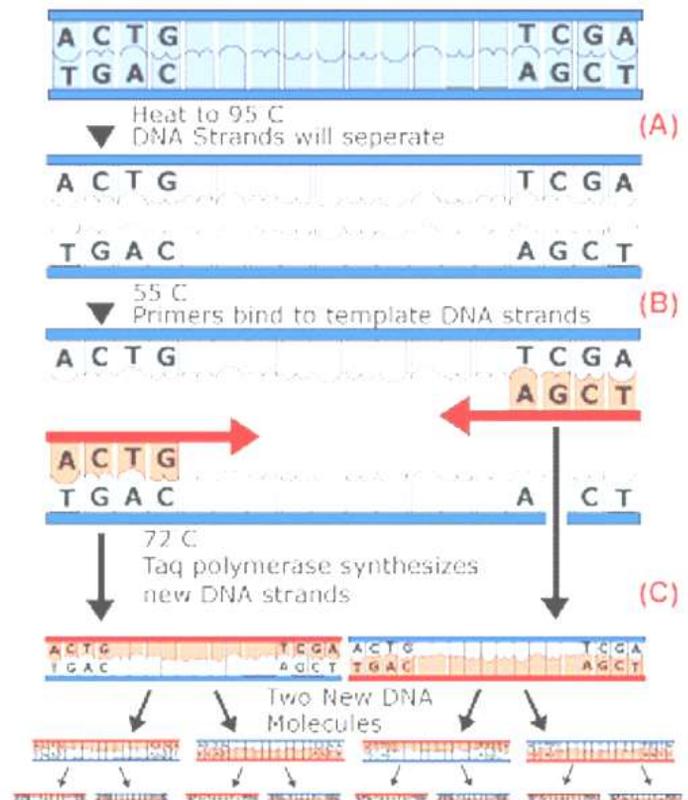
A. Tahap peleburan (denaturasi). Pada tahap ini DNA target yang menjadi DNA cetakan dipanaskan pada suhu 95-96°C. Pada suhu ini ikatan hidrogen dari DNA akan putus sehingga rantai ganda DNA terpisah menjadi rantai tunggal. Tahap ini berlangsung selama 5 menit

B. Tahap penempelan atau annealing.

Pada tahap ini primer yang mengandung nukleotida komplementer, menempel pada bagian DNA templat yang urutan basanya komplementer. Ini dilakukan pada suhu antara 60-65°C. Penempelan ini bersifat spesifik. Suhu yang tidak tepat menyebabkan tidak terjadinya penempelan atau primer menempel di sembarang tempat. Tahap ini berlangsung sekitar 1-2 menit.

C. Tahap pemanjangan atau elongasi.

Suhu untuk proses ini tergantung dari jenis DNA-polimerase (P pada gambar) yang dipakai. Dengan [Taq-polimerase](#), proses ini biasanya dilakukan pada suhu 76°C. Tahap ini biasanya berlangsung selama 1 menit.



Gambar 2. Tahapan PCR pada DNA rekombinan

Pemotongan DNA

Dalam teknologi kloning gen, gen target yang akan di klon harus diisolasi dari DNA genome. Isolasi gen target dari DNA genome tersebut dapat dilakukan dengan memotong DNA genom dengan enzim restriksi endonuklease. Selain memakai enzim nuklease, DNA dapat juga dipotong secara mekanis yaitu dengan menggunakan alat sonikator. Hasil pemotongan dengan cara ini adalah molekul DNA yang ujungnya tidak beraturan. Kloning gen dengan melalui tahapan isolasi ini disebut kloning secara acak atau shotgun cloning atau random cloning atau sering juga disebut kloning genomik (Yuwono, 2000).

Pada kloning dengan gen target yang telah ditentukan maka DNA genome dipotong dengan enzim endonuklease restriksi. Enzim restriksi adalah protein yang diproduksi oleh bakteri untuk menghentikan invasi oleh DNA asing. Enzim ini akan memotong DNA asing menjadi fragmen-fragmen sehingga tak bisa melakukan replikasi. Dengan demikian invasi tersebut dapat dicegah. Enzim nuklease restriksi adalah enzim yang dapat memotong molekul DNA pada bagian tertentu. Enzim restriksi memiliki sifat dapat berikatan, mengenal dan memotong DNA pada sekuen tertentu yang disebut 'recognition sekuen' atau 'recognition site'

Enzim endonuklease, berdasarkan atas kofaktor enzim yang dibutuhkan, sifat dari sekuen DNA target, dan posisi titik pemotongannya didalam sekuen DNA target di bedakan menjadi 3 (tiga) grup yaitu : tipe I, tipe II dan tipe III. (Anonymous, 2008; Yuwono, 2008; Chawla, 2002).

