

Dis. M. 01/12  
Fad  
k

## **DISERTASI**

### **KLONING DAN EKSPRESI GEN LACTONASE DARI *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, SEBAGAI KANDIDAT INHIBITOR AUTOINDUCER QUORUM SENSING**



**MOHAMAD FADJAR**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2011**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KLONING DAN EKSPRESI GEN LACTONASE  
DARI *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,  
SEBAGAI KANDIDAT INHIBITOR  
AUTOINDUCER QUORUM SENSING**

**DISERTASI**

**Untuk Memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Telah Dipertahankan Di Hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka**

**Pada Hari : Selasa  
Tanggal : 24 Mei 2011  
Pukul : 10.<sup>00</sup> - 12.<sup>00</sup> WIB**

**Oleh :**

**MOHAMAD FADJAR  
NIM. 090710382 D**

# LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI YANG TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL: 6 JUNI 2011

OLEH

PROMOTOR



PROF. Dr. Ir. AGOES SOEGIANTO, DEA  
NIP 19620803198710001

KO-PROMOTOR I



PROF. Dr.. NI NYOMAN TRI PUSPANINGSIH, Dra.,MS  
NIP 1963061519870012001

KO-PROMOTOR II



PROF. Dr. AULANNI'AM, drh, DES  
NIP 196009091988022001

## PANITIA PENGUJI DISERTASI

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)  
Tanggal 23 Maret 2011

---

Ketua : Prof. Win Darmanto, Ph.D.

Anggota : 1. Prof. Dr. Agoes Soegianto, Ir., DEA.  
2. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Dra., M.Si.  
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES  
4. Prof. Dr. Suhartati, dr, MS  
5. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.  
6. Dr. Ni'matusahro  
7. Dr. Moh.. Amin, M.Si.

Ditetapkan Dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga  
Nomer: 928/H3/KR/2011  
Tanggal : 31 Maret 2011

# UCAPAN TERIMA KASIH

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penulisan Disertasi dengan judul KLONING DAN EKSPRESI GEN LACTONASE DARI *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, SEBAGAI KANDIDAT INHIBITOR *AUTOINDUCER QUORUM SENSING* ini dapat diselesaikan. Pada kesempatan ini, saya haturkan terima kasih kepada:

Prof. Dr. Agoes Soegianto, Ir., DEA. sebagai promotor yang selalu memberikan semangat, dorongan, motivasi, dan bimbingan untuk menyelesaikan pendidikan doktor ini.

Prof. Dr. Ni Nyoman Tripuspaningsih, Dra., M.Si. sebagai Ko-Promotor I yang telah menyediakan waktu, pikiran dan perhatian, serta membimbing dengan penuh kesabaran ditengah kesibukannya yang padat.

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. sebagai Ko-Promotor II yang telah memberikan dorongan, motivasi dan semangat,serta bimbingan untuk menempuh jenjang pendidikan S3 ini.

Pemerintah Republik Indonesia melalui Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberi kesempatan, bantuan dana BPPS (Beasiswa Program Pascasarjana) , dan *Sandwich-Like Programme* DIKTI; sehingga saya dapat mengikuti pendidikan S3 pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Dan melakukan penelitian di Charite, Institut für Biochemie, Berlin, Jerman.

Rekor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Fasich Lisan, Apt. yang telah memberikan ijin dan berkenan menerima saya sebagai mahasiswa Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Brawijaya, Prof. Dr. Yogi Soegito, Ir. yang telah memberikan ijin untuk mengikuti pendidikan S3 di Universitas Airlangga, dan memberikan dorongan serta bantuan sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian disertasi ini.

Pembantu Rektor II Universitas Brawijaya, Warkum Sumitro, S.H., M.H., yang banyak membantu dalam penyelesaian pendidikan S3 ini.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Sri Hayati, SH., MS. Yang telah memberikan fasilitas untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Suhariningsih, Ir., sebagai Wakil Direktur Bidang Akademik dan ex Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Program Doktor, Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, atas nasihat, dorongan semangat serta perhatian yang telah diberikan untuk menyelesaikan pendidikan doktor.

Dr. Ir. Bambang Irawan, M.S., sebagai Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Program Doktor, Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga; serta penguji pada ujian Kualifikasi, Proposal, Penilaian Naskah Disertasi dan ujian Disertasi Tahap I; atas saran dan masukannya untuk kesempurnaan disertasi ini.

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan untuk memperoleh dana Hibah Penelitian Program Doktor tahun 2009 sehingga penelitian untuk disertasi saya dapat terlaksana.

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Brawijaya, Prof. Dr. Siti Chuzaemi, Ir., MS. yang memberikan kesempatan untuk memperoleh dana Hibah Penelitian Fundamental tahun 2009 dan Hibah Penulisan Jurnal Internasional tahun 2009, sehingga sangat membantu dalam penyelesaian penelitian saya.

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Prof. Dr. Eddy Soeprayitno, Ir., M.S., mantan Dekan Prof. Dr. Soekoso, Ir., M.Sc., Pembantu Dekan I Dr. Ir.. Agus Tjahyono, MS. yang telah memberikan ijin, dorongan, dan bantuan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hartmut Kuhn, MD. beserta seluruh staf Laboratorium Biomolekuler, yang telah menerima serta memberikan kesempatan dan kepercayaan kepada saya untuk melakukan penelitian di Lab. Biomolekuler, Charite, Institut für Biochemie, Humboldt Universiteit, Berlin, Jerman.

Dr. Pavlos Chaitidis yang selalu memberikan semangat, membimbing dengan sabar dan membantu saya dalam penelitian genomik, Dr. Sabine dan Dr. Igor Ivanov yang membantu saya dalam penelitian proteomik.

Prof. Dr. Suhartati, dr., M.S., yang telah menguji di ujian Penilaian Naskah Disertasi dan Disertasi Tahap I, serta banyak memberikan koreksi, saran dan masukan untuk penyempurnaan naskah disertasi yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

Para penguji Kualifikasi, Proposal, Penilaian Naskah Disertasi dan ujian Disertasi Tahap I : Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh. M.S., Prof. Win Darmanto, Ph.D., , Dr. Ni'matuzahro, Dra., Moch. Amin Alamsjah, Ir., M.Si., Ph.D., Dr. Maya Shovitri, Ir., M.S. dan Dr. Moh. Amin, M.Si.; yang telah memberikan masukan untuk perbaikan naskah disertasi serta memperkaya pola pikir saya.

Kepala Laboratorium Gastroenteritis, Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, Wahyu Widayatiningsih, S. Si., M.Kes., yang telah memberikan ijin dan banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian. Bapak Heri Setyobekti, S.St.; laboran di Laboratorium Gastroenteritis, Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, dan Saudari Wiwik Dwi Purwadi, S.Si., M.Kes., yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada:

Rekan-rekan Program Doktor, Program Studi MIPA Universitas Airlangga angkatan 2007/2008. Terimakasih untuk kebersamaan dan dorongan semangatnya, semoga ikatan persahabatan ini tetap terjalin.



Sejawat di Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, terima kasih untuk kerjasama, bantuan dan dukungan moral yang telah diberikan selama ini.

Terimakasih terdalam saya haturkan kepada:

Kedua orang tua saya, Ibunda Masriah dan Ayahanda Roestam Effendi (Alm.), atas segala kasih, do'a, semangat dan teladan yang telah diberikan selama ini.

Yang terkasih, Diah Palupi Kusumawardani, S.E., terimakasih telah mendukung saya untuk menempuh pendidikan S3 ini. Pelita hati, Kevin Aditya Prathama dan Adinda Indira Diva Rahmadanti, yang selalu memberikan cahaya dan semangat dalam hidup saya.

Ibunda Hj. Suwidji Soegiarto dan keluarga, terimakasih untuk do'anya.

Dr. Imam Soewono, Sp.P.D. dan keluarga, yang selalu memberikan motivasi, semangat dan dukungan dalam menempuh pendidikan doktor ini.

Adik-adikku, Pandu Wiragama, S.E. dan Surya Permana, terima kasih untuk dukungan do'a dan semangatnya.

Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, terima kasih atas do'a dan dukungannya selama ini.

Semoga Allah SWT memberikan rahmat dan hidayahNya bagi kita semua, semoga disertasi ini bermanfaat.

# RINGKASAN

## RINGKASAN

Di berbagai tempat di dunia, serangan penyakit pada budidaya perairan sering dijumpai, kebanyakan adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri (khususnya bakteri bercahaya *V. harveyi*) dan virus. Kepadatan yang tinggi di bak pembenihan dan tambak menyebabkan penyebaran penyakit ini semakin luas. Di lingkungan akuatik dimana pemberian pakan kaya protein secara intensif akan meninggalkan sisa pakan, yang kemudian menjadi media yang sangat tepat untuk menumbuhkan bakteri dan virus

Masalah paling serius yang telah dilaporkan pada budidaya udang penaeid adalah akibat serangan vibriosis, dan *luminescent vibriosis* menjadi perhatian utama pada produksi udang di Asia. Serangan vibriosis terjadi bila kepadatan massa bakteri *Vibrio* telah mencapai kepadatan tertentu.

Kepadatan bakteri yang telah mencapai kuota tertentu karena komunikasi sel-sel intra dan inter species, memungkinkan bakteri untuk mengatur berbagai aktivitas biologi untuk berlaku seperti organisme multiselular. seperti virulensi, pembentukan biofilm, produksi antibiotik dan konjugasi

Bakteri telah mengembangkan berbagai macam "bahasa" untuk berkomunikasi dalam dan diantara species sehingga terjadi peningkatan massa bakteri. *Quorum sensing* (QS) adalah proses komunikasi sel-sel bakteri yang melibatkan produksi dan deteksi molekul-molekul penanda yang dapat berdifusi yang disebut *Autoinducer*. *Quorum sensing* dilakukan oleh berbagai macam species bakteri gram positif dan negatif untuk koordinasi *communal behavior*. Studi tentang sistem *quorum sensing* menjelaskan bahwa bakteri telah mengembangkan berbagai macam bahasa untuk berkomunikasi dalam dan diantara species..

Untuk mencegah terjadinya virulensi dilakukan upaya memutus komunikasi bakteri melalui sistem *quorum sensing* dengan memanfaatkan Lactonase. Lactonase adalah enzim yang diproduksi oleh beberapa species bakteri, yang menargetkan dan mengaktifkan *acylated homoserine lactones* (AHL). AHL-Lactonase akan menghidrolisa cincin homoserine Lactone dari sinyal AHL sehingga komunikasi bakteri tidak terjadi dan tidak terjadi peningkatan massa bakteri sehingga terjadinya virulensi dapat dicegah.

Melalui pengenalan mengenai cara komunikasi bakteri, maka diharapkan dapat mengembangkan cara pengendalian bakteri yang tidak selalu berbasis antibiotik, tetapi pada pendekatan "kekeluargaan" dengan mencegah terjadinya pengumpulan massa bakteri atau bila sudah telanjur terjadi pengumpulan massa, digunakan cara yang dapat merusak komunikasi bakteri. Dalam pendekatan ini tidak dilakukan usaha memberantas bakteri, tapi membiarkan bakteri hidup bersama selama perilakunya tidak destruktif, antara lain dengan cara menghambat *quorum sensing*-nya. Perusakan *quorum sensing* bakteri telah dirancang sebagai suatu strategi *anti-infective* yang baru dan beberapa teknik yang dapat dipergunakan untuk mengganggu *quorum sensing*.

Namun dalam penerapannya Lactonase tidak mudah untuk didapatkan, selain itu juga mahal. Untuk memenuhi keperluan akan Lactonase maka diupayakan cara untuk mempermudah mendapatkannya, yaitu melalui bioteknologi dengan upaya mengklon gen penyandi Lactonase untuk menghasilkan protein Lactonase rekombinan.

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui cara mengklon, ekspresi serta produksi Lactonase dari gen penyandi Lactonase yang terdapat pada DNA bakteri *P. aeruginosa* PAO1, sebagai kandidat inhibitor *quorum sensing* bakteri *Vibrio*. Sedangkan tujuan khusus yang diharapkan adalah : 1. Mengetahui karakter gen penyandi Lactonase, 2. Merancang plasmid rekombinan yang mengandung gen penyandi Lactonase, 3. Menganalisis ekspresi gen penyandi Lactonase dalam sistem *E. coli*., 4. Mencirikan protein Lactonase rekombinan asal *P. aeruginosa* PAO1 dalam

sistem *E. coli*, 5. Mengetahui aktivitas protein lactonase rekombinan terhadap substrat N-hexanoyl-L-homoserinelactone

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif laboratories, yang dilakukan di Charite, Institut für Biochemie, Humboldt Universiteit, Berlin, Jerman; dan sebagian lagi dilakukan di Lab., Gastroenteritis, TDC, universitas Airlangga, Surabaya; dari November 2008 sampai September 2009..

Hasil penelitian ini disusun berdasarkan tahapan penelitian sebagai berikut:

1) Karakterisasi Bakteri dan Konstruksi Plasmid dengan Gen Lactonase, 2) Kloning gen Lactonase pada vektor *E. coli* TOP10, M15 dan BL 21, dan 3) Ekspresi dan Purifikasi protein rekombinan Lactonase.

Dari hasil penelitian tahap pertama dapat diketahui bahwa gen penyandi Lactonase yang mempunyai panjang untaian sebesar 783 bp, Gen penyandi Lactonase dapat diisolasi dan di insersi pada plasmid pQE 9, menghasilkan plasmid *HaLS* dengan gen penyandi Lactonase di dalamnya.

Hasil penelitian tahap kedua memberikan hasil ketepatan transformasi gen Lactonase pada sel inang *E. coli* M15[pREP4] dibuktikan dengan pengujian dengan enzim restriksi *Sall* dan *PstI*. Kemudian dilanjutkan dengan transformasi pada inang *E. coli* BL21

Hasil penelitian tahap ke tiga menghasilkan protein Lactonase rekombinan dengan massa molekul protein 30 kDa, protein ini menunjukkan kesamaan 100% dengan *hypothetical protein* pada asam amino ke 2 sampai dengan ke 242, atau disebut juga sebagai *putative lactonase*. Protein ini memiliki bahan aktif Beta Lactamase yang terletak pada daerah asam amino ke 28 sampai asam amino ke 220, termasuk dalam famili *Metallo-beta-lactamase* memiliki sisi aktif pada asam amino Cys (Cysteine) untuk aktifitas sulfurtransferase. Protein Lactonase rekombinan dengan substrat N-hexanoyl-L-homoserinelactone-d3 (3 oxo-C6-HSL) memiliki aktifitas menghasilkan produk yang belum diidentifikasi..

Adapun saran yang dapat diberikan untuk hasil penelitian ini adalah: 1. Perlu dilakukan penelitian tentang produksi protein Lactonase rekombinan dengan spesies bakteri asal Indonesia, 2. Perlu dilakukan uji aktifitas protein Lactonase rekombinan lebih lanjut dengan berbagai macam substrat AHL-Lactonase yang sesuai, 3. Perlu dilakukan pengujian aktifitas protein Lactonase rekombinan secara langsung terhadap bakteri patogen yang menyerang budidaya perairan

# ABSTRACT

## SUMMARY

In all over the world, disease epidemic in aquaculture is happened commonly, most of them are caused by bacterial diseases (especially luminescence bacteria, *V. harveyi*) and virus. High density population in hatchery and fish pond make the disease spreading is getting huge. In aquatic environment where the high protein food was given intensively will let the food unconsumed, which will be a suitable media for growing of bacteria and virus.

The most serious problem which has said in penaeid shrimp culture is vibriosis attack, and luminescent vibriosis becomes a primary problem in shrimp production in Asia. Vibriosis will be appeared if *Vibrio* density has achieved a certain quorum.

If density has achieved a certain quorum because of intra and inter cell communication species, it's possible for bacteria to arrange certain biological activity which act like a multicellular organism, i.e. virulence, biofilm formation, antibiotics production and conjugation.

Bacteria has developed multiple languages to make communication inter and intra species caused increasing density. Quorum sensing (QS) is a bacterial cells communication process which involving production and detection of encoding molecules signal which can diffuse, called Autoinducer. QS was done by gram positive and negative bacteria species to make a communal behavior communication.. Study about QS system explains that bacteria has develop multiple languages to make inter and intra species communication.

Avoiding virulence can be done by cutting the bacteria communication system through inhibiting quorum sensing system using Lactonase. Lactonase is an enzyme produced by several bacteria species which targeted and activated Acylated Homoserine Lactones (AHL). AHL-Lactonase will hydrolyzed the homoserine Lactone ring from AHL signal resulting bacterial communication and density increasing can not be happened otherwise the bacterial virulence can be protected.

But in using Lactonase, it's hard to find it and expensive. In order to find the Lactonase easily, cloning of Lactonase encoding gene can be used as an alternative to get Lactonase more available.

Through introduction of bacterial communication way, it hope to develop the way to inhibit the bacteria virulence which not always based on antibiotics, but on the familiar approach with preventing the bacterial mass collection or if already happen, can be used to destruct the bacterial communication. In this approach it doesn't kill the bacteria, but let the bacteria stay alive as long it is not destructive, Destruction of bacterial QS has been designed as a new anti-infective strategy and several technology can be used to disturb QS.

General objective of this research was to know how to cloned, expressed and produced Lactonase from Lactonase encoding gene in *P. aeruginosa* PAO1, as a *Vibrio*'s QS inhibitor candidate. While the main objectives of this research was to produce plasmid and get the useful of Lactonase as a recombinant protein were: 1. Knowing character of Lactonase encoding gene, 2. Constructing recombinant plasmid which include Lactonase encoding gene, 3. Analyzing Expression of Lactonase encoding gene in *E. coli* system, 4. Characterizing recombinant Lactonase protein from *P. aeruginosa* PAO1 in *E. Coli* system, 5. Knowing the recombinant Lactonase activity to N-hexanoyl-L-homoserinelactone substrate.

This research was a descriptive laboratories research, which has done in Charite, Institut fur Biochemie, Berlin, Germany; and at the last part in Gastroenteritis Lab.,

Infection Disease Centre, Airlangga University, Surabaya; from November 2008 to September 2009..

The result of this research was constructed based on the stepping research, i.e.: 1) Bacterial characterization and plasmid construction with Lactonase encoding gene, 2) Cloning of Lactonase encoding gene into *E. coli* TOP10, *E. coli* M15 and BL 21, 3) Purification and expression of recombinant protein, Lactonase

Result from the first experiment can be known that Lactonase encoding gene has a long strand of 783 bp, it's a *halS* gene, *halS* gene was isolated and inserted into pQE 9 plasmid, resulting *HaLS* plasmid with Lactonase encoding gene inside.

