

RANCANGAN PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI GEN PENGKODE KITINASE DARI *Bacillus substillis*

Mardiyanto dan Setiawati Yusuf

Abstrak : Telah dilakukan penelitian tentang perancangan primer untuk amplifikasi gen pengkode kitinase dari *Bacillus substillis*. Hasil perancangan dan amplifikasi akan dipergunakan untuk proses overproduksi kitinase yang akan dimanfaatkan pada bidang kesehatan dan pertanian. Dari proses perancangan diketahui bahwa gen pengkode kitinase dari *Bacillus substillis* ditemui cds tidak dimulai dari basa pertama dan ada 186 basa dihitung dari start kodon, primer yang dihasilkan tidak memperlihatkan empat basa yang berurutan menempel pada kondisi self dimmer ataupun hair pin loop. Urutan primer yang diperoleh adalah Forward `aaaagggggtgaacaaaatagagt` dan Reverse `acacggctgctgcagcaagta`

Kata kunci: primer, amplifikasi, kitinase, self dimmer, dan hair pin loop

Abstract : The experiment about primer designed for amplification of gene chi encode chitinase of *Bacillus substillis* has conducted. The results of this experiment will be both adopted to produce the chitinase and applied to health and agriculture fields. Based on the designed process revealed that the target gene of *Bacillus substillis* consisting the CDS that was not begun from start codon and had 186 base pair from start codon. The sequence of primer were revealed no repeatedly bases that overlapping in both self dimmer and hair pin loop condition. The sequence of the designed primer were Forward `aaaagggggtgaacaaaatagagt` dan Reverse `acacggctgctgcagcaagta`.

Key word: primer, amplification, self dimmer, and hair pin loop

PENDAHULUAN

Penelitian terhadap enzim kitinase yang berasal dari mikroba merupakan topik penelitian yang menarik untuk dikembangkan. Penanggulangan jamur patogen dan insekta yang menyerang manusia dan tanaman pangan menghadapi tantangan yang besar karena telah banyak ditemukan kasus resistensi terhadap senyawa anti jamur ataupun insektisida (Joshi, 2005).

Kitinase dapat menguraikan kitin yang terkandung dalam dinding sel jamur

sehingga pertumbuhan jamur patogen dapat dicegah. Hasil uraian kitin adalah N-asetil glukosamin yang diperlukan untuk pengadaan bahan baku obat seperti Heparin dan asam hyaluronat (Welbaum, 2004).

Kitinase pada galur alami diproduksi dalam jumlah yang sedikit dan Teknologi DNA Rekombinan dapat mengoverproduksi kitinase dari gen pengkodennya setelah di-amplifikasi-cDNA (Donnelly, 2004 dan Hobel, 2005)

Untuk mendapatkan urutan cDNA yang mengodekan kitinase dengan benar harus dilakukan perancangan primer. Pada penelitian ini perancangan primer dilakukan dengan program Primer Select yang terdapat dalam DNASTar dan Program Perancangan Primer di JustBIO. Parameter yang diamati dibandingkan dengan data primer yang disintesis oleh Proligo Inc.

METODE PENELITIAN

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UNSRI dari bulan Mei sampai Juli 2006 dan Sintesis Primer dilakukan di Proligo Inc Singapore.

Alat dan Bahan

Program Primer Select-DNAStar dan Program Perancangan Primer di JustBIO. Peta genetik *Bacillus subtilis*, peta genetik vektor ekspresi pET-21B, urutan basa dari gen yang mengkode kitinase dari *Bacillus subtilis*, primer sintesis dari Proligo, dan DNA kromosom dari *Bacillus subtilis* yang dimurnikan dengan kit wizard.

Prosedur Penelitian

Penentuan urutan umum sebagai situs katalitik pada kitinase. Urutan gen yang mengkode kitinase dari semua makhluk hidup diakses pada bank gen. Urutan basa ini selanjutnya disalin dan dipergunakan untuk proses *multiple alignment*. Pada

program JustBIO dipilih *DNA aligner* dan setelah itu dapat diakses program *multiple alignment* tersebut. Urutan DNA dipindahkan pada kolom request dan selanjutnya dilakukan penghomologian pada fasata format.