Enzim nuklease diberi nama sesuai dengan nama bakteri dari mana enzim tersebut diisolasi. Misalnya : enzim **EcoRI** (Anonymous^b, 2008)

E Escherichia (genus)
Co coli (spesies)
R RY13 (strain)
I diidentifikasi pertama kali dari bakteri ini.

Enzim yang paling banyak digunakan dalam teknologi kloning gen adalah enzim restriksi tipe II karena urutan nukleotida yang dikenali dan dipotong oleh enzim tersebut adalah sama sehingga memudahkan dalam strategi kloningnya. Akan tetapi pada DNA genome letak urutan nukleotida gen biasanya tersebar secara tidak merata sehingga ukuran hasil potongan DNANYa juga beragam dengan panjang DNA bervariasi antara 4 sampai 8 pasang base (untuk enzim restriksi tipe II) dan bersifat palindromik artinya kalau urutan pasangan base penyusun gene tadi dibaca dari urutan untai komplementernya maka hasilnya akan tetap sama. Misalnya:

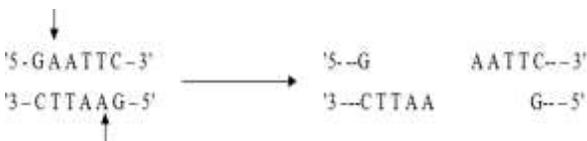


Pola pemotongan DNA genome oleh enzim restriksi berbeda-beda. Misalnya banyak enzim restriksi yang menghasilkan potongan DNA dengan ujung DNA kohesif atau ujung runcing (sticky end), ada juga yang menghasilkan potongan DNA dengan ujung tumpul (blunt end) Misalnya:

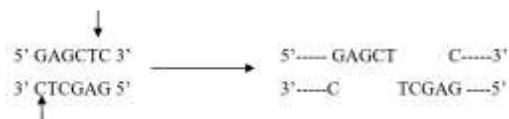
Tabel 1. Type enzim restriksi.

Tipe	Kofaktor	Urutan DNA yang dikenali	Urutan DNA yang dipotong	Contoh
I	ATP, Mg ⁺⁺ , S-adenosil metionin	13-15 pasangan basa yang mengandung urutan nukleotida tidak spesifik sepanjang 6-8 pasangan basa	Tidak spesifik, tidak sama urutan DNA yang dikenali	EcoK
II	Mg ⁺⁺	4 – 8 pasangan basa , biasanya dengan susunan simetris	Sangat spesifik, pemotongan pada urutan nukleotida yang dikenali	EcoRI
III	ATP, Mg ⁺⁺ , (S – adenosil methionin dapat menstimulasi aktifitas)	5 -6 pasangan basa, tidak tersusun secara simetris	Sangat spesifik, tetapi pemotongan terjadi pada daerah yang bukan tempat pengenalan yaitu ke ujung 3' dari titik pengenalan	EcoPI

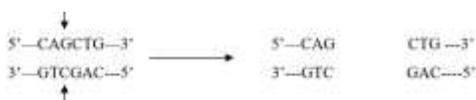
a) potongan DNA oleh enzim *EcoRI* dengan ujung kohesif pada bagian 5'



b) Hasil potongan DNA oleh *SacI* dengan ujung kohesif pada bagian 3'



c) potongan DNA oleh enzim *PvuII* dengan ujung tumpul



Hasil potongan DNA dengan ujung tumpul lebih sukar disambung dibandingkan dengan potongan dengan ujung runcing.. Namun hal ini tidak menjadi masalah (Sunbrook, *et al.*, 1989) karena hasil potongan DNA yang berujung tumpul tadi

dapat dimodifikasi sehingga menjadi ujung runcing yang dapat dengan mudah disambung dengan DNA ligase ataupun T4 DNA ligase.

Beberapa contoh enzim restriksi ditampilkan dalam Tabel 2. Pemotongan DNA dapat dilakukan dengan mencampur DNA yang mengandung gen target dalam tabung eppendorf dengan beberapa enzim restriksi dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Reaksi enzim ini dihentikan dengan pemanasan pada suhu 70°C selama 15 menit. (Richana dan Thontowi, 2002).