The second experiment proved that the Lactonase encoding gene was reformed correctly in *E. coli* M15[pREP4], after treated with restriction enzymes, *Sall* and *PstI*. The plasmid was also transformed to another host vector, *E. coli* BL21.

The third experiment produced recombinant Lactonase protein with molecule mass of 30 kDa, this protein was 100% homolog with hypothetical protein from the second amino acids to the 242<sup>nd</sup> amino acids and called as a putative lactonase. This protein Beta Lactamase in 28-220 amino acids region, it belongs to *Metallo-beta-lactamase* family. Its active site is Cys (Cysteine) sulfurtransferase activity. Recombinant Lactonase protein has an activity with N-hexanoyl-L-homoserinelactone (3 oxo-C6-HSL) producing a substance which has not been identified...

While suggestions for this research are : 1. Need to do another Lactonase research wich come from local bacteria species, 2. Need to make activity test for recombinant Lactonase protein as well to another suitable AHL-Lactonase substrates. 3. Need to do a direct activity test for this recombinant Lactonase protein to pathogenic bacteria in aquaculture.

## ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF LACTONASE GENE FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1, AS A CANDIDATE OF AUTOINDUCER QUORUM SENSING INHIBITOR

MOHAMAD FADJAR

Lactonase is an enzyme produced by several bacteria species which targeted and activated *acylated homoserine lactones* (AHL). AHL-Lactonase will hydrolyze the homoserine Lactone ring from AHL signal which effected to bacterial communication and density increasing can not be happened, otherwise the bacterial virulence can be protected. In order to serve the demand of Lactonase, Cloning of Lactonase encoding gene from *P. aeruginosa* PAO1 was done and transformed to *E. coli* M15 [pREP4]. The exact Lactonase gene cloning was proved using restriction enzyme test of *Sall* and *PstI*. Conclusions of this research are :1) The long strand of the DNA of AHL-Lactonase encoding gene from *P. aeruginosa* PAO1 was 783 bp, it is a *hslS* gene, 2). The exact cloning of Lactonase gene in plasmid construction with Lactonase encoding gene in *E. coli* M15[pREP4] host cell was prove through *Sall* and *PstI* restriction enzyme test, 3) Recombinant Lactonase protein was a putative Lactonase. It has a molecule protein mass of 30 kDa measured through SDS-PAGE and Western blot, 5) Activity test of recombinant Lactonase protein using N-hexanoyl-L- homoserine lactone (3 oxo-C6-HSL) substrate produced a product, while the exact compound was not known yet. While suggestions for this research are : 1. Need to do another Lactonase research which come from local bacteria species, 2. Need to make activity test for recombinant Lactonase protein as well to another suitable AHL-Lactonase substrates. 3 Need to do a direct activity test for this recombinant Lactonase protein to pathogenic bacteria in aquaculture.

Key words : cloning, Lactonase, *P. Aeruginosa* PAO1. quorum sensing



# DAFTAR ISI

## DAFTAR ISI

M I L I K  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A

Halaman

HALAMAN SAMPUL DEPAN .....	i
HALAMAN SAMPUL DALAM .....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN .....	iii
HALAMAN PENETAPAN PANITIA .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
RINGKASAN .....	ix
SUMMARY .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
DAFTAR ISI .....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xviii
DAFTAR GAMBAR .....	xix
DAFTAR LAMPIRAN .....	xx
DAFTAR SINGKATAN .....	xxi
<b>BAB I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1 Tujuan Umum .....	5
1.3.2 Tujuan Khusus .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1 Ekspresi Gen Bakteri.....	7
2.2 Rekayasa Genetika dan Kloning Gen Penyandi Lactonase .....	9
2.3 Purifikasi Protein Lactonase Rekombinan .....	16
2.3 <i>Quorum Sensing</i> .....	18
2.4 Inhibitor <i>Quorum Sensing</i> .....	27
2.5 Laktonase .....	30
2.6 Vibriosis .....	30
2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 .....	34
<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN .....</b>	<b>36</b>
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>41</b>
4.1 Rancangan Penelitian .....	41
4.2 Tempat Penelitian .....	41
4.3 Waktu Penelitian .....	41

4.4 Tahap I : Karakterisasi Bakteri Sumber Gen Lactonase .....	41
4.2.1 Bahan .....	41
4.2.2 Peralatan Penelitian .....	42
4.2.3 Metode .....	42
4.5 Tahap II : Kloning gen penyandi Lactonase ( <i>halS</i> ) di <i>E. coli</i> TOP10 .....	46
M15 , dan BL21	
4.5.1 Bahan dan Alat .....	46
4.5.2 Metode .....	46
4.6 Tahap III : Ekspresi dan Purifikasi Protein.....	51
4.6.1.Bahan .....	51
4.6.2 Alat .....	52
4.6.3 Metode .....	53
 BAB V. HASIL PENELITIAN .....	 60
5.1 Karakterisasi Bakteri dan Konstruksi Plasmid dengan Gen Penyandi Lactonase .....	60
5.2 Kloning gen Lactonase pada vector <i>E. coli</i> TOP10, M15[pREP4] dan BL 21.....	63
5.3 Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan Lactonase .....	66
 BAB VI. PEMBAHASAN .....	 71
6.1 Karakterisasi Bakteri dan Konstruksi Plasmid dengan Gen Penyandi Lactonase .....	71
6.2 Kloning gen Lactonase pada vector <i>E. coli</i> TOP10, M15[pREP4] dan BL 21.....	73
6.3 Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan Lactonase .....	74
 BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN .....	 81
 DAFTAR PUSTAKA .....	 82
 LAMPIRAN .....	 94
 DAFTAR PUBLIKASI .....	 113

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Langkah umum dan Komponen Kunci Sistem Quorumsensing Type AHL (Zhang <i>et al.</i> , 2007, 2004) .....	21
Tabel 2.2 Penyakit-penyakit pada Hewan Budidaya yang disebabkan oleh <i>V. harveyi</i> (Termasuk Sinonim Yuniornya <i>V. caechariae</i> ) ( Defoidt <i>et al.</i> , 2007).....	33

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Teknik PCR (Brown, 2006) .....	11
Gambar 2.2 Langkah dasar kloning gen (Brown, 2006) .....	14
Gambar 2.3 Konstruksi N-terminal tag (Anonymous,2003).....	14
Gambar 2.4 Vektor pQE untuk konstruksi N-terminal 6xHistag (Anonymous, 2003)	15
Gambar 2.5 Sekuen penggunaan 6X His tag (Anonymous, 2003) .....	15
Gambar 2.6 Modifikasi dengan penyisipan sekuen dari PCR (Anonymous, 2003)....	16
Gambar 2.7 Ni-NTA (Anonymous, 2003) .....	17
Gambar 2.8 Interaksi residu terdekat pada protein 6Xhis tag dengan matrik Ni-NTA (Anonymous, 2003) .....	17
Gambar 2.9 Dua mekanisme umum <i>quorum sensing</i> mikroba.....	20
Gambar 2.10 Contoh signal <i>quorum-sensing</i> mikroba (Dong <i>et al.</i> , 2007) .....	21
Gambar 2.11 <i>Quorum Sensing</i> (QS) <i>V. Harveyi</i> (Neiditch <i>et al.</i> , 2005) .....	25
Gambar 2.12 AHL sebagai <i>autoinducer</i> bakteri (Waters and Bassler, 2005) .....	30
Gambar 2.13 Degradasi AHL oleh AHL-lactonase, PON dan AHL-acylase (Dong <i>et al.</i> , 2007) .....	30
Gambar 2.13 Struktur AHL dan sisi yang bisa didegradasi oleh enzim (Dong and Zhang, 2005) .....	31
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian .....	39
Gambar 4.1. Skema Penelitian Tahap I .....	44
Gambar 4.2. Skema Penelitian Tahap II .....	47
Gambar .4.3 Skema Penelitian Tahap III .....	55
Gambar 5.1. DNA bakteri <i>P. aeruginosa</i> PAO1 ( <a href="http://www.pseudomonas.com">www.pseudomonas.com</a> ) .....	60
Gambar 5.2. Amplikon Gen Penyandi AHL-Lactonase .....	61
Gambar 5.3. Hasil Elektroforesis Kloning Gen Lactonase dengan Enzim Restriksi <i>PstI</i> .....	62
Gambar 5.4. Hasil <i>alignment</i> 16S rRNA <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	63
Gambar 5.5. Hasil Elektroforesis Restriksi dengan <i>EcoRI</i> dan <i>Sall</i> .....	64

Gambar 5.6. Hasil Elektroforesis Kloning Gen Lactonase dengan Enzim Restriksi (a) <i>Sall</i> dan (b) <i>PstI</i> .....	. 65
Gambar 5.7. Sekuen sample no 1 .....	66
Gambar 5.8. Sekuensing protein Lactonase rekombinan .....	. 67
Gambar 5.9 . Protein Lactonase dengan SDS-PAGE .....	68
Gambar 5.11 Western Blot .....	69
Gambar 5.12 Hasil Analisis HPLC Lactonase dengan Substrat N-hexanoyl-L- Homoserinelactone-d3 (3-oxo-C6-HSL) pada panjang gelombang 254 Nm .....	70

## DAFTAR LAMPIRAN

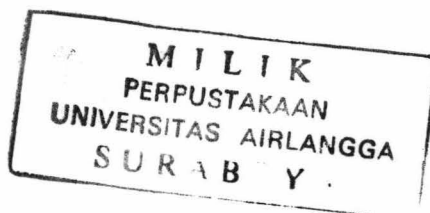
	Halaman
Lampiran 1 Phenogram Skuensing Kloning DNA AHL-Lactonase Sampel No 1 .....	94
Lampiran 2 Phenogram Skuensing Kloning DNA AHL-Lactonase Sampel No 3 .....	97
Lampiran 3 Phenogram Skuensing Kloning DNA AHL-Lactonase Sampel No 4 .....	100
Lampiran 4 Hasil Skuen Plasmid dengan Gen Lactonase Sampel 1 .....	103
Lampiran 5 Hasil Skuen Plasmid dengan Gen Lactonase Sampel 3 .....	104
Lampiran 6 Hasil Skuen Plasmid dengan Gen Lactonase Sampel 4.....	105
Lampiran 7 Pengukuran Protein dengan Metode Bradford .....	106
Lampiran 8 Hasil Pencarian Sekuen Protein dengan <i>blastx</i> .....	107
Lampiran 9. Hasil Pencarian Residu dari Sekuen Protein 110 .....	108
Lampiran 10. Hasil Pencarian Sisi Aktif .....	109

## DAFTAR SINGKATAN

acyl-ACP	: Acylated acyl carrier protein
AHL	: Acylated Homoserine Lactone
AI	: Autoinducer
AIP	: Autoinducer Peptide
ABC	: ATP-binding cassette
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: base pair
CBBG	: Coomassie brilliant blue
cfu	: colony per unit
DNA	: deoksiribonucleic acids
DPD	: Dihidroksi pentanedion
<i>et al.</i>	: <i>et alii</i> (Latin), dan lain-lain
<i>HalS</i>	: Heckmann Lactonase
His-tag	: Histidine-tag
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HSL	: Homoserine Lactone
IDA	: Iminodiacetic acids
<i>i.e.</i>	: <i>idest</i> (Latin), dengan kata lain
<i>ig G</i>	: imunoglobulin G
IPTG	: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
kDa	: kilo Dalton
Kb	: kilo base
LB medium	: Luria Bertani medium
NCBI	: National Centre for Biotechnological Information
Ni-NTA	: nickel-nitrilotriacetic acid
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PON	: paraoxonase
PROTEKAN	: Program Intensifikasi Perikanan
QS	: Quorum sensing
SAH	: S-adenosyl methylation
SAM	: S-adenosyl methionine
SDS-PAGE	: Sodium Dodecylsulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
SRH	: S-ribosyl homocysteine
rpm	: rotation per minute
RNA	: ribonucleic acids
rRNA	: ribosomal ribonucleic acids



# BAB 1 PENDAHULUAN

**BAB I  
PENDAHULUAN****1.1. Latar Belakang**

Peluang pengembangan usaha kelautan dan perikanan Indonesia masih memiliki prospek yang baik. Potensi ekonomi sumber daya kelautan dan perikanan dapat dimanfaatkan untuk mendorong pemulihan ekonomi diperkirakan sebesar US\$ 82 miliar per tahun. Potensi tersebut meliputi: potensi perikanan tangkap sebesar US\$15,1 miliar per tahun, potensi budidaya laut sebesar US\$46,7 miliar per tahun, potensi peraian umum sebesar US\$1,1 miliar per tahun, potensi budidaya tambak sebesar US\$10 miliar per tahun, potensi budidaya air tawar sebesar US\$5,2 miliar per tahun, dan potensi bioteknologi kelautan sebesar US\$4 miliar per tahun. (Muhammad, 2010).

Sampai saat ini, udang masih merupakan salah satu penopang utama produksi perikanan budidaya di Indonesia. Proyeksi hasil perikanan budidaya, terutama udang telah ditargetkan dalam Program Intensifikasi Perikanan (PROTEKAN) 2003, sebesar US \$ 2,5 milyar, yang menjadi tumpuan harapan sebagai penyumbang devisa negara terbesar dari sektor perikanan. Target tersebut hanya dapat dicapai apabila sebagian besar potensi yang ada dapat diaktualisasikan, salah satunya melalui program intensifikasi. Program ini membutuhkan dukungan teknologi yang mantap. Bahkan ketersediaan teknologi yang mantap menjadi tiang utama keberhasilan intensifikasi (Nurdjana, 2007).

Salah satu faktor yang menghambat keberhasilan intensifikasi dalam budidaya perairan adalah terjadinya serangan penyakit. *Food and Agriculture Organization* (FAO) melaporkan, bahwa wabah penyakit menjadi perhatian utama terhadap perkembangan sektor perikanan budidaya, dengan perkiraan kerugian global karena penyakit mencapai kisaran US \$ 3 milyar per tahun (Subasinghe *et al.*, 2001). Akan tetapi, masalah paling serius yang telah dilaporkan pada budidaya udang penaeid adalah akibat serangan

vibriosis, yang menjadi perhatian utama pada produksi udang di Asia (Austin and Zhang, 2006).

Pada pembenihan udang, masalah utama yang dihadapi adalah tingginya kematian larva selama pemeliharaan yang disebabkan vibriosis (bakteri bercahaya, *Vibrio harveyi*) (Mariyono *et al.*, 2002). Kasus ini tampaknya khas untuk daerah tropis (Sunaryo dan Mariam, 1986; Baticados *et al.*, 1990; Lavilla–Pitogo *et al.* 1990; Lavilla–Pitogo *et al.* 1992), Pada budidaya udang di Maros, Sulawesi Selatan, dilaporkan setelah terjadinya serangan *Vibrio* akan berlanjut dengan munculnya serangan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) (Mangampa dan Suwoyo, 2009), yang menyebabkan 100% kematian udang dalam waktu 3 sampai 10 hari sejak diserang (Lou *et al.*, 2007 dalam <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/120>).

Vibriosis pada udang dan ikan disebabkan oleh faktor virulensi yang diekskresikan oleh bakteri *Vibrio*. Pada *Vibrio anguillarum* (Norgvist *et al.*, 1990), *V. vulnificus* (Kothary and Kreger. 1987), *V. proteolyticus* (David *et al.*, 1992), *zink metalloprotease* merupakan faktor virulensi penting, yang menyebabkan kerusakan jaringan pada ikan dan udang. Pada *V. harveyi* faktor virulensi yang berperan adalah fosfolipase, hemolysin, protease (cysteine protease, metalloprotease, serine protease), adanya *bacteriophage*, *bacteriocin-like substance* (BLIS) dan *chitinase* (Arachchige, 2010)..

Sekresi faktor virulensi berhubungan dengan kepadatan bakteri. Perubahan kepadatan sel ini dikontrol oleh bakteri secara terpadu melalui *quorum sensing*. *Quorum sensing* adalah proses komunikasi sel bakteri yang melibatkan produksi dan deteksi molekul penanda yang dapat berdifusi, yang disebut sebagai *autoinducer* (Lazdunski *et al.*, 2004).

Studi tentang sistem *quorum sensing* menjelaskan bahwa bakteri telah mengembangkan beragam "bahasa" untuk berkomunikasi secara intra dan inter species sehingga memungkinkan bakteri untuk mengatur berbagai aktivitas biologi yang berlaku

seperti organisme multiseluler (Schauder and Bassler, 2001). Fenomena *quorum sensing* bakteri tidak hanya terjadi pada *Vibrio*, tapi ternyata hampir semua jenis bakteri Gram negatif menampilkan *quorum sensing* sebagai salah satu pengatur perilakunya, diantaranya mengeluarkan faktor virulensi yang menyebabkan terjadinya vibriosis.

Saat ini, perusakan *quorum sensing* bakteri telah dirancang sebagai suatu strategi anti-infektif yang baru untuk mengatasi vibriosis, serta beberapa teknik lain yang dapat dipergunakan dalam budidaya perairan. Teknik ini menekankan pada :(1) penghambatan sinyal biosintesis molekul, (2) *quorum sensing* antagonis (termasuk yang terjadi secara alami sebagaimana sintesa *furanone*, molekul antagonis *quorum sensing* dan bahan aktif dari tumbuhan dan algae), (3) inaktivasi secara kimiawi sinyal *quorum sensing* oleh antimikrobal halogen teroksidasi, (4) biodegradasi molekul sinyal oleh bakteri *lactonase* dan bakteri eukaryotic *acylase*, dan (5) aplikasi *quorum sensing* yang agonis (Defoirdt *et al.*, 2004).

Pada penelitian ini digunakan *quorum sensing* untuk mencegah timbulnya penyakit dengan cara membuat molekul antagonis yang mampu melemahkan virulensi melalui blokade komunikasi sel bakteri (Williams *et al.*, 2000) dengan *AHL-Lactonase* sebagai inhibitor *autoinducer quorum sensing*. Hal ini berdasarkan fakta bahwa *AHL-Lactonase* adalah enzim yang khusus mendegradasi *AHL* dengan cara memutus ikatan *lactone* dan telah terbukti menghambat *quorumsensing* bakteri, serta menjadi strategi untuk mencegah dan mengontrol infeksi bakteri (Dong *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2001).