Penentuan panjang daerah gen pengkode kitinase dari *Bacillus subtilis*

Gen Pengkode Kitinase dari *Bacillus subtilis* diperoleh dari bank gen. Urutan tersebut dijadikan urutan asam amino dengan pendekatan *digenerated*. Urutan basa diprediksi berdasarkan fungsi umum dari struktural gen. Urutan gen yang diperoleh harus lebih dari 60 basa dari star kodon. Urutan yang berlebih dikarakterisasi situs pemotongan dengan enzim restriksi yang umum digunakan. Urutan berlebih yang telah dikarakterisasi ditambah dengan coding region dipersiapkan untuk homologi dengan gen pengkode kitinase dari *Bacillus thuringiensis* yang telah berhasil di amplifikasi pada penelitian sebelumnya.

Penentuan penempelan antar primer

Pada program DNASTar dipilih menu primer select. Urutan gen kitinase dari *Bacillus subtilis* dimasukkan dalam kolom request. Pada menu location dipilih posisi penempelan primer dan selanjutnya program diarahkan pada self dimmer primer. Urutan basa yang menempel lebih dari empat basa dihindari dan diteruskan pada menu *sending report*. Hasil dipindahkan

pada kolom *previev* dan kemudian divisualisasi pada monitor.

Penentuan *hairpin-loop*

Pada program DNASTar dipilih menu primer select. Urutan gen kitinase dari *Bacillus subtilis* dimasukkan dalam kolom *request*. Pada menu *location* dipilih posisi penempelan primer dan selanjutnya program diarahkan pada *hairpin-loop*. Urutan basa yang menempel lebih dari empat basa untuk membentuk loop bentuk rambut dihindari dan diteruskan pada menu *sending report*. Hasil dipindahkan pada kolom *previev* dan kemudian divisualisasi pada monitor.

Penetapan urutan primer untuk gen pengkode kitinase dari *Bacillus subtilis*

Pada program DNASTar dipilih menu primer select. Urutan gen kitinase dari *Bacillus subtilis* dimasukkan dalam kolom *request*. Pada menu *location* dipilih posisi penempelan primer dan selanjutnya pro-

```

/organism="Bacillus subtilis"
/mol_type="genomic DNA"
gene      187..1977
/gene="chi"
CDS      187..1977
/translation="MKKVFSNKKFLVFSFIFAMILSLSFFNGESAKASSDKSYKIIGY
YPSWGAYGRDFQVWDM DASKVSHINYAFADICWEGRHGNPDPTGPNPQTWSCQDENGV
IDVPNGSIVMGDPWIDVQKSNAGDTWDEPIRGNFKQLLKLKKNHPHLKTFISVGGWSW
SNRFS DVAADPAARENFAASAVNFLRKYGFDGVDLDWEYPVSGGLPGNSTRPEDKRNY
TLLLQDVREKLDAAEAKDGK KYLLTTVSGASPEYVSNTELD KIAETVDWINIMTYDFN
GGWQSISAHNAPLFYDPKAKEAGVPNAETFN IESTVKRYKEAGVKADKLV LGTPFYGR
GWSNCEPADNGEYQKCGPAKEGTWEKGV FDFSDLEKNYINKNGYKRYWNDRAKVPFLY

```

gram diarahkan pada *characteristic primer* dan diteruskan pada menu *report*. Hasil dipindahkan pada kolom *summary amplification*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk menanggulangi penyakit infeksi oleh jamur patogen pada kulit manusia, pemakaian enzim kitinase dalam bentuk sediaan salep mulai dipikirkan. Penanggulangan insekta di alam terutama yang menjadi hama penyakit pada tanaman pangan bisa diupakan dari bakteri galur unggul penghasil kitinase. Berbeda halnya dengan penggunaan enzim kitinase dalam bentuk sediaan topikal dan sebagai biokatalis untuk produksi bahan baku obat seperti heparin dan asam hyaluronat, diperlukan enzim kitinase dalam bentuk murni dengan menggunakan Teknologi DNA Rekombinan.

NAENGNFITYDDEESYGYKTDLIQSNGLSGAMFWDFSGDSNQTLNKLAAADLGFAPGG
 GNPEPPSSAPDNLRVTEKTATSISLAWDAPSDGANIAEYVLSYEGGAVSVKDTSATIG
 QLKPNNTTYSFTVSAKDADGKLHTGPTIEAATNSDQTCGYNEWKDTAVYTGDRVVFNG
 KVYEAKWWTKGEQPDQAGESGVWKLIGDCK"