Menyambung DNA.

Molekul DNA hasil pemotongan oleh enzim restriksi yang sama dapat dengan mudah disambung dengan menggunakan enzim **DNA ligase** dan enzim **T4 DNA ligase**. DNA ligase hanya dapat menyambungkan potongan DNA berujung kohesif sedangkan enzim T4

Tabel 2. Enzim restriksi dan sekuen pengenalnya.

Enzyme	Bakteri asal enzim	Sekuen pengenal	Hasil potongan
EcoRI	Escherichia coli	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATC---3' 3'---CTTAA G---5'
EcoRII	Escherichia coli	5' CCWGG 3' GGWCC	5' -- CCWGG---3' 3' ---GGWCC --- 5'
HindIII	Haemophilus influenzae	5' AAGCTT 3' TTCGAA	5' ---G GATCC---3' 3' TTCGA A---5'
EcoRV	Escherichia coli	5' GATATC 3'CTATAG	5'—GAT ATC—3' 3' ---CTA TAG—5'

DNA ligase mampu menyambung DNA dengan ujung potongan kohesif dan tumpul. (Sambbrook et al. , 1989).

Pada proses penyambungan ini DNA yang akan disambung dengan enzim DNA ligase, dicampur dalam tabung eppendorf, kemudian diinkubasi pada suhu 15°C selama semalam (Yuwono, 2000).

Dalam keadaan tertentu, molekul DNA yang akan disambung mempunyai ujung-ujung yang tidak sama karena merupakan hasil pemotongan oleh enzim restriksi yang berbeda. Untuk menyambung molekul-molekul yang berbeda ujungnya tersebut dapat dikerjakan dengan (Yuwono, 2000; Sambrook et al., 1989)

a. menambahkan linker atau adaptor .

Adaptor adalah suatu molekul oligonukleotida sintetik yang urutan nukleotidanya dirancang sedemikian rupa sehingga masing-masing ujung adaptor ini bersifat komplementer dengan masing-masing ujung DNA yang akan

disambung. **Linker** adalah molekul oligonukleotida sintetik yang mempunyai urutan nukleotida yang dikenali oleh enzim restriksi tertentu. Linker digunakan untuk menyambung DNA berujung tumpul sehingga DNA tumpul dapat mempunyai sisi pengenalan oleh enzim restriksi tertentu untuk membentuk ujung runcing.

b. Ekor homopolimer:

adalah molekul deoksiribonukleotida yang terdiri dari satu macam nukleotida dan ditambahkan pada ujung 3' satu molekul DNA unti tunggal atau ganda sehingga DNA tersebut dapat membentuk rekombinan dengan DNA lain yang mempunyai ekor homopolimer yang komplementer.

c. Pengisian ujung kohesif.

dilakukan dengan menggunakan aktivitas enzim DNA polimerase untuk mengisi ujung 3' DNA hasil pemotongan oleh enzim restriksi. Enzim yang sering digunakan untuk keperluan ini adalah DNA polimerase I dari *E coli* yang telah

dihilangkan aktifitas eksonuklease 5' → 3' sehingga hanya mempunyai aktifitas polimerase 5' → 3' dan eksonuklease 3' → 5'. Fragmen DNA polimerase I semacam ini disebut **fragmen Klenow** yang dapat diperoleh dengan memotong DNA polimerase I yang lengkap dengan enzim substilin. Dengan adanya dNTP dan ion Mg⁺⁺, enzim Klenowe akan menyintesis untai DNA komplementer dengan ujung 5' yang menonjol dengan menggunakan ujung 3' sebagai primer.

d. Penghilangan ujung DNA kohesif selain dengan cara menambahkan ujung kohesif, ujung kohesif 5' atau 3' dapat dihilangkan dengan menggunakan aktifitas enzim eksonuklitik 3' → 5' fragmen Klenow, atau dengan menggunakan enzim T4 DNA polimerase.

Jika ujung-ujung DNA yang akan disambung sudah dimodifikasi dengan salah satu cara diatas maka selanjutnya dapat dilakukan penyambungan, baik dengan menggunakan teknik penyambungan DNA tumpul atau dengan memotong terlebih dahulu menggunakan enzim restriksi, jika modifikasinya berupa penambahan adaptor atau linker.