Mengingat ketersediaan *Lactonase* yang sangat terbatas, di alam tidak semua bakteri menghasilkan *Lactonase*; sedangkan produk komersilnya tidak mudah diperoleh dan mahal harganya, sehingga untuk memenuhi kebutuhan akan *Lactonase* diperlukan cara untuk dapat memproduksinya antara lain melalui teknik rekayasa genetika seperti yang dilakukan pada penelitian ini. Melalui teknik rekayasa genetika dengan sedikit

bahan yang dipergunakan di awal dapat diperoleh protein Lactonase rekombinan yang banyak dan homogen.

Protein *Lactonase* rekombinan pada penelitian ini diperoleh melalui proses kloning gen penyandi *Lactonase* yang diperoleh dari DNA bakteri *P. aeruginosa* PAO1, dengan teknik PCR. Dogma sentral yang diusulkan oleh Francis Crick mengatakan bahwa informasi yang terkandung di dalam DNA dapat ditranskripsikan menjadi RNA dan informasi di dalam RNA dapat ditranslasikan menjadi protein. Adapun tahapan yang harus dilakukan untuk mendapatkan protein *Lactonase* rekombinan adalah dengan melakukan karakterisasi bakteri sumber gen *Lactonase* dan kloning gen penyandi *Lactonase* (*haIS*) di sel inang *E. coli* selanjutnya dilakukan ekspresi dan purifikasi protein.

Gen penyandi *Lactonase* untuk penelitian ini diperoleh dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Bakteri *P. aeruginosa* memiliki sistem terbaik untuk komunikasi sel bakteri, dan untuk melakukan komunikasi, bakteri *P. aeruginosa* PAO1 diketahui memiliki gen protein *haIS* yang berperan dalam komunikasi interselular (Heckmann, 2005).

Ekspresi protein *Lactonase* rekombinan yang dihasilkan diuji aktivitasnya dengan menggunakan salah satu substrat *AHL-Lactonase*, yaitu *N-hexanoyl-L-homoserine lactone*. Substrat *N-hexanoyl-L-homoserine lactone* yang dipilih berdasarkan perannya dalam proses bioluminensi pada bakteri *V. fischeri*. (Eberhard *et al*, 1981). *AHL-Lactonase* menghidrolisis sinyal AHL rantai pendek dan panjang dengan efisiensi yang sama (Wang *et al*. 2004). Selain itu enzim ini bekerja baik pada empat macam substrat AHL, yaitu C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, dan 3-oxo-C12-HSL secara efektif (Dong *et al.*, 2000). Hal yang sama dijumpai pula pada bakteri *V. harveyi* yang menghasilkan bioluminensi setelah mencapai kepadatan tertentu sebelum menyerang udang, sehingga kesamaan ini dipakai sebagai model dalam penelitian ini.

Penelitian ini bertujuan untuk dapat menghasilkan protein *Lactonase* rekombinan, sebagai kandidat inhibitor *quorum sensing* bakteri *Vibrio*, dengan cara mengisolasi dan mencirikan gen penyandi *Lactonase* dari bakteri *P. aeruginosa* PAO1, mempurifikasi serta mengekspresikannya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang maka dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah karakter gen penyandi *Lactonase*?
2. Apakah gen penyandi *Lactonase* dapat diisolasi dengan metode PCR dan diklon?
3. Bagaimanakah karakter gen penyandi *Lactonase* dari *P. aeruginosa* PAO1 dalam sistem ekspresi di *E. coli*?
4. Bagaimanakah keberhasilan ekspresi protein *Lactonase* rekombinan dalam sistem *E. coli*?
5. Bagaimanakah aktivitas protein *Lactonase* rekombinan terhadap substrat *N-hexanoyl-L-homoserine lactone*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mencirikan gen penyandi *Lactonase* dari bakteri *P. aeruginosa* PAO1, serta mengekspresikan protein *Lactonase* rekombinan, sebagai kandidat inhibitor *quorum sensing* bakteri *Vibrio*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus adalah :

1. Mendapatkan karakter gen penyandi *Lactonase*
2. Menghasilkan plasmid rekombinan yang mengandung gen penyandi *Lactonase* melalui proses isolasi dan kloning

3. Menganalisis ekspresi gen penyandi *Lactonase* dalam sistem *E. coli*.
4. Mendapatkan karakter protein *Lactonase* rekombinan asal *P. aeruginosa* PAO1 dalam sistem *E. coli*
5. Mengetahui aktivitas protein *Lactonase* rekombinan terhadap substrat *N-hexanoyl-L-homoserine lactone*

#### 1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi ilmu pengetahuan : memberikan suatu informasi dasar tentang protein *Lactonase* rekombinan yang diekspresikan oleh gen penyandi *Lactonase* yang berasal dari bakteri *P. aeruginosa* PAO1, serta teknologi pencegahan penyakit bakterial dengan protein melalui cara inhibitasi *quorum sensing*.
2. Bagi institusi dan masyarakat: terutama bagi yang terkait dengan dunia perikanan, akan memberikan suatu informasi tentang cara lain pencegahan penyakit bakterial pada budidaya perairan melalui penghambatan komunikasi bakteri menggunakan *Lactonase* untuk mencegah terjadinya penyakit bakterial, meningkatkan kelulushidupan serta meningkatkan produksi budidaya perairan..
3. Bagi industri yang berhubungan dengan kesehatan dan bioteknologi , akan terbuka peluang untuk memproduksi protein *Lactonase* rekombinan karena sampai saat ini produk *Lactonase* masih sulit diperoleh dan mahal, sehingga dapat menjadi komoditi yang memiliki nilai ekonomi tinggi untuk diproduksi dimasa mendatang.

# BAB 2

# TINJAUAN PUSTAKA



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ekspresi Gen Bakteri

DNA merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan. Informasi genetik disusun dalam bentuk kodon (*codon*) yang berupa tiga pasang basa nukleotida. Gen dari organisme tersusun dari DNA. DNA dan RNA adalah molekul yang berbentuk seperti rantai, tersusun dari subunit yang disebut nukleotida (Weaver, 2002; Yuwono, 2005).

Struktur molekul DNA pertamakali diungkapkan oleh James Watson dan Francis Crick pada tahun 1953 berdasarkan foto difraksi sinar X yang dibuat oleh Rosalind Franklin dan Maurice Wilkins. DNA memiliki struktur *double helix* dengan rangka gula-fosfat di luar dan sepasang basa di dalam. Pasangan basanya adalah: adenine (A), dengan thymine (T), dan guanine (G) dengan cytosine (C) (Weaver, 2002).

Genom prokaryot tersusun atas banyak unit gen. Secara umum struktur lengkap gen pada bakteri terdiri atas tiga bagian utama, yaitu: (1) *promoter*, (2) bagian struktural (*coding region*), dan (3) *terminator*. *Promoter* adalah bagian gen yang berfungsi sebagai pengatur proses ekspresi genetik (transkripsi) bagian struktural. Bagian ini adalah bagian yang akan dikenali pertama kali oleh RNA polimerase dan protein regulator sebelum proses transkripsi (sintesis RNA) dimulai. Bagian struktural adalah bagian gen yang membawa kode genetik yang akan ditranskripsi dan kemudian ditranslasi. Bagian *terminator* adalah bagian gen yang berperan dalam proses penghentian transkripsi (Yuwono, 2005).

Memproduksi protein dari informasi suatu gen DNA memerlukan proses dua langkah. Langkah pertama adalah transkripsi, dan yang kedua adalah translasi (Weaver, 2002). Transkripsi adalah proses penyalinan kode genetik yang ada pada urutan DNA menjadi molekul RNA. Transkripsi adalah proses yang mengawali ekspresi sifat genetik yang nantinya akan muncul sebagai fenotip. Molekul RNA yang

disintesis dalam proses transkripsi pada garisnya dapat dibedakan menjadi tiga kelompok molekul RNA, yaitu: (1) mRNA (*mesenger RNA*), (2) tRNA (*transfer RNA*), dan (3) rRNA (*ribosomal RNA*). Molekul mRNA adalah RNA yang merupakan salinan kode genetik pada DNA yang dalam proses selanjutnya (yaitu proses translasi) akan diterjemahkan menjadi urutan asam amino yang menyusun suatu polipeptida atau protein tertentu. Molekul tRNA adalah RNA yang berperan membawa asam amino spesifik yang akan digabungkan dalam proses sintesis protein (translasi). Molekul rRNA adalah RNA yang digunakan untuk menyusun ribosom, yaitu suatu partikel di dalam sel yang digunakan sebagai tempat sintesa protein (Yuwono, 2005)..

Translasi adalah proses penerjemahan urutan nukleotida yang ada pada molekul mRNA menjadi rangkaian asam amino yang menyusun suatu polipeptida atau protein (Yuwono, 2005). Hanya molekul mRNA yang akan ditranslasi. Molekul mRNA merupakan transkrip (salinan) urutan DNA yang menyusun suatu gen dalam bentuk ORF (*open riding frame/kerangka baca terbuka*).

Gen bakteri dikonstruksi untuk berfungsi pada laju variabel yang tinggi, sehingga bakteri membuat molekul mRNA pada tingkatan tertentu jika gen menerima sinyal dari luar untuk memulai aksi. Komponen yang menghantarkan sinyal ini disebut *inducer*, sedangkan komponen yang menghambat sinyal disebut *repressor*. *Repressor* dan *inducer* mengontrol fungsi gen. Hasil penelitian Jacques Monod dan François Jacob menunjukkan bahwa: 1) molekul spesifik *repressor* yang ada menempel pada dekat permukaan gen pada sisi spesifik yang disebut operator, dengan menempel pada sisi operator DNA, secara langsung mencegah sintesa mRNA; 2) *inducer* yang melekat pada *repressor* akan mencegah *repressor* melekat pada operator, sehingga *repressor* tidak diaktifkan dan mRNA terbentuk (Watson *et al.*, 1992). Terbentuknya mRNA pada proses transkripsi akan dilanjutkan dengan proses translasi hingga terjadi sintesa protein. Fenomena *repressor* dan *inducer* inilah yang menjadi dasar dari penelitian ini, dimana *AHL-Lactonase* menjadi *repressor* yang menghambat *autoinducer quorumsensing* bakteri.

## 2.2 Rekayasa Genetika dan Kloning Gen Penyandi Lactonase

Pada tahun 1971-1973 riset tentang genetika kembali bergerak, pada saat itu digambarkan sebagai suatu revolusi dalam percobaan biologi. Metode baru dikembangkan, memungkinkan eksperimen yang sebelumnya tidak mungkin direncanakan dan dilakukan, akhirnya bisa berlangsung sukses. Metode ini, dinamakan teknologi rekombinan DNA atau rekayasa genetika, dan intinya adalah proses kloning gen (Brown, 2006).

Gen adalah unit molekul DNA atau RNA dengan panjang minimum tertentu yang membawa informasi mengenai urutan asam amino yang lengkap suatu protein atau yang menentukan struktur lengkap suatu molekul rRNA (RNA ribosom) atau tRNA (*transfer RNA*) (Yuwono, 2005).

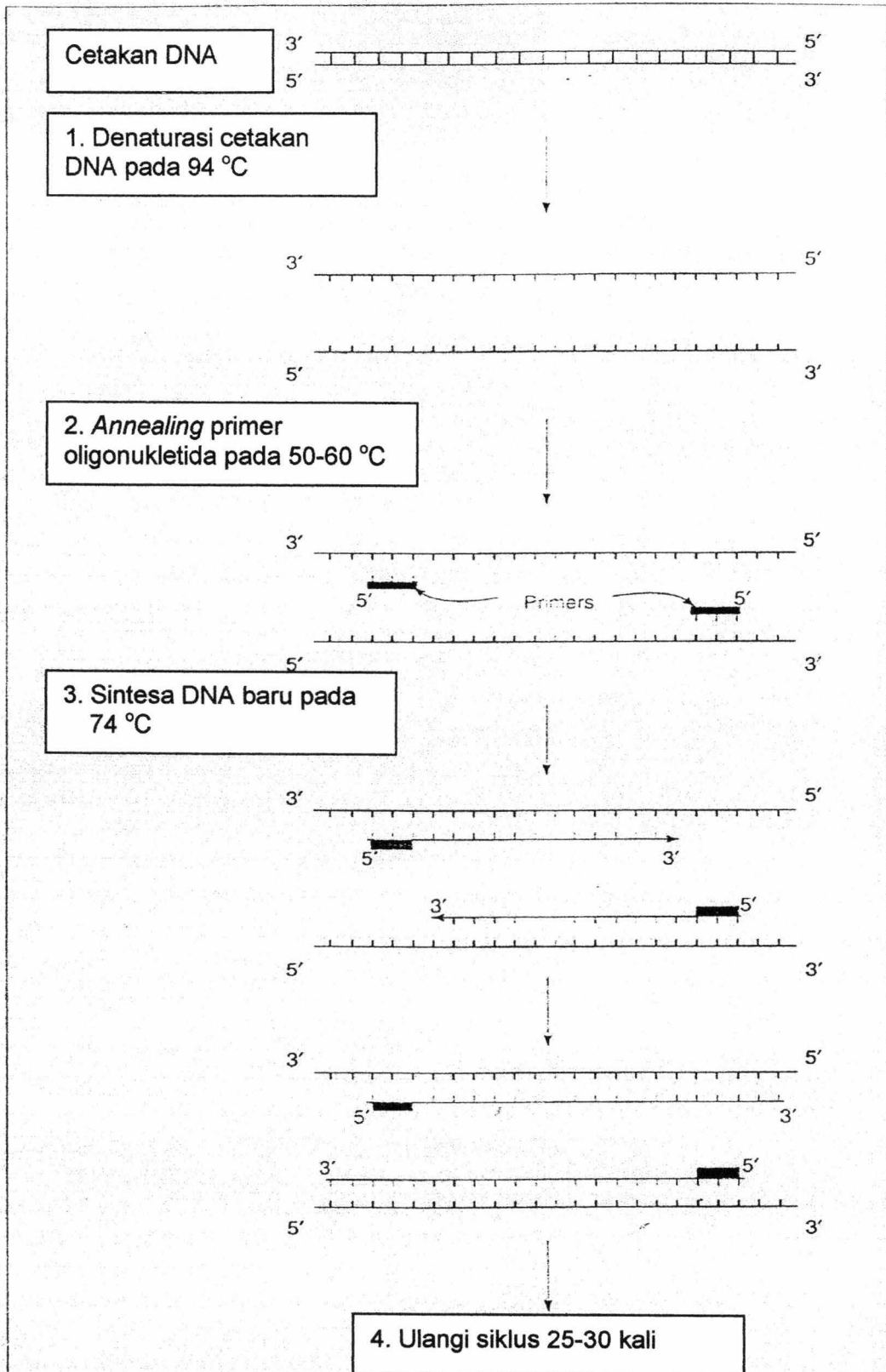
Klon adalah suatu kelompok sel atau organisme yang identik (Weaver, 2002). Prosedur umum pada percobaan kloning gen adalah menempatkan gen asing ke sel bakteri, mengisolasi sel individu, dan menumbuhkan koloninya.

Kloning gen Lactonasi dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yaitu merupakan suatu metode enzimatik *in vitro* yang dipergunakan untuk menghasilkan gugus DNA yang spesifik dalam jumlah besar dan waktu singkat. Metode PCR ditemukan oleh Karel Mullis pertama kali pada tahun 1985 dan telah menghasilkan penelitian dan pengembangan dalam bidang kesehatan dan kedokteran untuk memahami berbagai patogenesis maupun diagnosis penyakit (Mullis, 1986).

Teknik PCR ini berkembang dari konsep replikasi DNA, yaitu target DNA yang spesifik akan digunakan sebagai *template* (cetakan) dan akan diperbanyak secara *in-vitro* dengan menggunakan enzim DNA polymerase melalui proses denaturasi yaitu dua oligonukleatida yang berfungsi sebagai primer akan menempel pada proses *annealing* pada kedua pita DNA komplementer. Selanjutnya dilakukan tahap ekstensi pada berbagai suhu yang berbeda secara simultan dalambeberapasiklus sehingga diperoleh amplifikasi target DNA spesifik mencapai (jumlah siklus) copy

DNA atau dapat mencapai jutaan perbanyak DNA target dalam beberapa jam (Crowford, 1998)..

Teknik PCR dimulai dengan suatu bahan yang terdiri atas pita ganda DNA (*double stranded DNA*) kemudian sejumlah primer ditambahkan masing-masing dengan sekuen pada salah satu ujung target daerah yang akan diamplifikasi. Disamping itu ditambahkan pula enzim termostabil *Taq DNA polymerase* dan dioksiribonukleotida trifosfat (dNTPs). Pada siklus pertama dilakukan denaturasi dengan suhu 95 °C untuk memisahkan pita ganda DNA kemudian dilakukan pendinginan sampai suhu 60 °C (*annealing primer*) sehingga primer 1 dan 2 masing-masing mengadakan hibridisasi dengan pasangan komplementernya pada daerah target DNA, selanjutnya ditambahkan *Taq DNA polymerase* pada suhu 60 °C. Pada tahap ekstensi masing-masing primer diharapkan tepat pada ujung 3' agar diperoleh panjang dan konsentrasi DNA yang akan diperbanyak. Tahap ekstensi PCR dengan waktu 30 detik pada suhu 72 °C sudah cukup menghasilkan 400-500 pasang basa dan ditambah ekstra ekstensi selama 1 menit dapat menghasilkan 2 kb. Analisis hasil PCR dapat digunakan elektroforesis gel dengan menggunakan gel agarosa poliakrilamid sesuai dengan ukuran DNA yang akan dianalisis. Pada waktu elektroforesis gel PCR diwarnai dengan etidium bromide, dan selanjutnya DNA dilihat dengan menggunakan sinar ultra violet, difoto dengan menggunakan foto Polaroid. (Lodish *et al.*, 2000). Gambar teknik PCR (Brown, 2006) disajikan pada Gambar 2.1 berikut ini.



**Gambar 2.1.** Teknik PCR (Brown, 2006).

Proses kegiatan kloning tidak terlepas dari satu enzim penting, yaitu *restriction endonuclease*. (Weaver, 2002; Micklos and Freyer, 2003). Enzim ini dapat memotong pita DNA pada sisi tertentu dan mereproduksinya pada tempat yang sama. Pada penelitian ini digunakan enzim restriksi *PstI* dan *Sall*. *Sall* mempunyai sekuen pengenalan G↓TCGAC sedangkan *PstI* memiliki sekuen pengenalan CTGCA↓G. (Weaver, 2002).