ORIGIN

1 ttgctctcca cccacacata cggtttgaag aggcgatga aaacacaaaa tgtaagcgtt
 61 ttccccttgt tgtcttcagt gtcatcagct gctatgtcag gacaaggga atataaacct
 121 attgaaaagg ggggtaacaa aatagagttt cattgatga cagccaaaaa aattgatga
 181 aaggagatga aaaaagtgtt ttcaacaaaa aagtttctcg tttttcttt catttttgcg
 241 atgattttaa gtctgtcttt ttttaattggg gaaagtgcaa aagccagttc tgacaaaagt
 301 tataaaaatca tcggctacta tccgtcctgg ggcgcttatg gaagggattt tcaagtatgg
 361 gatattgagc ctctaaagt cagccatatt aattaigcat ttgctgatat ttgctgggag
 421 gggaggcatg gaaaccctga tccgacagcc ccgaatcccc agacatggtc ttgccaggat
 481 gaaaacggag tgattgatgt tccaaatgga tcaatcgtta tgggggaccc atggatcgt
 541 gtgcaaaagt caaatgccgg agatacttgg gatgagccga ttcggggcaa cttaaacia
 601 ctattgaagc tgaaaaagaa ccacctcat ttgaaaacat tcatatcagt tggcggatgg
 661 tcttggtcaa atcgctttc agatgttgcg gcagatcctg cggcaagaga gaattttgct
 721 gcttcagcag taaattttt aagaaaatat gggtttgatg gggtcgacct tgactgggaa
 781 taccgggta gtggagggtc gccgggaaac agcaccgctc cggaggataa gagaaactac
 841 acgtactctc tgcaggatgt gcgagaaaag ctgacgccc cagaagcga ggatggcaag
 901 aaatacttgc tgaccgacct gtccggcgc agtccagaat atgtaagcaa cactgaatta
 961 gataagattg ctgaaaccgt tgattggatt aacattatga cctatgactt taatggcgga
 1021 tggcaaagta taagcgtca taatgcccc tttttctatg atccaaaagc gaaagaagcc
 1081 ggcgttcaa acgctgagac atttaacatt gaaagcaccg tgaagcgctc caaggaagcc
 1141 ggtgtcaaag cggacaaatt agtgcttggc acaccgttct atggcagagg ctggagcaat
 1201 tgtgagcctg cagacaacgg agaatacaa aaatgcccac cggctaaaga agggacgtgg
 1261 gaaaaggggg tatttgattt ttcagatctt gaaaagaact acatcaataa aaatggat
 1321 aaaagatatt ggaatgatc agcaaaaagt ccgttttgt ataatgcgga gaatggaac
 1381 ttcatctact acgatgatga agaatcatat ggatacaaaa ccgatttaac tcaatcaaac
 1441 ggattaagcg gggctatgt ttgggattc agcgggtgatt caaatcagac ttgtctcaac
 1501 aaattagcag ccgatttagg gticgctccg ggtgggggta atccagagcc gccttcatc
 1561 gcaccggata atttgcgtgt gaccgaaaa accgcaacca giatcagctc ggcgtgggat
 1621 gcaccgagc agcgagcaaa catcgagag tatgtgctgt catatgaagc cggggccgta
 1681 tccgtcaagg atacatcggc gacaatcggg caattaaagc cgaatacagc atactcatt
 1741 acagtatcgg caaaggatgc ggacggaaaag ctccataccg ggccaacgat agaagcagca
 1801 acaaaactct atcaaacatg tgggtataac gaatggaaag atacagccgt ctacacagc
 1861 ggagaccgag tcgtctttaa cggcaaaagt tatgaagcga aatgggtggac gaaaggagag
 1921 cagccggatc agcgggtgta gtcgggtgta tggaaattaa ttggtgattg caaataaac
 1981 agtttgatag aaaacgataa agagagagtg ggctccccat ctctctttat gagaaaggag
 2041 tatgaatgaa gtgaaaagaa ccgctttatt tactttgca tcatgctgc tctgtcact
 2101 ttgaccccc ttccacaaca ttccgcaga gtcctcaagc a

Gambar 1 : Gen pengkode kitinase dari *Bacillus substillis*

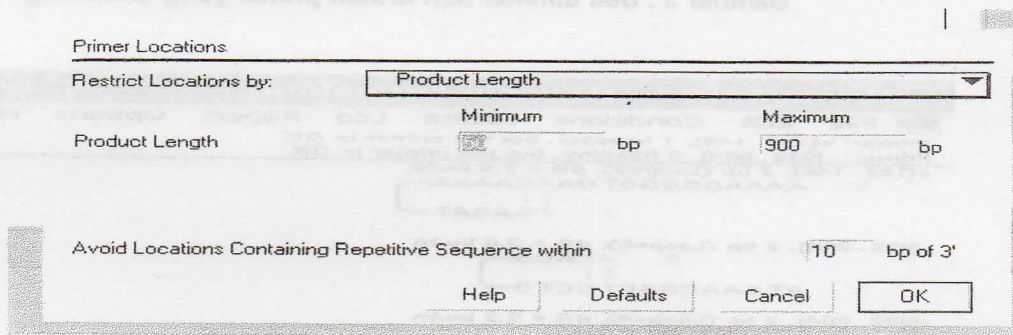
Penentuan urutan umum sebagai dan diketahui urutan umum terlalu bervariasi
 situs katalitik pada kitinase telah dilakukan dan sulit ditemukan daerah yang konserv

lebih dari 300 basa yang tentunya hanya mengkode 100 asam amino sebuah protein yang kecil.