Vektor

Vektor sejenis molekul DNA yang dapat membawa molekul DNA asing yang akan dimasukkan kedalam organisme inang yang menjadi target. Di dalam organisme inang ini vector yang membawa DNA gen asing dapat memperbanyak diri dan mengekspresikan gen yang dibawanya pada sel inang tersebut.

Kloning Prolidase Rekombinan dari Bakteri Asam Laktat

1. Isolasi DNA Genom dari Bakteri Asam Laktat

Isolasi DNA genom bakteri asam laktat *Lb. Plantarum* dilakukan dengan membuat kultur bakteri tersebut dalam MRS broth pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri tersebut kemudian di sentrifuge untuk memperoleh masa sel (bagian endapan) yang kemudian ditambahkan larutan enzim lizozim, larutan enzim proteinase K. Setelah itu larutan tadi di sentrifuge untuk memisahkan DNA dari protein sel yang lainnya. Bagian supernatan dari larutan tadi kemudian di transfer kedalam tabung eppendorf, ditambahkan larutan natrium asetat dan alkohol absolut, disimpan pada suhu -20°C selama 1 jam, kemudian disentrifus. Masa asam nukleat yang terbentuk yaitu DNA genome purifikasi ditambahkan 200µl larutan bufer TE dan disimpan pada suhu -20°C

2. Perbanyak gene prolidase

Untuk keperluan gen kloning, maka DNA genome di perbanyak dengan menggunakan teknik PCR. Dalam proses PCR ini dipakai primer yang mempunyai titik pengenalan enzim restriksi EcoRI dan *HindIII* yaitu primer GGAGAATTCGAAATGACAGATTATACGAAAC dan primer CTTTGAAGCTTTTAATTAAGATCTATAC. DNA genome hasil purifikasi diatas di tambahkan kedua primer, dNTP dan enzim DNA polimerase. Campuran larutan ini kemudian diberi perlakuan PCR. Tahapan PCR dilakukan dengan proses denaturasi pada suhu 95°C selama

1 menit, proses penyambungan (annealing) pada suhu 45°C selama 1 menit dan proses pemanjangan pada suhu 72°C selama 3 menit untuk 50 siklus. Setelah proses ini selesai campuran larutan ini disimpan pada suhu 4°C.

3. Isolasi gen yang menyandi enzim prolidase

Larutan DNA genome hasil PCR kemudian dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *HindIII* sehingga terbentuk ujung lengket. Untuk memperoleh/memisahkan gen yang menyandi enzim prolidase dari DNA genome, larutan tadi diassay dengan gel elektroforesis dengan menggunakan 1% gel agarose selama 100 menit pada 40 mA. Dari pita-pita DNA yang terbentuk pada gel agarose, pita dengan karakteristik 1,1kbp adalah gen yang menyandi enzim prolidase. Agarose ini kemudian di potong dan diambil dengan menggunakan pisau tajam.

Fragmen 1,1 kbp gen prolidase dimurnikan dengan mengambil potongan agarose dengan pita gen 1,1 kbp, dimasukkan kedalam tabung eppendorf, dipotong kecil-kecil untuk memudahkan pelarutan. Kedalam tabung ditambahkan larutan NaI 6M inkubasi pada suhu 55°C, selama 35 menit. Sdelanjutnya ditambahkan bubuk gelas (Glass powder). Campuran ini kemudian dihomogenkan dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Pellet yang terbentuk dicuci dengan ethanol 50% sebanyak 50 kali volume glass powder dan disentrifus 3000 rpm selama 1 menit. Pelet yang terbentuk adalah DNA gen prolidase,

kemudian ditambah bufer TE, diinkubasi pada suhu 37oC selama 30 menit dan disimpan pada -20°C.

4. Vektor untuk kloning

Vektor untuk kloning yaitu pUC18. Vektor yang dipakai dapat merupakan stok pada bank gen atau diisolasi dari bakteri tertentu. Vektor pUC18 adalah vektor yang diperoleh dari bank gen. Vektor ini. Pemilihan vektor ini memiliki penanda untuk enzim restriksi yang akan digunakan, dan memiliki tempat untuk menginsersi gen prolidase dan telah diketahui urutan gen nya (Hadi, 2005).