Pada proses kloning juga diperlukan primer, yaitu potongan pendek nukleotida yang memiliki kesamaan dengan sebagian DNA yang diamplifikasi pada reaksi PCR. Primer *annealing* pada cetakan DNA yang terdenaturasi untuk membuat sisi inisiasi untuk perpanjangan molekul DNA baru (<http://www.accessexcellence.org>)

Semua percobaan kloning gen membutuhkan pembawa, yang disebut vektor., yang memiliki *origin of replication* sehingga proses replikasi DNA dapat berlangsung (Weaver, 2002). Setelah dipotong dengan enzim restriksi untuk membentuk ujung yang menggantung dan menyatukan dengan DNA asing yang dimasukkan, serta menyatukannya dengan DNA ligase. Pada *multiple cloning vector* juga memungkinkan untuk memotong dengan dua enzim restriksi, yaitu *Sall* dan *PstI*, dan kemudian mengklon sepotong DNA dengan ujung *Sall* dan *PstI*. Hal ini disebut *directional cloning*, karena DNA yang dimasukkan diletakkan di vektor hanya pada satu orientasi. Keuntungannya antara lain mencegah vektor dari pengulangan ligasi olehnya sendiri karena dua sisi restriksinya tidak cocok

Menurut Brown (2006), langkah dasar percobaan kloning gen adalah sebagai berikut (Gambar 2.2):

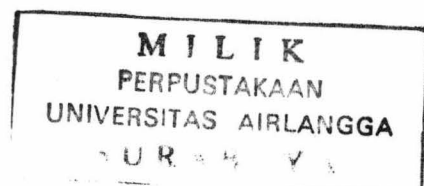
1. Suatu fragmen DNA, mengandung gen yang akan diklon, dimasukkan ke molekul DNA sirkuler yang dinamakan vektor, untuk memproduksi molekul DNA rekombinan.
2. Vektor membawa gen ke sel inang, yang biasanya bakteri, meskipun sel hidup lain bisa dipergunakan.

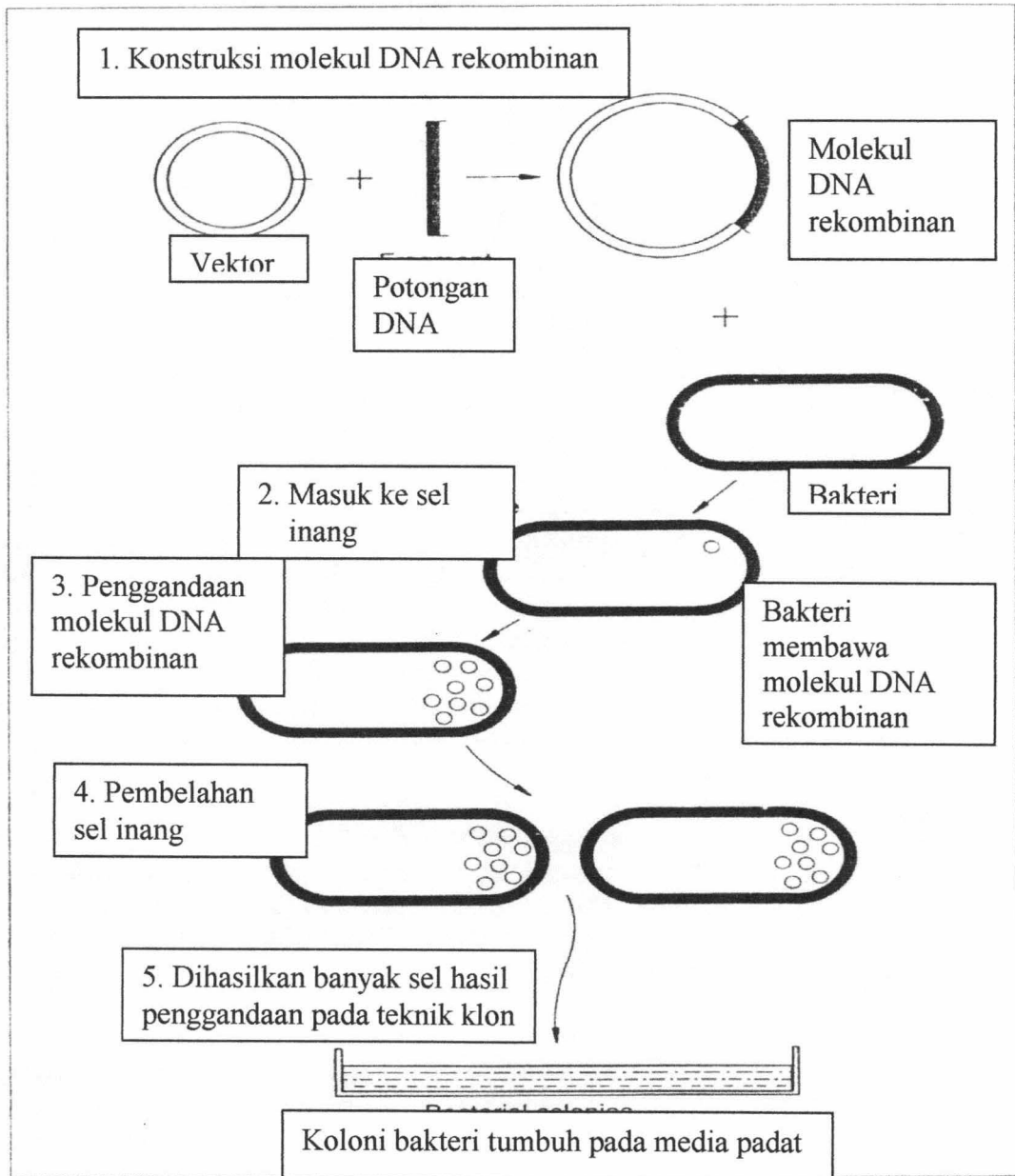
3. Dalam sel inang vektor menggandakan diri, memproduksi banyak duplikat yang identik tidak hanya dirinya sendiri, tetapi juga gen yang dibawanya.
4. Ketika sel inang membelah diri, duplikat molekul rekombinan DNA menjadi progeny dan replikasi vektor berlangsung

Sesudah banyak divisi sel, yang disebut koloni atau klon, dari sel inang yang identik diproduksi. Setiap sel dalam klon mengandung satu atau banyak duplikasi molekul DNA rekombinan; gen yang dibawa oleh molekul rekombinan disebut diklon.

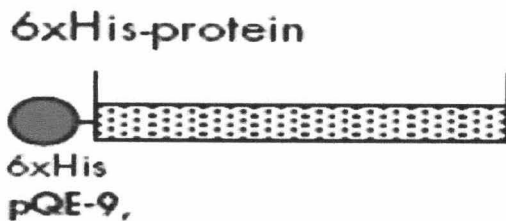
Konstruksi plasmid rekombinan seperti pada penelitian ini, menggunakan vector pQE9 dapat diproduksi dengan menempatkan 6xHis tag pada N-terminus protein yang diinginkan (Anonymous, 2003) (Gambar 2.3)

Konstruksi yang terletak pada 6xHis tag pada N-terminus protein, adalah yang umum digunakan dan mudah dipersiapkan. Hanya pada akhir 5' *open reading frame* yang harus diligasi di frame. Ketika vector pQE menyediakan *codon* akhir di tiga *reading frame*., semua sekuen pengkode pada akhir 3' *insert* tidak diperlukan untuk penentuan secara tepat. Jika menggunakan C-terminal *tags*, gen yang dimasukkan harus diklon dalam bingkai dengan kedua *ATG start* dan sekuen yang mengkode 3' 6xHis. Jika 6xHis *tag* ditempatkan pada C-terminus, hanya protein dengan sekuen yang panjang yang dimurnikan (Anonymous, 2003) (Gambar 2.4 dan 2.5).



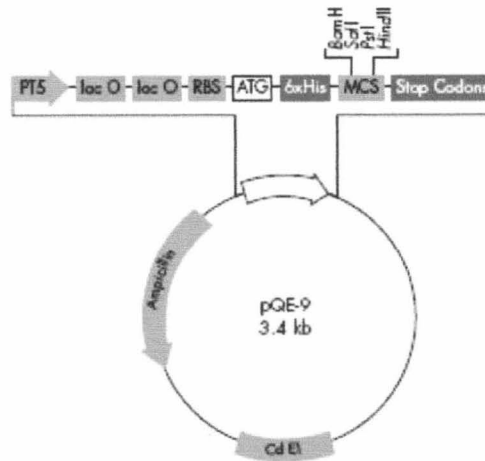


**Gambar 2.2.** Langkah dasar kloning gen (Brown, 2006) yang dilakukan pada penelitian ini

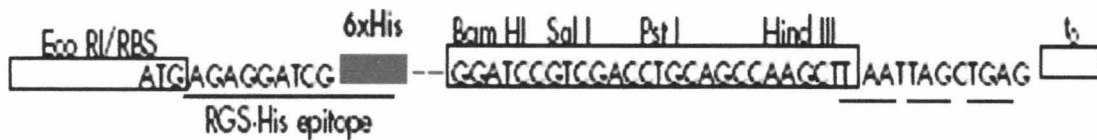


**Gambar 2.3.** Konstruksi N-terminal tag pada plasmid rekombinan (Anonymous, 2003)



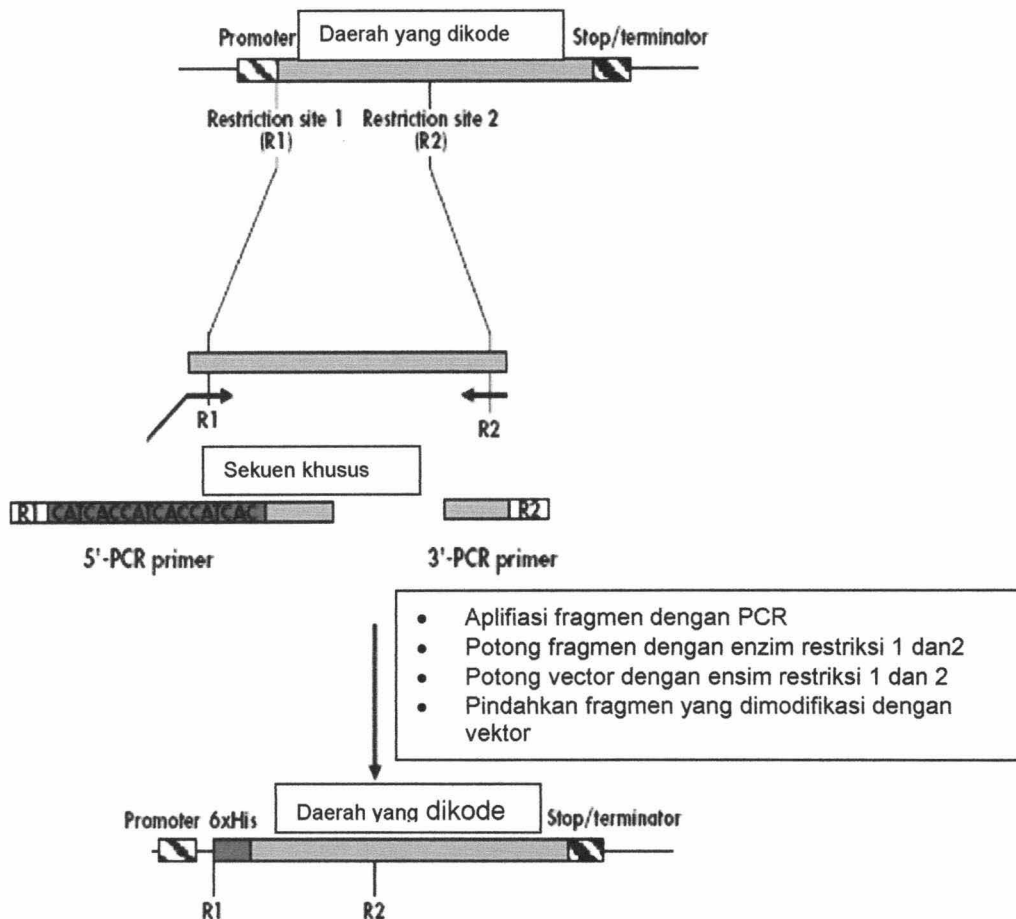


**Gambar 2.4** Vektor pQE untuk konstruksi N-terminal 6xHis tag (Anonymous, 2003).  
 Keterangan : **PT5**: T5 promoter, **lac O**: lac operator, **RBS**: ribosome-binding site, **ATG**: start codon, **6xHis**: sekuen 6xHis tag sequence, **MCS**: sis multiple cloning dengan indikasi sisi restriksi, **Stop Codons**: stop codon di semua 3 *reading frames*, **Col E1**: Col E1 *origin of replication*, **Ampicillin**: gen resisten terhadap ampicillin, **lacIq**, *lacIq repressor gene*.



**Gambar 2.5.** Sekuen penggunaan 6X His tag pada plasmid rekombinan (Anonymous, 2003)

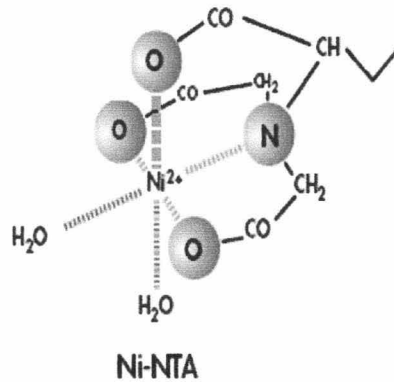
Modifikasi dengan memasukkan sekuen hasil PCR akan menghasilkan sekuen seperti pada Gambar 2.6 di bawah ini (Anonymous, 2003), yang akan menghasilkan plasmid Lactonase rekombinan.



**Gambar 2.6.** Modifikasi dengan penyisipan sekuen dari PCR (Anonymous, 2003) untuk menghasilkan plasmid Lactonase rekombinan.

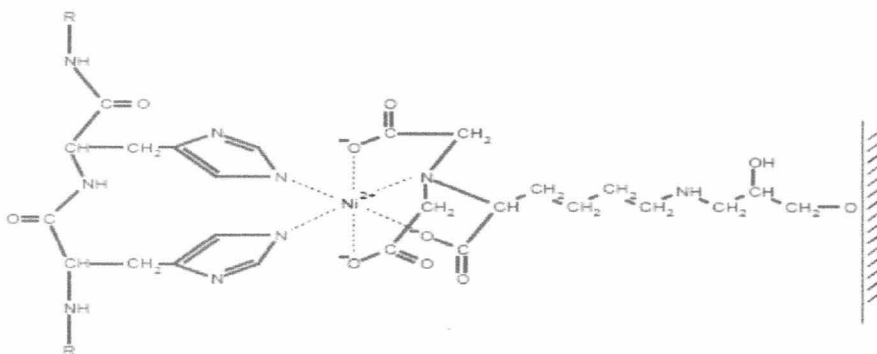
### 2.3 Purifikasi Protein Lactonase Rekombinan

Purifikasi protein pada penelitian ini menggunakan konstruksi rekombinan dengan QIAexpress berdasarkan pada vector pQE dengan menempatkan 6xHis tag pada N-terminus protein yang diinginkan. Afinitas 6xHis tag mempermudah pengikatan pada *Nickel-Nitroaceticacids* (Ni-NTA) (Gambar 2.7), sehingga hasilnya tidak menjadi immunogenik. Pada banyak kasus, 6xHis tag tidak mempengaruhi struktur atau fungsi protein yang dimurnikan, termasuk enzim. Keuntungan lain 6XHis tag adalah memungkinkan imobilisasi protein pada permukaan pengikat metal seperti Ni-NTA HisSorb™, sehingga mempermudah untuk mempelajari interaksi protein. Sebagai tambahan, Anti-His Antibodies dapat dipergunakan sebagai pendeteksi (Anonymous, 2003).



**Gambar 2.7.** Ni-NTA (Anonymous, 2003)

Nitrilotriacetic acid (NTA), adalah suatu adsorben pengikat *tetradentate* yang dikembangkan pada Hoffmann-La Roche. NTA mengikat empat dari enam sisi pengikat pada koordinasi ion nikel., menyisakan dua sisi bebas untuk berinteraksi dengan *6xHis tag* (Gambar 2.8). NTA mengikat ion metal lebih stabil daripada pengikat resin lain yang ada (Hochuli 1989). Yang lebih penting, matrik NTA dapat mengikat protein *6xHis-tag* lebih kuat dari pada matrik IDA (Iminodiacetic acids), memungkinkan purifikasi protein dari kurang dari 1% protein total diawal menjadi homogen lebih dari 95% hanya dengan satu langkah (Janknecht *et al.* 1991).



**Gambar 2.8** Interaksi residu terdekat pada protein *6Xhis tag* dengan matrik Ni-NTA (Anonymous, 2003).

Pemurnian dan karakterisasi protein intraseluler, dilakukan dilakukan dengan cara lysis, untuk mendapatkan *homogenate*, dengan sentrifugasi selama 10 menit pada 15.000 X g atau satu jam pada 10.000 X g. Supernatan yang diperoleh

disebut ekstrak kasar protein dan pelletnya mengandung fraksi membran. Pada penelitian ini metode lysis yang dipergunakan adalah dengan sonikasi untuk melysis suspensi sel (Bollag and Edelstein, 1991).

Menentukan konsentrasi protein dalam larutan, salah satunya dapat dilakukan dengan metode Bradford, seperti yang dilakukan dalam penelitian ini. Kelebihan dari metode ini adalah cepat dan sensitif. Sedangkan kekurangannya adalah ada beberapa macam respon diantara protein murni yang berbeda, serta protein yang dipergunakan terdenaturasi tanpa bisa dirubah kembali (Bollag and Edelstein, 1991).

Metode menghitung, membandingkan dan mengkarakterisasi protein yang murah dan mudah dilakukan, dilakukan dengan Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Metode ini memisahkan protein berdasarkan pada berat molekulnya (Laemli, 1970 *in* Bolag and Edelstein, 1991). SDS mengikat sepanjang rantai polipeptida, dan panjang gabungan SDS-protein yang berkurang sebanding dengan berat molekulnya.

Deterjen sering digunakan untuk ekstrasi dan purifikasi membran protein, agar membran dapat mudah dipecahkan. Deterjen adalah molekul amphiphilic dengan kelarutan substansial di air. Pada penelitian ini digunakan Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) yang memisahkan protein pada bentuk monomericnya, sehingga mempermudah pendugaan massa molekulernya (Bolag and Edelstein, 1991).

Untuk memperendah kelarutan protein, pelarut organik seperti acetone dan ethanol memiliki efek yang sama dengan garam tingkat tinggi jika ditambahkan pada larutan protein (Bolag and Edelstein, 1991).