Penentuan panjang daerah gen pengkode kitinase dari *Bacillus subtilis*. Dari pengamatan terhadap data yang diperoleh diketahui urutan basa yang melebihi CDS sehingga layak untuk diperhitungkan daerah-daerah yang akan dijadikan situs pemotongan yang kompatibel dengan enzim restriksi pada vektor ekspresi. Diketahui juga urutan tersebut lengkap dari start hingga stop kodon sehingga kesalahan dari produk PCR dapat

dideteksi. Kesalahan tersebut dapat mengakibatkan mutasi substitusi ataupun silent mutasi. Hasil penentuan dapat dilihat pada Gambar 1.

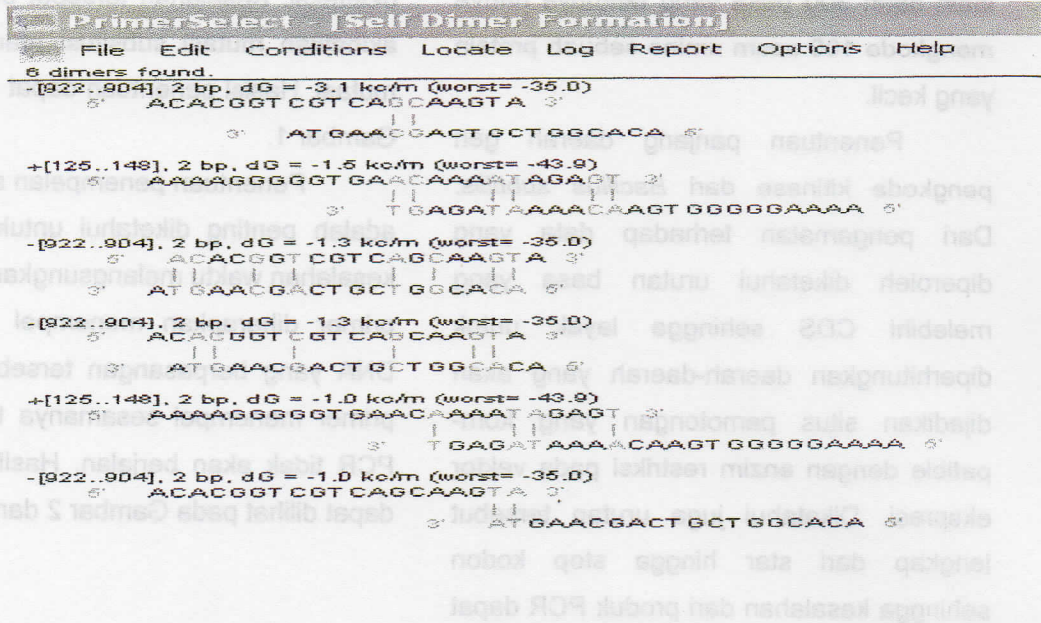
Penentuan penempelan antar primer adalah penting diketahui untuk memlimitasi kesalahan waktu melangsungkan PCR. Dua primer diharapkan menempel pada untai DNA yang berpasangan tersebut dan jika primer menempel sesamanya tentu reaksi PCR tidak akan berjalan. Hasil penentuan dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