Vektor diberi perlakuan pemotongan DNA dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *HindIII* Untuk mencegah DNA plasmid tersebut membentuk sambungan otomatis maka DNA plasmid di defosforilasi, dengan larutan alkaline fosfat pada 37°C selama 30 menit dan dilanjutkan dengan pemanasan pada 70°C selama 5 menit. Pemurnian DNA vektor atau DNA plasmid dilakukan menurut prosedur sesuai dengan penjelasan diatas.

Fragmen 1,1 kbp yang telah dimurnikan dan DNA plasmid pUC18 hasil purifikasi diligasi untuk menyambung ujung-ujung lengket dari fragmen tersebut, dengan T4 DNA ligase sehingga terbentuk gene rekombinan

Gene rekombinan tadi kemudian di transformasikan ke inang *E.coli*, dengan mencampurkan DNA plasmid pUC18 yang mengandung gen rekombinan prolidase dengan sel inang, disimpan dalam es selama 2 jam, kemudian dipanaskan pada suhu 42°C selama 2 menit, selanjutnya campuran disimpan dalam es selama 5 menit dan

ditambahkan media LB (lizogeni broth) cair hingga volume 1 ml. Sel transforman diaktifkan dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan ditanam dalam media LB padat yang mengandung ampisilin 100 µg/ml (Richana dan Thontowi, 2002). Isolat yang tumbuh adalah isolat bakteri yang mengandung gen rekombinan prolidase.

SIMPULAN

Memotong DNA merupakan tahap penting dalam proses cloning gen prolidase dari bakteri asam laktat. Hal ini terlihat dari beberapa tahapan yang harus dilaksanakan dalam proses cloning ini proses memotong dan menyambung DNA muncul misalnya :

- a. Dalam proses isolasi dan pemurnian DNA gen prolidase yang diklon
- b. Dalam proses persiapan vektor untuk kloning digunakan untuk memotong DNA vektor /plasmid dengan memakai enzim restriksi yang sama dengan enzim yang digunakan untuk isolasi. Hal ini agar terbentuk ujung-ujung DNA yang kompatibel, sehingga memudahkan dalam proses ligasi.
- c. proses menyambung DNA berperan dalam membuat DNA rekombinan yaitu pada proses kloning. Tahap ini dilakukan setelah DNA vektor dan DNA prolidase dari bakteri asam laktat dimurnikan dan diassay pada gel elektroforesis.

DAFTAR PUSTAKA

Anonymous. 2008. Restriction enzyme. Wikipedia, the free encyclopedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme.

Anonymous^b. 2008. Restriction enzyme. http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme.

Anonymous^c. 2008. Polymerase chain reaction. Wikipedia the encyclopedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction.

Anonymous^d. 2008. Polymerase chain reaction. From creation wiki, the encyclopedia of certain science. http://creationwiki.org/Polymerase_chain_reaction.

Axelson, L. 1998. Lactic acid bacteria.: classification and physiology, p. 1-72 In Salminen, S. dan A. von Wright (ed.), Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc, New York, USA.

Barnum, S.R. 2005. Biotechnology. An introduction. 2nd ed. Thompson books/cole. Australia, Canada, Mexico, Singapore, Spain, UK, USA.

Chawla, H.S. 2002. Introduction to plant biotechnology. Science Pub. Inc. USA, Plymouth, UK.

Hadi, S. 2005. Karakterisasi fragmen DNA gen glukamilase (GLU1) produk PCR dengan analisis restriksi. Berk. Penel. Hayati: 11 (81-79).

Rahman, A., S. Fardiaz, W.P. Rahayu, Suliantari dan C.C. Nurwiti. Teknologi Fermentasi Susu. Depdikbud, Ditjen Dikti. PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.

Richana, N. dan A. Thontowi. 2002. Kajian ekspresi gen α -amylase untuk mendapatkan isolate bakteri rekombinan pembawa gen α -amylase. Prosiding seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. Bogor 26-27 Desember 2001.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch dan T. Maniatis. 1989. Molekular cloning. A Laboratory manual. CSH Laboratory Press.
- Suriasih, 2005. Occurrence, properties and interaction of bacteria in Camembert and Blue Veined Cheese. Thesis S2 The University of New South Wales.
- Stanley,G. 1995. Cheeses, p. 263-304. In Wood,J.B. (ed.) Microbiology of fermented foods. Blackie Acad &Prof. London, New York.
- Yuwono, T. 2008. Bioteknologi Pertanian. Gajah Mada University Press.