Optimasi daerah translasi yang diinginkan pada vektor ekspresi pQE memungkinkan ekspresi protein pada konstruksi N-terminal tag 2-4 kali lebih efisien daripada protein dengan C-terminal affinity tag. Pada kebanyakan aplikasi, jumlah asam amino yang ditambahkan pada protein bersama 6XHis tag sebaiknya dibuat seminimum mungkin (Anonymous, 2003)

Untuk mendapatkan perbanyakkan konstruksi ekspresi yang paling stabil, khususnya jika protein *toxic* yang diekspresikan, digunakan strain *E. coli* M15[pREP4] karena tingkat represinya yang lebih tinggi (Anonymous, 2003).

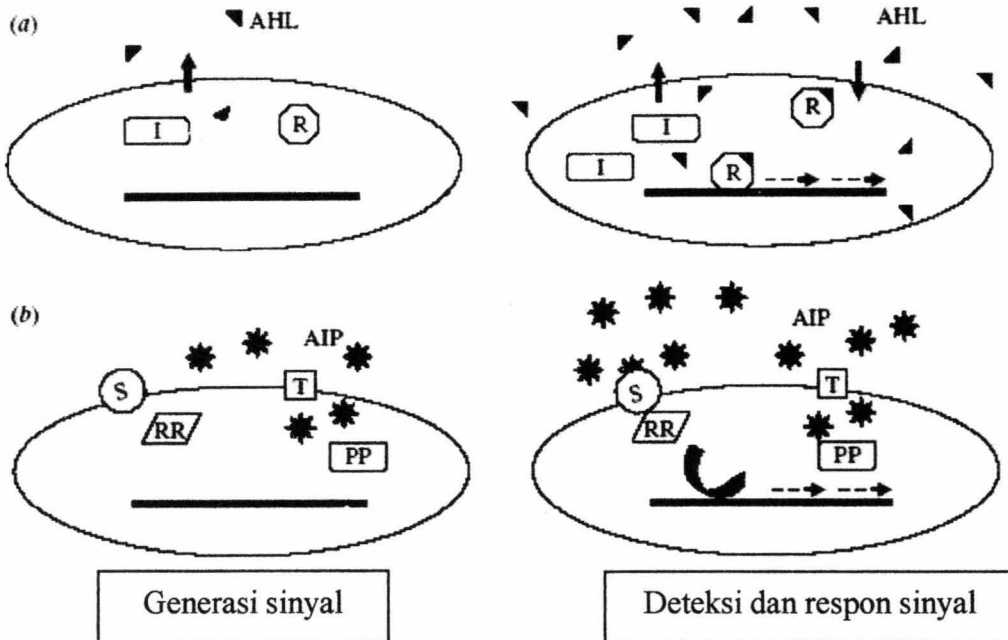
#### **2.4 Quorum Sensing**

*Quorum sensing* (QS) adalah proses komunikasi sel bakteri yang melibatkan produksi dan deteksi molekul penanda yang dapat berdifusi, atau *Autoinducer*, yang digolongkan sebagai feromone bakteri (Lazdunski *et al.*, 2004). QS dilakukan oleh berbagai macam species bakteri Gram- positif dan negatif untuk koordinasi kebiasaan komunal. Biasanya melibatkan gen spesifik sebagai respon terhadap kepadatan populasi (Gonzales dan Keshavan, 2006).

Pertambahan densitas populasi sel, direspon oleh bakteri dengan menginduksi gen khusus. Tipe pengaturan ini disebut *Quorum Sensing* (QS), termasuk produksi dan ekskresi molekul penanda berberat molekul rendah yang disebut *autoinducers* (AI), yang siap berdifusi melalui dinding sel, dari sel ke medium. Ketika populasi bakteri mencapai tingkat kritis, konsentrasi molekul penanda pada medium bertambah sebagai fungsi densitas populasi. Ketika mencapai titik ambang, AI akan menempel ke reseptor khusus pengatur protein, yang menginduksi ekspresi gen target (Bassler, 1999).

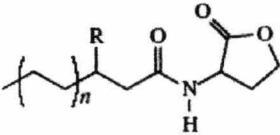
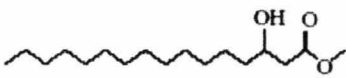
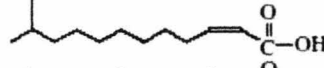
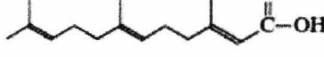
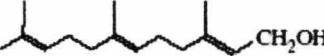
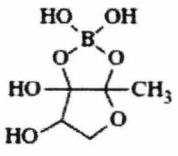
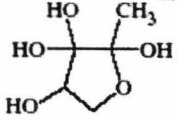
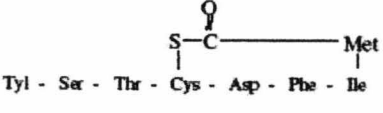
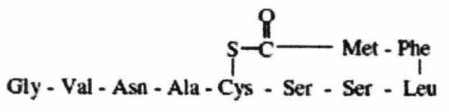
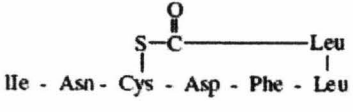
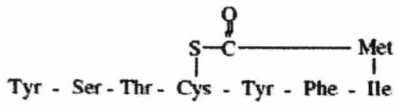
Berbagai species bakteri bisa memproduksi berbagai tipe sinyal *quorum sensing*, tetapi tampaknya mereka hanya memakai dua cara umum untuk mendeteksi dan merespon sinyal ini. Satu cara yang umum dilakukan oleh sistem *quorum-sensing* tergantung pada *acylhomoserine lactone* (AHL) dimana sinyal *quorum-sensing* dideteksi oleh suatu *cytosolic transcription factor* (Gambar 2.9a). Pada cara yang lain, sinyal *quorum-sensing* seperti *autoinducing peptide* (AIP) yang diproduksi oleh *Staphylococcus aureus*, dideteksi oleh suatu membrane yang berasosiasi dengan dua komponen system pengaturan (Gambar 2.9b). Kebanyakan bakteri tampaknya menggunakan salah satu sistem *quorum-sensing* diatas dalam mengatur ekspresi target gen, tetapi ada juga pathogen yang menggunakan dua mekanisme *quorum*

sensing untuk kegunaan yang sama, sebagai contoh, *V. harveyi* (Waters and Bassler, 2005).



**Gambar 2.9.** Dua mekanisme umum *quorum sensing* mikroba (a) Deteksi sinyal oleh faktor transkripsi cytosolic, Dihadirkan oleh sistem AHL-type *quorum-sensing*. Sinyal diproduksi oleh suatu protein tipe *LuxI* (I) berkumpul di lingkungan interseluler, masuk ke sitosol, berikatan dengan faktor transkripsi tipe *LuxR* (R), dan memulai ekspresi target gen (diindikasikan oleh tanda garis). (b) Deteksi sinyal oleh suatu sensor dua komponen dan pasangan respon regulator, dihadirkan oleh sistem *quorum sensing* tipe AIP. *Precursor peptides* (PP) dimodifikasi dan menghasilkan sinyal AIP yang diekspor oleh suatu transporter ABC (T). Sinyal dideteksi oleh sensor histidine kinase (S), transduksi ke pengatur respon/*response regulator* (RR) yang asalnya sama oleh lintasan fosforilasi/*phosphorylation relay* (P), yang mengatur target ekspresi gen.

Beberapa contoh sinyal *quorum sensing* mikroba dapat dilihat pada Gambar 2.10 berikut ini.

Sistem QS	Struktur sinyal	Organisme
AHLs		<i>Vibrio fischeri</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i>
PAME		<i>Ralstonia solanacearum</i>
DSF		<i>Xanthomonas campestris</i>
farnesic acid		<i>Candida albicans</i>
farnesol		<i>C. albicans</i>
AI-2 (S-THMF-borate)		<i>Vibrio harveyi</i>
AI-2 (R-THMF)		<i>Salmonella typhimurium</i>
AIP-I		<i>Staphylococcus aureus</i> group I strains
AIP-II		<i>S. aureus</i> group II strains
AIP-III		<i>S. aureus</i> group III strains
AIP-IV		<i>S. aureus</i> group IV strains
CSP	Glu-Met-Arg-Leu-Ser-Lys-Phe-Phe-Arg-Asp-Phe-Ile-Leu-Gln-Arg-Lys-Lys	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Gambar 2.10. Contoh sinyal *quorum-sensing* mikroba (Dong et al., 2007).

Komunikasi melalui sirkuit sinyal *LuxI/LuxR* (HSL/aktifator transkripsional) nampak sebagai mekanisme standar oleh bakteri Gram-negatif untuk berinteraksi dengan yang lain, seperti sistem *quorum sensing* yang mengatur sirkuit *V. fischeri*, telah menunjukkan kontrol ekspresi gen pada sekitar 25 species bakteri Gram-

negatif (Fuqua *et al.* 1996; Bassler 1999; de Kievit and Iglewski 2000; Miller and Bassler 2001)

Tabel 2.1 menjelaskan langkah umum dan komponen kunci proses *quorum-sensing* tipe *AHL* dapat dibagi menjadi beberapa langkah kunci: (i) generasi sinyal tingkat dasar, (ii) akumulasi sinyal, (iii) penerimaan sinyal, (iv) sinyal *autoinduction* dan aktivasi gen target (v) sinyal hilang. Dua protein pengontrol *quorum sensing* pada kebanyakan bakteri Gram-negatif, yaitu: 1) Protein mirip *LuxI* mensintesa *autoinducer*, dan protein ini mengkatalis pembentukan molekul spesifik *acyl-HSL autoinducer*. *Autoinducer* secara bebas berdifusi melalui membrane sel dan berakumulasi pada densitas sel yang tinggi, pada konsentrasi *autoinducer* yang tinggi, 2) Protein mirip *LuxR* mengikat *autoinducer* dari asal yang sama.. Komplek *LuxR-autoinducer* mengikat target gen *promoter* dan mengaktifkan transkripsi. Banyak proses fisiologikal diatur oleh sistem komunikasi sel, termasuk virulensi, pembentukan biofilm, produksi antibiotik dan konjugasi (Schauder *et al.*, 2001).

Pada bakteri Gram-negatif, molekul yang sering digunakan sebagai penanda adalah *Acylatedhomoserine Lactones (AHL)*(Lazdunski *et al.*, 2004; March and Bentley, 2004).



**Tabel 2.1.** Langkah umum dan komponen kunci sistem *quorum sensing* tipe AHL (Zhang *et al.* 2002, 2004)

Proses <i>quorum sensing</i>		Komponen kunci	Prospektif strategi <i>quorum sensing</i>
Densitas populasi rendah	(1) Generasi sinyal dasar	Protein dan enzim yang terlibat dalam biosintesa rantai acyl dan S-adenosylmethionine (SAM); <i>LuxI-type (I) protein</i>	Inhibitor biosintesis asam lemak; inhibitor biosintesis SAM; inhibitor protein I
	(2) Akumulasi sinyal	Protein-protein yang terlibat dalam <i>efflux</i> signal aktif rantai panjang	Inhibitor <i>efflux</i> aktif enzim pendegradasi signal AHL
Densitas populasi tinggi	(3) Penerima sinyal	Faktor transkripsi tipe LuxR; sistem influx putatif untuk AHL rantai panjang	Inhibitor protein R; inhibitor influx?
	(4) Autoinduksi dan aktivasi pengaturan <i>quorum sensing</i>	R dan I protein terlibat dalam tambahan produksi AHL signal; <i>quorum-sensing dependent transcription factors</i>	Enzim pendegradasi signal AHL; inhibitor untuk protein I dan R
	(5) Sinyal hilang	Enzim pendegradasi AHL dan mekanisme pengaturannya	Bahan kimia yang mendukung ekspresi enzim pendegradasi AHL

*V. anguillarum* memproduksi beberapa molekul penanda yang saling berhubungan, yaitu *acylated homoserine lactone* (AHL); yang bisa mempengaruhi ekspresi faktor virulensi seperti produksi eksoprotease dan pembentukan biofilm (Bucholds *et al.*, 2006).

*V. harveyi* dilaporkan memiliki tiga sistem QS.. Setiap sistem memiliki sintase *autoinducer* yang berbeda dan sebuah sensor hibrida khusus protein histidine kinase. Autoinducer pertama adalah *Harveyi Autoinducer* (HAI-1), suatu *acylated homoserine lactone* (AHL). AI-1 adalah N-(3-hydroxybutanoyl) homoserine lactone (HSL), yang disintesa oleh *LuxLM*. N-(3-hydroxybutanoyl) homoserine lactone mengikat sensor spesifiknya protein *LuxN* (Turovskiy *et al.*, 2007).

*Autoinducer* kedua adalah *Autoinducer 2* (AI-2), yaitu *furanosyl borate diester* (Chen *et al.*, 2002). *LuxS* dibutuhkan untuk biosintesa AI-2, yaitu 3A-methyl-5,6-dihydro-furo(2,3-D)(1,3,2)dioxaborole-2,2,6,6A-tetraol. Diketahui melalui protein *periplasmic soluble LuxP*, berhubungan untuk mengaktifkan suatu hibrida dua komponen sensor kinase response regulator protein *LuxQ* (Turovskiy *et al.*, 2007).

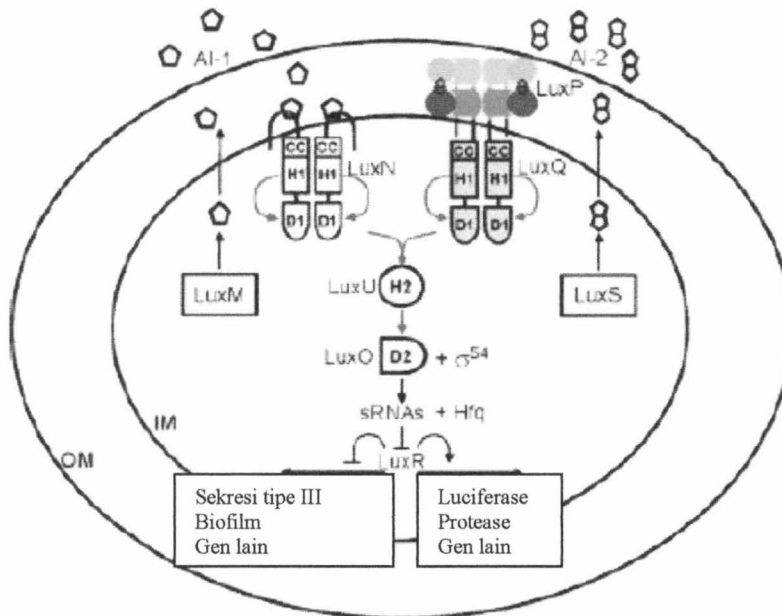
*Autoinducer* ketiga pada sistem QS *V. harveyi* adalah *Cholerae Autoinducer 1* (CAI-1) dan strukturnya belum diketahui (Henke dan Bassler, 2004b). CAI-1 disintesa oleh *CqsA* dan diketahui melalui sensor *cognate* *CqsS*. Sistem *Cqs* pertamakali dijumpai pada *V. cholerae* (Henke and Bassler, 2004a).

AI-2 diperkirakan mengatur ekspresi banyak fenotip pada berbagai spesies bakteri. Diantara berbagai kegunaannya, AI-2 diduga mengatur biosintesa antibiotik carbapenem pada *Photorhabdus luminescens*, dan ekspresi faktor virulensi pada *Streptococcus pyogenes* (Xavier and Bassler, 2003). AI-2 telah ditetapkan oleh komunitas ilmiah sebagai sinyal sel ke sel pada mikroorganisme prokaryotik (Turovskiy *et al.*, 2007).

Semua *autoinducer* menengahi ekspresi target gen oleh suatu *phosphorylasi/dephosphorilasi signal transduction cascade*. *LuxN*, *LuxQ* dan *CqsS* mendephosporilasi *LuxU*, yang secara tidak langsung mengaktifkan respon regulator *LuxR* (Turovskiy *et al.*, 2007). *Quorum sensing* pada *V. harveyi* menggunakan ketiga sistem penanda sel yang berfungsi secara paralel untuk mengatur bioluminansi, sekresi tipe III (Bassler *et al.*, 1999; Bassler *et al.*, 1994; Henke dan Bassler, 2004c) dan beberapa faktor virulensi seperti produksi metalloprotease (Mok *et al.*, 2003, Henke dan Bassler 2004a), siderophore, eksopolysakarida (Lilley dan Bassler, 2000) pada sebuah gaya populasi sel yang bebas kepadatan. Aktifasi setiap sistem tampaknya memiliki efek tambahan pada pengaturan ekspresi gen (Mok *et al.*, 2003).

Lintasan QS sinyal transduksi AI-1 dan AI-2 mengumpul untuk mengontrol ekspresi *Lux-R*-pengatur gen target. Sinyal transduksi diperantarai oleh

phosphotransfer melalui dua komponen sensor yang mengandung residu histidine (H) dan aspartate (D) Panah merah menunjukkan kelompok phosphoryl yang mengalir pada kepadatan sel rendah, tetapi pada kepadatan sel tinggi alirannya berbalik. (Neiditch *et al.*, 2005). (Gambar 2.11).



**Gambar 2.11.** Quorum Sensing (QS) *V. Harveyi* (Neiditch *et al.*, 2005).

Sistem signal dari sel ke sel pada bakteri Gram-negatif menggunakan molekul-molekul kecil yang dapat berdifusi seperti *N-acylhomoserine lactones* (AHL). Komponen-komponen ini terlibat dalam produksi antibiotik, *exoenzyme*, faktor-faktor virulensi dan pembentukan biofilm. Juga molekul klas turunan furanone yang sering ditemukan di alam sebagai feromon, komponen flavor atau metabolit sekunder (Martinelli *et al.*, 2004).

Banyak bakteri yang memproduksi molekul ekstraselluler yang berfungsi pada komunikasi antar sel. Salah satu dari molekul ini adalah, *autoinducer 2* (AI-2), yang digambarkan pertama kali sebagai suatu sinyal ekstraselluler yang diproduksi oleh *V. harveyi* untuk mengontrol ekspresi cahaya (Winzer *et al.*, 2003).

Beberapa kelompok *autoinducer* yang secara kimiawi berbeda telah diidentifikasi. *N-Acyl-L-homoserine lactones* (AHLs) secara eksklusif diproduksi oleh bakteri Gram-negatif, biasanya menggunakan enzim yang termasuk pada kelompok protein *LuxI*.