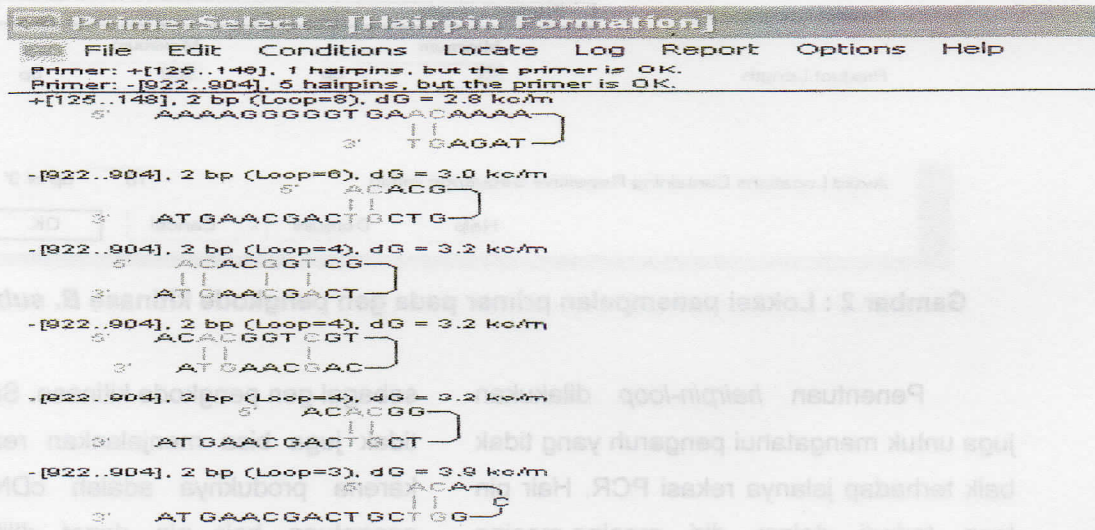
Gambar 2 : Lokasi penempelan primer pada gen pengkode kitinase *B. subtilis*

Penentuan *hairpin-loop* dilakukan juga untuk mengetahui pengaruh yang tidak baik terhadap jalannya reaksi PCR. Hair pin loop terjadi dalam diri masing-masing primer jadi mengakibatkan primer tidak mampu berikatan dengan DNA templat

sebagai gen pengkode kitinase. Satu primer tidak juga bisa menjalankan reaksi PCR karena produknya adalah cDNA. Hasil penentuan hair pin dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3 : Self dimmer dari urutan primer yang dirancang



Gambar 4 : Hasil penentuan hair pin loop dari masing-masing primer

Penetapan urutan primer untuk gen pengkode kitinase dari *Bacillus subtilis* adalah untuk mengetahui urutan yang akan dikirim ke Proligo. Urutan itu menggam-

barkan kondisi PCR yang akan dilakukan. Hasil tentang saran untuk kondisi PCr dapat dilihat pada Gambar 5.

PrimerSelect [Amplification Summary]		
File Edit Conditions Locate Log Report Options Help		
Upper Primer: 24-mer 5' AAAAGGGGGTGAACAAAATAGAGT 3'		
Lower Primer: 19-mer 5' ACACGGTCGTCAGCAAGTA 3'		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	53.5 °C	48.6 °C
Primer Overall Stability	-43.9 kcal/m	-35.0 kcal/m
Primer Location	125..148	922..904
Product Tm - Primer Tm	28.4 °C	
Primers Tm Difference	5.0 °C	
Optimal Annealing Temperature	53.5 °C	
Product Length	798 bp	
Product Tm (%GC Method)	76.9 °C	
Product GC Content	43.6 %	
Product Tm at 6xSSC	96.5 °C	

Gambar 5 : Urutan primer hasil rancangan dan kondisi PCR

KESIMPULAN

Dari proses perancangan primer yang telah dilakukan diketahui bahwa pada gen pengkode kitinase dari *Bacillus subtilis* ditemui CDS tidak dimulai dari basa pertama dan ada 186 basa dihitung dari strat kodon, primer yang dihasilkan tidak memperlihatkan empat basa yang berurutan menempel pada kondisi self dimmer ataupun hair pin loop. Urutan primer yang diperoleh adalah Forward aaaagggggtgaacaaaatagagt dan Reverse acacggtcgctgcagcaagta.

Hobel, CF., GO Hreggvidsson, VT Marteinson, F. Bahrani-Mougeot, JM Einarsson, and JK Kristjansson, 2005, Cloning, expression and characterization of a highly thermostable family 18 kitinase from *Rhodothermus marinus*, *Extremophiles*, 9(1): 53-64.

Donnelly, L.E. and P. J. Barnes, 2004, Acidic mammalian Chitinase – a potential target for asthma therapy, *Trends Pharmacol Sci.*, 25(10):509-511.

Welbaum, G., et al, 2004, Cereal and seed chitinase, its profiles and character, *Soil Agrrr Jour.* 11(2):114-119

DAFTAR PUSTAKA

Joshi, M. B., Rogers, M. E., Shakarian, A.M., Yamage, M., Al-Harhi SA, Bates PA, Dwyer DM, 2005, Molecular Characterization, expression, and in vivo analysis of LmetChtI: the Chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*, *J. Biol. Chem.*, 280(5): 3847-61.