*Acylated acyl carrier protein* (acyl-ACP) atau acyl-CoA menunjang rantai acyl AHL sedangkan *S*-adenosylmethionine (SAM) menunjang setengah homoserine lactone (Moré *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1998). Molekul AHL mengumpul selama pertumbuhan populasi bakteri dan mengaktifkan pengaturan transkripsional kelompok LuxR ketika konsentrasi kritis dicapai. Disamping peranannya sebagai molekul sinyal, beberapa AHL mungkin juga berperan sebagai faktor virulensi (Telford *et al.*, 1998; Gardiner *et al.*, 2001).

Disisi lain, banyak bakteri Gram-positif menggunakan *post-translationally modified peptides* sebagai molekul-molekul signal. Peptida ini, yang diciptakan dari precursor besar, biasanya disekresi melalui transporter *ATP-binding cassette* (ABC). Beberapa peptida ini berhubungan dengan dinding membran sensor kinase yang mentransduksi suatu sinyal melintasi membran; peptida yang lain dibawa ke sel melalui *oligopeptide permease*, dimana kemudian berinteraksi dengan reseptor intraselular (Kleerebezem *et al.*, 1997; Lazazzera & Grossman, 1998; Novick, 1999; Novick & Muir, 1999).

Saat ini, kelompok baru *autoinducer* telah digambarkan ada pada kedua bakteri Gram-negatif dan positif (Surette and Bassler, 1999). Pada *V. harveyi*, protein *LuxS* diperlukan untuk produksi suatu molekul sinyal yang strukturnya tidak diketahui, *autoinducer 2* (AI-2), yang menggunakan aktifitasnya melalui suatu kompleks sistem pelepasan fosfat.

Aktifasi kelompok methyl diperlukan untuk sejumlah proses selular penting baik pada prokaryote maupun eukaryote. *S*-adenosyl methionine (SAM) adalah donor utama methyl pada sel (Winzer *et al.*, 2003). Metilasi yang bebas SAM pada DNA, RNA, protein, dan berbagai metabolit dibawa oleh transmethylase yang dituju dengan pembentukan *Sadenosylhomocysteine* (SAH) yang bertugas sebagai penghambat umpan balik untuk metilasi yang bebas SAM (Winzer *et al.*, 2003). Molekul ini sangat toksik dan didaur ulang oleh sel melalui 2 lintasan utama.

Alternatif lain, lintasan dua langkah untuk detoksifikasi SAH dilakukan oleh beberapa spesies  $\gamma$ -,  $\beta$ -, dan  $\epsilon$ -proteobacteria. Langkah pertama lintasan ini adalah konversi SAH menjadi adenine dan S-ribosyl homocysteine (SRH), suatu reaksi yang dikatalis oleh *Pfs*. Pada langkah kedua, SRH diubah menjadi homocysteine dan DPD ( precursor untuk AI-2) oleh *LuxS*. Siklus ini lengkap ketika homocysteine diubah menjadi methionine dan sesudah itu diaktifkan kembali menjadi SAM. Dihidroksi pentanedion (DPD) yang terbentuk pada reaksi yang dikatalis oleh *LuxS* agak tidak stabil. Molekul yang muncul dalam keseimbangan dengan banyak furanone yang terbentuk dari siklisasi spontan. Salah satu dari furanone ini dapat bereaksi dengan borat menyebabkan pembentukan AI-2. Ketika sintesa AI-2 erat berhubungan dengan proses metabolik penting suatu sel, secara teori molekul ini dapat digunakan untuk mengukur tidak hanya kepadatan populasi tetapi juga keadaan metabolisnya. Xavier and Bassler (2003) telah menduga bahwa produksi AI-2 sampai saat ini menjadi motor dibalik evolusi lintasan daur ulang dua langkah SAH.

Model untuk *quorum sensing* *V. harveyi*, melibatkan suatu densitas populasi rendah yang tergantung permulaan aktivitas histidine kinase *LuxN* dan *Lux Q*. Fosforilasi sensor kinase menimbulkan suatu *phosphorelay*, mengumpul pada suatu protein regulator *LuxO*. Fosforilasi *LuxO*, dalam suatu mekanisme menggunakan RNA dan pendamping, mengatur ekspresi regulator transkripsi, *LuxR*, suatu protein yang berbeda dari reseptor *LuxR* digunakan untuk mendeteksi AHL pada bakteri lain. Setelah mencapai kepadatan populasi yang tinggi, AI-1 menempel pada reseptor AHL, *LuxN*, atau reseptor pengikat BAI-2, *LuxP*, meningkatkan dephosphorilasi protein, menghasilkan stabilisasi *LuxR* dan ekspresi gen (Waters and Bassler, 2005). Beberapa gen yang diatur dalam respon terhadap mekanisme penandaan termasuk bioluminansi, penghambatan sekresi protein tipe III, pembentukan biofilm, meningkatkan produksi metalloprotease (Bassler *et al.*, 1993; Lilley and Bassler, 2000; Mok *et al.*, 2003; Henke and Bassler, 2004a).

Metalloprotease pada *V. harveyi* ditentukan pengaturannya hanya oleh adanya kedua sinyal *quorum sensing* (Mok *et al.*, 2003).

Produksi dan sekresi protease memainkan suatu peran penting pada proses penyerangan inang, dan rumit pengaturannya (Pugsley, 1993; Lory, 1998). Riset sebelumnya mengidentifikasi suatu cysteine protease dan satu atau lebih metalloprotease pada media ekstraselular *V. harveyi* (Fukasawa, 1988). Diduga protease yang diproduksi secara ekstraseluler oleh *V. harveyi* bisa diatur oleh mekanisme QS (Rajamani, 2006).

Schaeber *et al.* (2007) menyebutkan, bahwa studi sebelumnya menyatakan bahwa pada *P. aeruginosa*, *quorum sensing* terlibat pada pembentukan biofilm dan kematangan biofilm (Davies *et al.*, 1998; De Kievit *et al.*, 2001). Sistem *quorum sensing* dengan *autoinducer* tampak penting pada akhir tetapi tidak di awal tingkat perkembangan biofilm (De Kievit *et al.*, 2001).

## **2.5 Inhibitor Quorum Sensing**

Sistem *quorum sensing* bakteri adalah faktor kunci yang terlibat pada patogenitas dan virulensi. Banyak organisme yang dapat memproduksi enzim dan substansi kimia mampu merusak elemen pada lintasan *quorum sensing*, fenomena ini disebut sebagai '*quorum quenching*' (Dong *et al.*, 2001; Uroz *et al.*, 2003). Satu target utama sistem *quorum quenching* adalah molekul sinyal AHL itu sendiri. (Barnard and Salmond, 2005).

Dua kelompok enzim yang dapat mendegradasi AHL, yaitu *acyl-homoserine lactone lactonase* (AHL-lactonase) dan *acyl-homoserine lactone acylase* (AHL-acylase), dengan cara menghidrolisis ikatan *lactone* dan *amida* (Dong *et al.*, 2000, 2001, 2002, Lee, *et al.*, 2002, Reimann, *et al.*, 2002, Lin, *et al.*, 2003., Leadbetter and Greenberg, 2000, Zhang., *et al* 2002). AHL-acylase mendegradasi sinyal AHL dengan cara menghidrolisis ikatan amida AHL saja (Leadbetter and Greenberg 2000; Huang *et al.*, 2003; Lin. *et al* , 2003; Park *et al.*, 2005).

*Bacillus* sp. memiliki sebuah protein *AiiA* yang dapat memblokir *quorum sensing* dengan menghidrolisis AHL-lactone, dan dapat secara luas melemahkan penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen dimana *quorum sensing* mengatur ekspresi gen virulen (Bai, 2008). Menurut Roche *et al.* (2004), terdapat tiga rute inaktivasi AHL dalam hal ini *N-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone* yang diproduksi oleh *Erwinia carotovora*, yaitu: (A) hidrolisis cincin lactone; (B) hidrolisis ikatan amida. Enzim-enzim telah diidentifikasi mampu mengkatalisa A dan B; (C) percepatan untuk memberi *N-3-oxohexanoyl-D-homoserine lactone*. Sampai saat ini, enzim yang mampu mengkatalisis reaksi ini belum teridentifikasi.

Kemungkinan bahwa suatu aktifitas sudah ada di alam telah diteliti melalui beberapa bakteri tanah untuk mengidentifikasi kemungkinan dapat menonaktifkan AHL (Roche *et al.*, 2004).

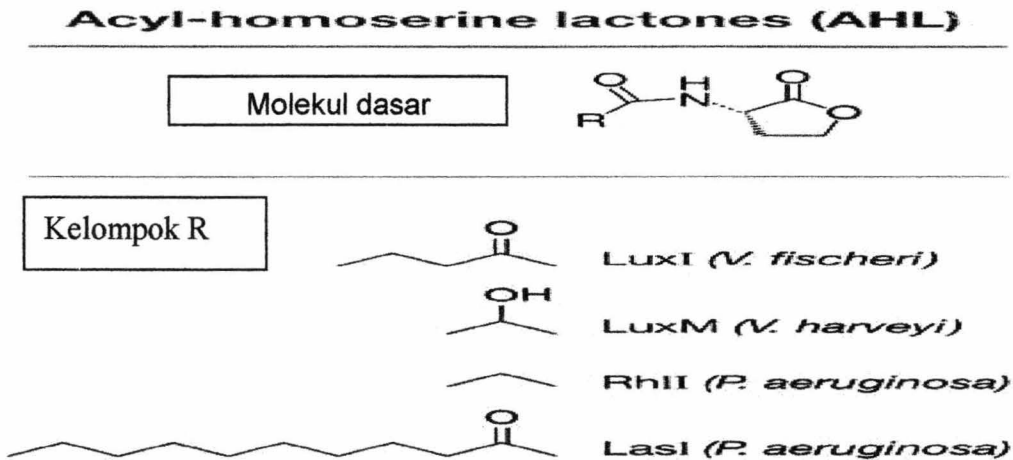
*Halogenated furanones*, suatu kelas metabolit sekunder yang diproduksi oleh alga merah subtidal Australia *Delisea pulchra*, mengganggu sistem pengaturan *Acylated homoserine lactone* (AHL) pada beberapa bakteri Gram-negatif (Kjelleberg *et al.*, 1997).

Ekstrak cair dari beberapa tumbuhan *Conocarpus erectus*, *Chamaesyce hypericifolia*, *Callistemon viminalis*, *Bucida buceras*, *Tetrazygia bicolor*, dan *Quercus virginiana* menyebabkan penghambatan gen *quorum sensing* dan faktor pengontrol *quorum sensing* pada *P. aeuroginosa*, dengan pengaruh utama pada pertumbuhan bakteri (Adonizio *et al.*, 2008).

Abraham (2004) meneliti aktifitas penghambatan bakteri laut berpigmen *Alteromonas* sp, yang diisolasi dari larva *P. monodon* Fab. terhadap *V. harveyi*. Seluruh isolat dihambat oleh berbagai dosis *Alteromonas* sp. *in vitro*.. Antibakteri dari *Alteromonas* sp., jika diberikan pada larva udang, akan menekan aktifitas *V. harveyi* M3 dan mengurangi mortalitas larva *P. monodon in vivo*.

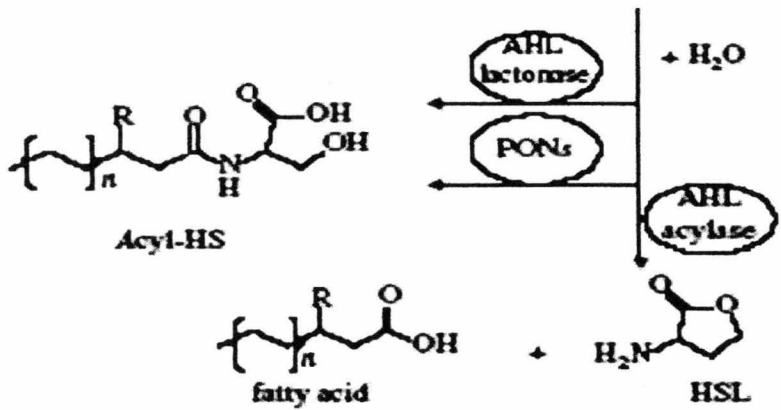
**2.6 Lactonase**

Lactonase adalah enzim yang diproduksi oleh beberapa species bakteri, yang menargetkan dan mengaktivasikan *Acylated Homoserine Lactones* (AHL) (Waters and Bassler, 2005) (Gambar 2.12).



**Gambar 2.12.** AHL sebagai *autoinducer* bakteri (Waters and Bassler, 2005)

AHL-Lactonase yang menghidrolisa cincin homoserine Lactone dari signal AHL (Gambar 2.13), telah teridentifikasi pada susunan species bakteri (Dong et al., 2007)



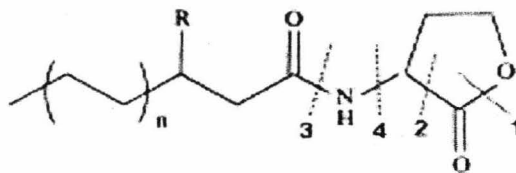
**Gambar 2,13** Degradasi AHL oleh AHL-lactonase, PON dan AHL-acylase (Dong et al., 2007).

Berbeda dengan enzim-enzim AHL-acylase dan paraoxonase (PON) , AHL-lactonase adalah enzim khusus yang mendegradasi AHL. AHL-lactonase menghidrolisis sinyal AHL rantai panjang dan pendek dengan efisiensi yang sama,



tetapi tidak menampakkan atau sedikit aktivitas residu terhadap bahan kimia lain, termasuk *non-acyl lactones* dan *aromatic carboxylic acid esters* (Wang *et al.*, 2004).

Sisi yang dapat diputus oleh enzim Lactonase dan decarboxylase dengan cara menghidrolisis cincin lactone ditandai oleh nomer 1 dan 2, sedangkan acylase dan deaminase bisa memisahkan ikatan homoserine lactone dan rantai sisi acyl pada nomer 3 dan 4 (Gambar 2.14) (Dong and Zhang, 2005).



Gambar 2.14. Struktur AHL dan sisi yang bisa didegradasi oleh enzim (Dong and Zhang, 2005)

Enzim yang mendegradasi *N-acylhomoserine lactones* ada pada *Variovorax paradoxus* (Borchardt *et al.*, 2001), *Bacillus* sp. (Leadbetter and Greenberg., 2000; Dong *et al.*, 2000) dan bakteri yang lain (Dong *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2003; Taga dan Bassler, 2003).

Pemecahan secara enzimatik pada molekul-molekul penyandi, khususnya hidrolisis cincin lactone, oleh berbagai species *Bacillus* telah diketahui (Dong *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2004). Enzim ini, disebut *AiiA* lactonase, menghidrolisis ikatan lactone dalam *AiiA*.

## 2.7 Vibriosis

Diberbagai tempat di dunia, industri budidaya udang diserang oleh penyakit, kebanyakan adalah bakteri (khususnya bakteri bercahaya *V. harveyi*) dan virus. Kepadatan yang tinggi di bak pembenihan dan tambak menyebabkan penyebaran patogen, dan lingkungan akuatik dengan pemberian pakan yang kaya protein secara terus menerus, sangat tepat untuk menumbuhkan bakteri dan virus (Moriarty, 1999).

Penyakit *Vibrio* disebut juga vibriosis, *penaeid bacterial septicemia*, *penaeid vibriosis*, *luminescent vibriosis* atau penyakit kaki merah (Aguirre-Guzma' *et al.*, 2004). Tanda-tanda penyakitnya termasuk kelelahan, kematian jaringan, pertumbuhan dan metamorfosis yang lambat, cacat tubuh, *bolitas negricans*, bioluminansi, *muscle opacity* dan *melanization*. Pada banyak kasus, *Vibrio* bersifat oportunistik, yaitu hanya menyebabkan penyakit jika organisme inang immunitasnya menurun atau mengalami stres fisik, dengan frekuensi infeksi sering terjadi pada budidaya intensif dan kondisi lingkungan yang buruk. (Alderman and Hastings, 1998)

Penyakit bakteri bercahaya ditemukan di Indonesia, dan disebabkan oleh *V. albensis* (Sunaryanto dan Mariam, 1986). Juga ditemukan di Filipina, yang disebabkan oleh *V. harveyi* dan *V. splendidus* (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990). Tak hanya menyebabkan kematian di udang *V. harveyi* juga menyerang beberapa species budidaya (Defoirdt *et al.*, 2007) (Tabel 2.2).

*V. harveyi* adalah bakteri laut yang bersinar yang hidup pada beberapa lingkungan: bakteri ini dapat berenang bebas di air laut, menempel pada permukaan abiotik, sebagai unsur pokok konsorsia biofilm pada hewan laut, dan asosiasi patogenik dengan inang yang berasal dari dasar laut (Henke dan Bassler, 2004b). Pathogenisitas *V. harveyi* pada ikan berhubungan dengan hemolysin dan phospholipase produk ekstraselulernya (Zhang dan Austin, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004).

*V. harveyi* adalah bakteri Gram-negatif yang berpendar, dan tersebar meluas di lingkungan laut. Organisme ini merupakan patogen utama pada budidaya udang penaeid. Bakteri vibrio yang berpendar ini merupakan penyakit yang paling serius di pembenihan yang memelihara *P. monodon* di Filipina, menyebabkan kematian mendekati 100 % dari populasi yang terinfeksi (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990).

*V. harveyi* termasuk jenis bakteri halofil, yaitu bakteri yang dapat hidup pada salinitas tinggi. Dapat ditemukan di habitat-habitat akuatik dengan kisaran salinitas yang luas, sangat umum pada lingkungan estuarin dan laut serta terdapat pada

**Tabel 2.2.** Penyakit-penyakit pada hewan budidaya yang disebabkan oleh *V. harveyi* (termasuk sinonim yuniornya *V. carchariae*) (Defoirdt et al., 2007).

Inang Crustaceans	Akibat yang ditimbulkan
<i>Brine shrimp</i> ( <i>Artemia franciscana</i> )	Antara 45% and 80% mortalitas
<i>Kuruma prawn</i> ( <i>Penaeus japonicus</i> )	Mortalitas tinggi tanpa tanda-tanda
<i>Ridgeback prawn</i> ( <i>Sicyonia ingentis</i> )	Penempelan epithelium usus tengah, menyebabkan mortalitas hingga 55%
<i>Rock lobster</i> ( <i>Jasus verreauxi</i> )	<i>Luminescent vibriosis</i> hingga mortalitas 75% pada larva <i>phyllosoma</i>
Udang windu ( <i>P. monodon</i> )	<i>Luminescent vibriosis</i> menyebabkan kematian massal
Udang putih ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	Mortalitas nauplii mencapai 85%
<b>Ikan</b>	
<i>Cobia fish</i> ( <i>Rachycentron canadum</i> )	Gastroenteritis diikuti kematian massal
<i>Grouper</i> ( <i>Epinephelus coloides</i> )	Gastroenteritis diikuti kematian missal
<i>Red drum</i> ( <i>Scaenops ocellatus</i> )	Gastroenteritis diikuti kematian missal
Salmonids	Mortalitas mencapai 100%
Kuda laut ( <i>Hippocampus</i> sp.)	Hemorrhages menyebabkan mortalitas lebih dari 90%
<i>Summer flounder</i> ( <i>Paralichthys dentatus</i> )	Necrotizing enteritis
<b>Kerang-kerangan</b>	
<i>Abalone</i> ( <i>Haliotis tuberculata</i> )	Mortalitas antara 60 dan 80%
<i>Japanese abalone</i> ( <i>Sulculus diversicolor</i> )	Kematian massal
<i>Pearl oyster</i> ( <i>Pinctada maxima</i> )	Kematian massal

permukaan intestinal hewan laut. Beberapa species ditemukan di habitat air tawar (Bauman et al., 1984).

Jenis penyakit yang sering timbul pada pemeliharaan larva adalah bakteri kunang-kunang, *V. harveyi*. Bakteri tersebut selalu berada di dalam air, populasinya akan meningkat apabila kualitas air menurun. Hasil pengamatan yang dilakukan di Lolitkanta Gondol, Bali menunjukkan bahwa melimpahnya bakteri *Vibrio* terjadi pada perubahan musim, dari penghujan ke kemarau atau sebaliknya. Sebenarnya bakteri *Vibrio* tidak pathogen pada kepadatan dibawah  $10^4$  sel/ml, karena larva masih hidup

dengan normal dan aman (Boer *et al.*, 1993). Dan akan menjadi patogen apabila kepadatannya melebihi  $10^6$  sel/ml yang dapat menimbulkan kematian sampai 90%. Bila kepadatan mencapai  $10^2$  sel/ml maka segera dilakukan penggantian air yang disesuaikan dengan stadia larva..

*Vibrio*, yang serangannya terjadi terutama pada hewan selama tahap perkembangan larva, digambarkan sebagai penyebab pathogen bakteriosis. Sejak banyak vibrio juga diisolasi dari udang penaeid yang sehat, hipotesa asal vibrio yang dikaitkan dengan udang penaeid telah diterima secara luas (Vandenbergh *et al.*, 1999)

Banyak faktor yang berhubungan dengan pathogenitas vibrio pada ikan, antara lain produksi haemolysins, kapsul, protein yang mengikat zat besi dan adanya *hydrophobic surface antigen*, VS- P1 (Wang *et al.*, 1998). Vibriosis pada larva yang disebabkan oleh *V. alginolyticus* menyebabkan sindrom zoea-2 dan *mysis mold syndrome*, sedangkan spesies *Vibrio* yang berbeda (*V. alginolyticus* dan *V. harveyi*) menyebabkan sindrom *bolitas*. *V. harveyi* diasosiasikan dengan penyakit pada stadia pasca larva, benih, dan induk (Vandenbergh *et al.*, 1999)

Infeksi bakteri *V. harveyi* ke dalam tubuh larva dapat melalui mulut dan insang. Menurut Panjaitan (1991), sumber bakteri dapat berasal dari kandungan usus dari induk yang dilepaskan ke dalam bak pemijahan secara bersamaan dengan telur selama pemijahan, sehingga dari stadia telur sampai pada stadia berikutnya telah terkontaminasi oleh bakteri *V. harveyi*.

*Vibrio* tumbuh melekat di alga, dan bisa mencapai densitas populasi yang tinggi setelah dicerna bersama alga dan kemudian di ekskresi dengan alga yang hancur dalam pellet kotoran oleh zooplankton; ada bakteri usus di ikan dan udang seperti zooplankton (Moriarty, 1990).

Mikroflora pada intestinal hewan-hewan air terdiri dari bakteri gram negatif aerob, obligate anaerob dan fakultatif anaerob (Vine *et al.*, 2004). Akan tetapi, komposisi mikroflora tersebut dapat berubah dengan adanya stress lingkungan (Kennedy *et al.*,

1998; Ringe and Strem, 1994), pakan (Ringe *et al.*, 1997; Ringe and Strem, 1994) dan umur ikan (Olafsen, 2001; Prayitno dan Latchford, 1995).

Ikan laut dan darat masing-masing mempunyai species mikroflora yang spesifik. Secara umum, ikan laut, crustacea dan kerang mempunyai mikroflora jenis *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., dan *Acitenobacter* spp. (Gatesoupe, 1999; Gatesoupe *et al.*, 1997; Munro *et al.*, 1994; Prieur *et al.*, 1990).

Komunitas mikroba memainkan peranan penting dalam produksi udang, mendukung persediaan pakan, *recycling nutrients*, dan menguraikan bahan buangan organik melalui berbagai proses. Perbedaan proses menguntungkan ini tergantung pada faktor seperti strategi manajemen kolam, umur udang, dan fase produksi kolam. Komunitas mikroba juga sangat mempengaruhi kualitas air melalui peningkatan kebutuhan oksigen sebagai hasil konsumsi karbon organik yang labil. Karbon organik berasal dari pakan yang tak termakan, algae dan berasal dari bakteri yang ada di dasar sebagai hasil pencernaan bahan organik (Hansen dan Blackburn 1991).

## **2.8 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

*P. aeruginosa* adalah anggota dari Gamma Proteobacteria, klas Bacteria. Merupakan Gram-negatif, aerobik dan berbentuk batang berukuran 0,5 sampai 0,8  $\mu\text{m}$  sampai 1,5 – 3,0  $\mu\text{m}$ . Hampir semua strain motil dengan memiliki single *polar flagellum*, termasuk dalam famili Pseudomonadaceae. Sejak dilakukan revisi taksonomi berdasarkan *conserved macromolecules* (misalnya 16S ribosomal RNA), *P. aeruginosa* masuk kedalam anggota genus *Pseudomonas* yang terbagi menjadi delapan kelompok., *P. aeruginosa* adalah bakteri yang hidup bebas, umumnya ditemukan di tanah dan air, serta pada permukaan yang kontak dengan tanah dan air. Metabolismenya melalui pernafasan dan non fermentatif, tetapi akan tumbuh walaupun tidak ada  $\text{O}_2$  jika  $\text{NO}_3$  tersedia sebagai akseptor elektron pernafasan (Todar, 2008).

Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi pada manusia, hewan dan tanaman (Smith & Iglewski, 2003). Virulensi patogen yang oportunistik terhadap manusia, *P.aeruginosa* PAO1 dikendalikan oleh suatu sistem *quorum sensing* yang tergantung pada *acyl-homoserine lactone* (AHL). Selama analisa fungsional gen *putative acylase* *P. aeruginosa* PAO1, yaitu gen PA2385 ditemukan mengkode sebuah *acylase* yang mengubah sisi rantai asam lemak dari nukleus homoserine lactone (HSL) dari molekul-molekul sinyal *quorum-sensing* yang tergantung AHL. Analisa menunjukkan bahwa proses *posttranslational acylase* dan tipe reaksi hidrolisis sama dengan *beta-lactam acylases*, sangat dipercaya bahwa protein PA2385 adalah anggota dari *N-terminal nucleophile hydrolase superfamily* (Sio *et al.*, 2006).

Untuk identifikasi bakteri *P. aeruginosa* PAO1 pada penelitian ini dilakukan analisis 16S rRNA. Analisis 16S rRNA digunakan sebagai penanda filogenetik pada prokariot, untuk mempelajari hubungan genetik antara strain bakteri yang berbeda (filogeni). Analisis gen ini dapat dianggap sebagai metode standar untuk identifikasi bakteri pada genus, famili, dan tingkat species (Woese, 1987).

Sistem *quorum sensing* *P. aeruginosa* adalah salah satu yang paling banyak dipelajari dalam grup bakteri ini, merefleksikan pentingnya mikroorganisme ini sebagai suatu patogen oportunistik terhadap manusia, hewan dan tumbuhan (Juhas *et al.*, 2005; Lyczac *et al.*, 2000).

*P. aeruginosa* memiliki dua sistem QS yang telah dipelajari, yaitu sistem *las* dan *rhl*, yang telah menunjukkan penting dalam pathogenesisnya (Wagner and Iglewsky, 2004)

# **BAB 3**

# **KERANGKA KONSEPTUAL**

# **PENELITIAN**

### BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

Di berbagai tempat di dunia, serangan penyakit pada budidaya perairan sering dijumpai, kebanyakan adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri (khususnya bakteri bercahaya *V. harveyi*) dan virus. Kepadatan yang tinggi di bak pembenihan dan tambak menyebabkan penyebaran penyakit ini semakin luas. Di lingkungan akuatik dimana pemberian pakan kaya protein secara intensif dan meninggalkan sisa pakan, menjadi media yang sangat tepat untuk menumbuhkan bakteri dan virus (Moriarti, 1999).

Berbagai cara dilakukan untuk menanggulangi masalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* ini, Secara teknis penanggulangan vibriosis dapat dikelompokkan menjadi 3 cara, yaitu: secara fisika, kimia dan biologi.

Salah satu cara yang dipilih untuk menanggulangi vibriosis secara biologi dapat dilakukan dengan cara merusak *quorum sensing* (Defoirdt *et al.*, 2007). Perusakan *quorum sensing* bakteri telah dirancang sebagai suatu strategi anti-infektif yang baru, dan beberapa teknik yang dapat dipergunakan untuk mengganggu *quorum sensing* telah diteliti (Defoirdt *et al.*, 2004).

Fenomena *quorum sensing* tidak hanya terjadi pada *Vibrio*, tetapi ternyata hampir semua jenis bakteri Gram-negatif menampilkan *quorum sensing* sebagai salah satu pengatur perilakunya. Melalui pengenalan cara komunikasi bakteri, diharapkan dapat dikembangkan suatu cara pengendalian bakteri yang tidak selalu berbasis antibiotik, tetapi dengan mencegah terjadinya pengumpulan massa bakteri yang akan mensekresikan faktor virulensi bakteri, dengan cara merusak sistem komunikasi bakteri.

Salah satu bahan yang dapat memutuskan jalur komunikasi bakteri, dengan cara menghambat pembentukan *autoinducemya* dengan menggunakan Lactonase dan Acylase (Wang *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2007).

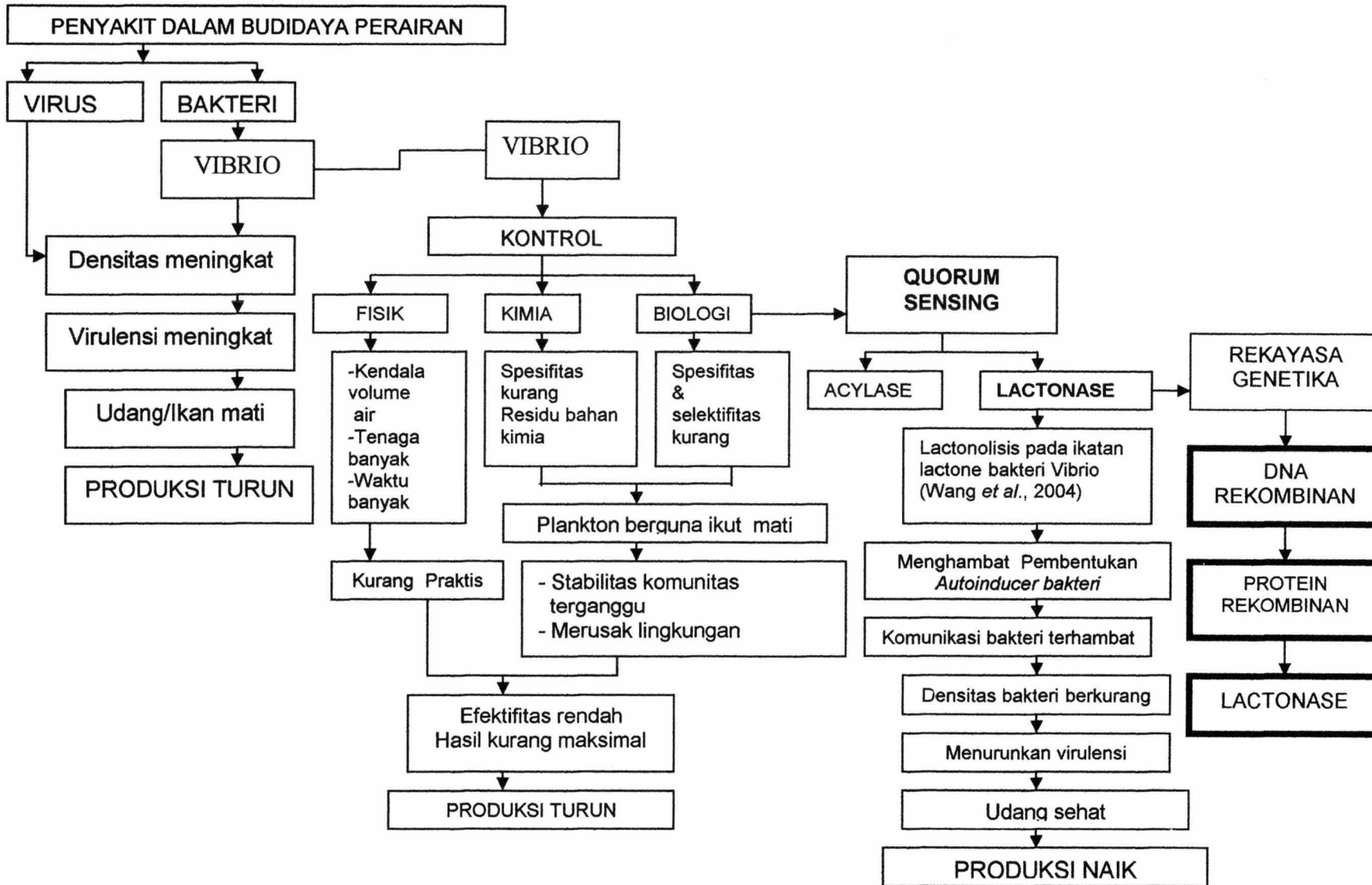


Pemilihan penggunaan Lactonase dibandingkan Acylase, adalah karena beberapa bakteri penyebab vibriosis pada budidaya perairan menggunakan AHL-Lactonase sebagai *autoinducernya* (Dong *et al.*, 2007); ). Lactonase akan memutus ikatan Lactone pada bakteri sehingga *autoinducer* tidak akan terbentuk dengan demikian tidak akan terjadi komunikasi bakteri. Dengan tidak terjadinya komunikasi bakteri, faktor virulensi yang ada tidak akan keluar, sehingga ikan atau udang yang dibudidaya tetap dapat hidup dengan sehat dan tumbuh dengan baik. Angka kematian karena penyakit bakterial dapat ditekan, dengan demikian akan meningkatkan produksi budidaya perairan.

Namun saat ini tidak mudah untuk memperoleh Lactonase, selain ketersediaannya yang masih terbatas, dari segi ekonomi harganya cukup tinggi. Sehingga perlu dilakukan cara yang lebih mudah untuk memperolehnya, yaitu melalui teknik rekayasa genetika untuk memproduksi protein Lactonase rekombinan.

Bakteri *P. aeruginosa* PAO1 diketahui memiliki gen penyandi Lactonase. Setelah karakter gen penyandi Lactonase dipotong dengan enzim restriksi dan ditransformasikan pada vektor, plasmid yang dihasilkan kemudian diklon pada inang bakteri lain. Hasil kloning bakteri yang mengandung gen penyandi Lactonase kemudian dikultur untuk memproduksi protein Lactonase rekombinan.

Kerangka konseptual penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut ini.



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan:  = yang dilakukan dalam penelitian ini

### 1.5 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Karakter gen penyandi *Lactonase* dapat diketahui
2. Gen penyandi *Lactonase* dapat diisolasi dengan metode PCR dan diklon
3. Gen penyandi *Lactonase* dari *P. areuginosa* PAO1 dapat dikarakterisasi dalam sistem ekspresi di *E. coli*
4. Protein *Lactonase* rekombinan dapat diekspresikan dalam sistem *E. coli*
5. Terjadi hidrolisis oleh protein *Lactonase* rekombinan terhadap substrat *N-hexanoyl-L-homoserinelactone*

# **BAB 4**

# **METODE PENELITIAN**

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptis laboratoris yang terdiri dari 3 tahap penelitian, yaitu:

1. Karakterisasi bakteri sumber gen *Lactonase*
2. Kloning gen penyandi *Lactonase* (*halS*) di *E. coli* TOP10, M15 , dan BL21
3. Ekspresi dan purifikasi protein

### 4.2 Tempat Penelitian

Penelitian tahap pertama, kedua, dan ketiga dilakukan di *Charite, Institut für Biochemie*, Berlin, Jerman. Analisis 16S rRNA dilakukan di *Biotez Berlin-Buch GmbH*, Berlin, Jerman. Sedangkan analisa sekuen DNA dilakukan di *Eurofin GmbH*, Jerman. Transformasi dengan *E. coli* BL 21 dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, Surabaya.

### 4.3 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2008 sampai dengan September 2009.

### 4.4. Tahap I : Karakterisasi Bakteri Sumber Gen Lactonase

#### 4.2.1 Bahan

##### A. Sampel Penelitian

Genom DNA dari bakteri *P. aeruginosa* PAO1 diperoleh dari DSMZ (*Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH*), Braunschweig, Jerman

##### B. Bahan Kimia

Bahan untuk optimalisasi gen Lactonase adalah Primer spesifik yang didesain berdasarkan protein homolog dengan menggunakan program *DNA STAR Lasergene*. Sekuen primer F-Primer (CAK55506: AHL-Sal1\_1F27) : 5' gTC gAC AgA ATC gTC AgC

CgC gAC CgC 3', dan R-Primer (CAK55506: AHL-Sal1\_763R21) : 5' gTC gAC gCT CTg gCC TCC gCC 3'. Gen *halS* yang mengkode protein didapatkan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), menggunakan DNA genom sebagai cetakan.

Sedangkan untuk pemeriksaan 16S rRNA digunakan primer campuran sebagai berikut : F-Primer 16S-rRNA\_340F21 (5 $\mu$ M) sebesar 442bp dengan sekuen : 5' Cgg gAg gCA gCA gTg ggg AAT 3' dan R-Primer 16S-rRNA\_760R22 (5 $\mu$ M) dengan sekuen : 5' CCT gTT TgC TCC CCA CgC TTT C 3'; serta F-Primer 16S-rRNA\_340F21 (5 $\mu$ M) sebesar 767bp dan R-Primer 16S-rRNA\_1087R20 (5 $\mu$ M) dengan sekuen : 5' ggT TgC gCT CgT TgC ggg AC 3'.

Untuk transformasi pada *E.coli* TOP10 diperlukan bahan-bahan sebagai berikut : Aqua, BD Adventage™ 2 PCR Buffer, dNTP, BD Adventage™ 2 Polymerase Mix.

Restriksi dengan enzim *PstI* memerlukan: air destilasi, Buffer NEB3, BSA dan enzim *PstI*.

#### 4.2.2. Peralatan Penelitian

Peralatan untuk konstruksi dan kloning gen *halS* adalah : T3 Thermocycler "Biometra", Thermobath "Haale", Microcentrifuge, 0,2 ml PCR Tube, 1,5 ml microcentrifuge tube, Plate, Incubator chamber, Shaker.

#### 4.2.3. Metode

Karakterisasi bakteri berdasarkan DNA yang dipergunakan dilakukan dengan *Real Time* PCR sebagai berikut : 1.00  $\mu$ L genomik DNA ditambah dengan 1.80  $\mu$ L aqua, 0.20  $\mu$ L SYBR Green dan 5.00  $\mu$ L 2Xbioline buffer; kemudian ditambahkan 2.00  $\mu$ L Primer-campuran.

Campuran dimasukkan ke dalam mesin *Real Time* PCR, denaturasi 95 °C selama 7 menit, 35 siklus masing-masing 95 °C selama 30 detik, *annealing* 60 °C selama 20 detik dan *annealing* 72 °C selama 30 detik, dipertahankan 60 °C dengan kenaikan 1°C per menit, dan *extention* 99 °C dipertahankan 5 detik. Hasilnya kemudian dikirimkan ke

*Biotez Berlin-Buch GmbH*, Berlin, Jerman untuk memperoleh hasil sekuensing 16S rRNAny.

Optimalisasi gen yang mengandung Lactonase, diawali dengan merancang primer menggunakan DNASTAR Lasergene Program. Primer digunakan untuk mengisolasi gen penyandi Lactonase dengan panjang untai 783 bp melalui primer sebagai berikut: F-Primer (CAK55506:AHL-Sal1\_1F27) : 5' gTC gAC AgA ATC gTC AgC CgC gAC CgC 3' , dan R-Primer (CAK55506:AHL-Sal1\_763R21) : 5' gTC gAC gCT CTg gCC TCC gCC 3'

Amplikon gen pengkode AHL-Lactonase/*halS* dari *P. aeruginosa* PAO1 kemudian dipisahkan dengan enzim *PstI*, selanjutnya dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Purifikasi DNA dilakukan dengan *QIAquick column*.

Hasil dari purifikasi DNA diinsersikan pada TOPO TA vector pCR®4 kemudian ditransformasikan pada *E. coli* TOP10. DNA rekombinannya dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

#### **A. Konstruksi DNA Plasmid yang Mengandung Gen penyandi Lactonase (*halS*)**

Konstruksi plasmid yang mengandung gen penyandi Lactonase (*halS*) sebelum dilakukan kloning dilakukan dengan urutan cara

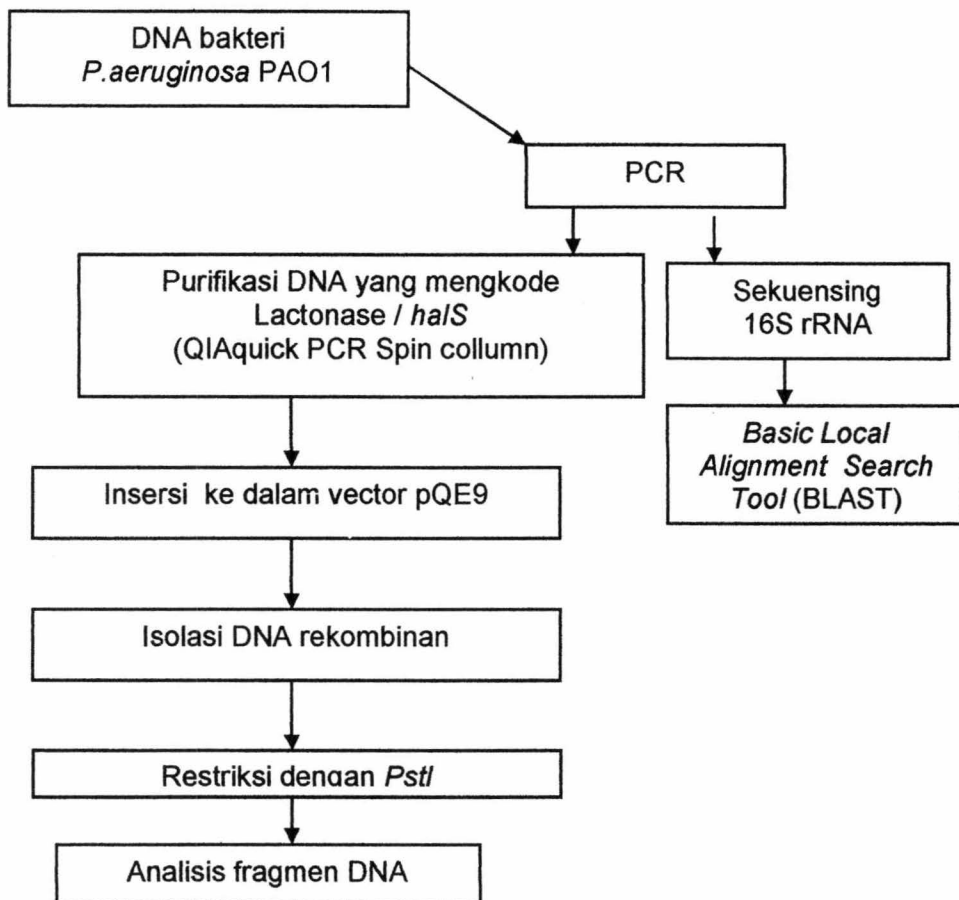
##### **1. PCR AHL-lactonase (CAK55506) pada *P. aeruginosa* PAO1**

Produk PCR yang mengandung gen AHL-Lactonase dilakukan dengan cara mencampurkan 17.50 µl Aqua, 2.50 µl 10x BD Advantage 2 PCR-Buffer, 0.50 µl dNTP (je 10 mM), 1.50 µl F-Primer CAK55506:AHL-Sal1\_1F27 (5µM), 1.50 µl R-Primer CAK55506:AHL-Sal1\_763R21 (5µM), 0.50 µl 50x BD Advantage™ 2 Polymerase Mix, dan 1,00µl DNA genome (100 ng/µl)

Primer yang dipergunakan pada teknik PCR ini adalah : F-Primer (CAK55506:AHL-Sal1\_1F27): 5' gTC gAC AgA ATC gTC AgC CgC gAC CgC 3' dan R-

Primer (CAK55506: AHL-Sal1\_763R21) : 5' gTC gAC gCT CTg gCC TCC gCC 3' untuk gen penyandi Lactonase sebesar 783 bp.

Skema operasional penelitian tahap I disajikan pada Gambar 4.1 berikut ini.



**Gambar 4.1.** Skema Penelitian Tahap I

Jika sudah tercampur kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan amplifikasi sebagai berikut : denaturasi 95 °C selama 3 menit, 97 °C selama 15 detik, *annealing* 65-68°C selama 20 detik, 68 °C selama 60 detik, *extention* 70 °C selama 10 detik dan tetap pada suhu 10 °C; dilakukan sebanyak 34 siklus. Hasilnya kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose.



## 2. Purifikasi DNA yang mengkode Lactonase

Fragmen DNA dari gel agarose dipotong dengan scalpel yang bersih dan tajam, kemudian potongan gel ditimbang dalam tube plastik bening. Ditambahkan 3 volume Buffer QG ke 1 volume gel (100 mg ~ 100 ml). Jumlah maksimum potongan gel per *QIAquick spin column* adalah 400 mg; untuk potongan gel yang lebih berat dari 400 mg, digunakan lebih dari satu kolom. Hasilnya diinkubasi pada 50°C selama 10 menit (atau sampai potongan gel larut). Untuk mempercepat kelarutan gel, dikocok dengan memvortex tube setiap 2-3 menit selama inkubasi. Setelah potongan gel larut seluruhnya, ditandai dengan warna campuran menjadi kuning.

*QIAquick spin column* ditempatkan dalam 2-ml tube koleksi. Untuk mengikat DNA, sample dimasukkan ke dalam *QIAquick spin column*, dan disentrifuge selama 1 menit. Supernatan dibuang dan *QIAquick spin column* ditempatkan kembali pada tube koleksi yang sama. Ditambahkan 0.5 ml Buffer QG pada *QIAquick spin column* dan disentrifuge selama 1 menit. Ditambahkan 0.75 ml buffer PE pada *QIAquick column* untuk mencuci dan disentrifuge selama 1 menit. Supernatan dibuang dan *QIAquick column* disentrifuge 1 menit lagi pada 13.000 rpm. Setelah itu *QIAquick column* ditempatkan pada 1.5-ml tube microsentrifuge. Untuk melarutkan DNA, ditambahkan 30 µl air destilasi. di tengah *QIAquick column*, dibiarkan selama 1 menit dan disentrifuge selama 1 menit. Hasilnya adalah DNA murni yang mengandung gen yang mengkode Lactonase

## 2. Inseri ke dalam vektor pQE9

Proses inseri dilakukan dengan mencampurkan air destilasi 0.00 µl, pQE9 x59-1 (10 ng/µl) 2.00 µl, DNA AHL-lactonase hasil purifikasi 2.00 µl, 10x Buffer (Roche) 0.50 µl dan T4 DNA Ligase (5U/µl, Roche) 0.50 µl; kemudian disimpan semalam dalam lemari pendingin.

### 3. Analisis Restriksi dengan *Pst*I

DNA rekombinan yang diperoleh kemudian direstriksi dengan *Pst*I. Campuran reaksi restriksi sebagai berikut: 3,40 µl air destilasi, 1 µl buffer NEB3, 0,1 µL 100X BSA (10 mg/ml), 0.50 µL *Pst*I (20 U/µL), 5 µL produk PCR. Hasilnya dianalisis dengan elektroforesis gel agarose.

#### 4.5 Tahap II : Kloning gen penyandi Lactonase (*ha*S) di *E. coli* TOP10, M15, dan BL21

Setelah diperoleh plasmid yang mengandung gen *ha*S, selanjutnya dilakukan proses kloningnya dengan urutan seperti pada Gambar 4.2.

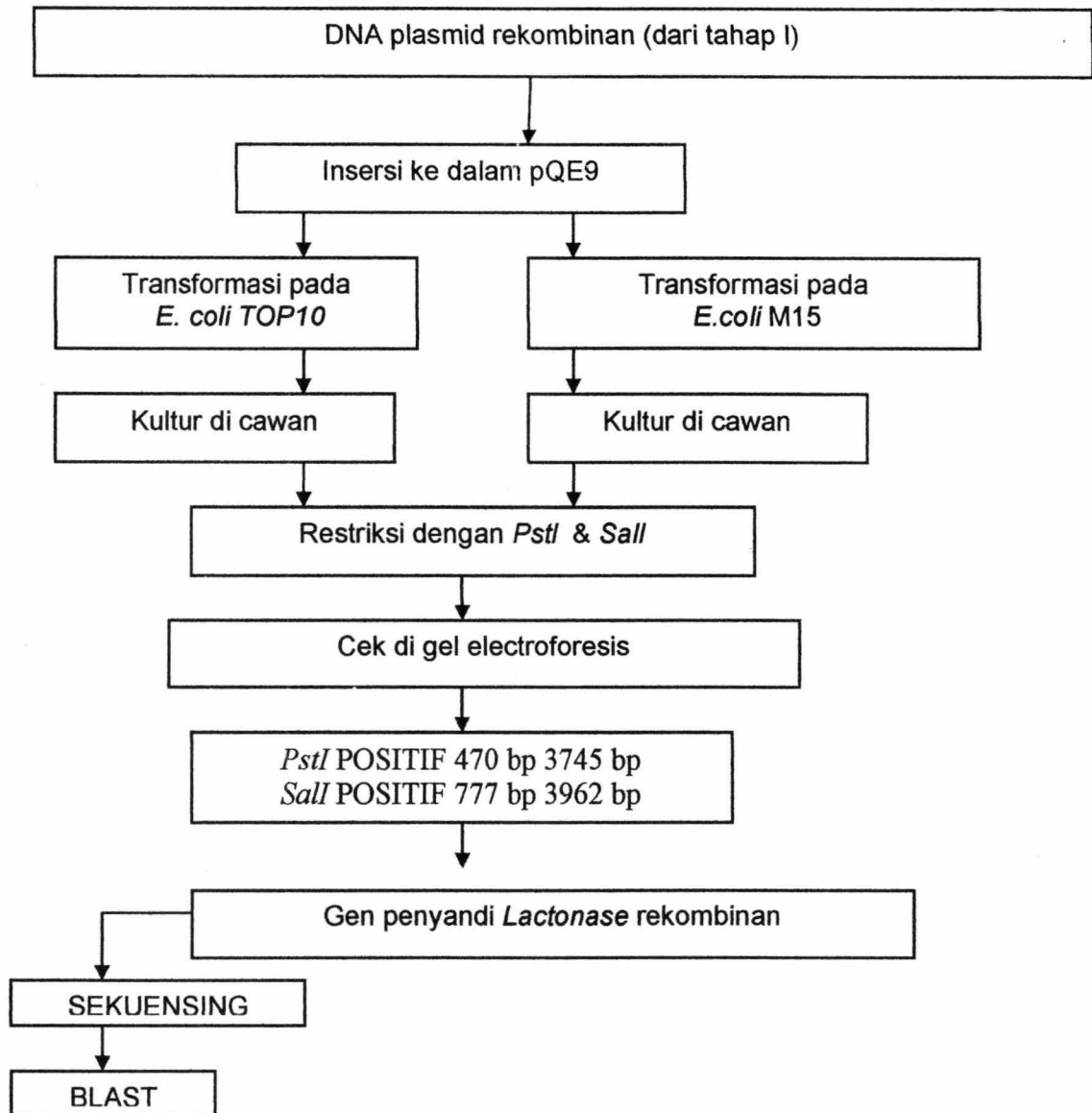
##### 4.5.1. Bahan alat

Untuk memperoleh plasmid yang mengandung gen *ha*S dan mengklonnya diperlukan bahan-bahan: QIAprep® Mini prep, S.O.C. Medium (Invitrogen) yang disimpan pada 4 °C atau temperatur ruang; merupakan campuran: 2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, serta 20 mM glucose, TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) dan LB medium

Untuk transformasi pada *E.coli* diperlukan bahan-bahan sebagai berikut : sel inang M15[pREP4], LB medium, LB agar, Psi broth, TFB1, TFB2, larutan stok Kanamycin dan Ampicillin.

##### 4.5.2. Metode

Kloning gen *ha*S dilakukan dengan purifikasi DNA rekombinan., kemudian diinsersi pada vektor pQE9, restriksi dengan enzim *Pst*I dan *S*all, kemudian ditransformasi pada *E. coli* TOP10 serta M15[pREP4]. Hasilnya diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa..

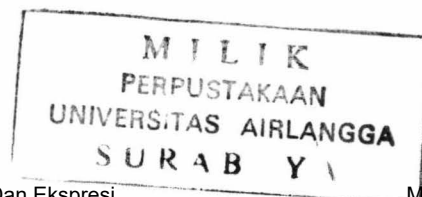


Gambar 4.2. Skema Penelitian Tahap II

#### A. Persiapan dan Transformasi pada Sel *E. coli* TOP10

Pada tahap awal 2.00  $\mu\text{L}$  produk PCR dicampur dengan, 0.50  $\mu\text{L}$  salt solution dan 0.50  $\mu\text{L}$  TOPO TA vector pCR $\text{\textcircled{R}}$ 4, seluruhnya dicampur dengan hati-hati dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang (22-23  $^{\circ}\text{C}$ )

Reaksi dilakukan di es dan diproses sesuai petunjuk umum untuk transformasi sel kompeten. Reaksi TOPO $\text{\textcircled{R}}$  Cloning dapat disimpan pada suhu -20  $^{\circ}\text{C}$  semalam



Sebelum proses transformasi, dilakukan persiapan dengan cara, *waterbath* diatur pada suhu 42 °C, Vial S.O.C medium dihangatkan dari Box 2 ke suhu kamar, Cawan yang akan digunakan dihangatkan pada 37 °C selama 30 menit. 1 vial Oneshot® sel direndam dalam es untuk setiap transformasi

2 µL TOPO® *Cloning reaction* dari tahap sebelumnya ditambahkan pada vial *One Shot® Chemically Competent E. coli* dan dicampur perlahan,, kemudian diinkubasi di es selama 5 sampai 30 menit

Sel diberi kejutan panas selama 45 detik pada 42 °C tanpa dikocok, kemudian tube dipindahkan ke es selama 2 menit, ditambahkan 250 µL S.O.C. medium pada temperatur kamar. Tube ditutup erat-erat dan dikocok secara horizontal (200 rpm) pada suhu 37 °C selama 1 jam.

10-50 µL dari setiap transformasi dibiakkan pada cawan agar selektif yang telah dihangatkan dan diinkubasi semalam pada 37 °C. Untuk menjamin walaupun membiakkan sedikit, ditambahkan 20 µL S.O.C. medium.

#### **B. Persiapan Sel *E. Coli* M15[pREP4]**

Sel-sel *E. coli* M15[pREP4] dibuka dari vial dengan tusuk gigi steril atau *inoculating loop*, dan disebar di atas LB agar yang mengandung 25 µg/ml kanamycin.. Diinkubasi semalam pada 37°C. Diambil satu koloni dan diinokulasi pada 10 ml LB-kanamycin (25 µg/ml), kemudian ditumbuhkan semalam pada 37°C. 1 ml hasilnya dikultur semalam ditambahkan pada 100 ml LB medium yang sudah dihangatkan sebelumnya, mengandung 25 µg/ml kanamycin dalam labu 250 ml, dan digoyang terus menerus pada 37°C sampai OD600 mencapai 0.5 (kira-kira 90–120 menit). Kultur didinginkan dengan es selama 5 menit, dan dipindahkan ke sebuah tabung sentrifuge steril. Disentrifuge dengan kecepatan rendah (5 menit, 4000 x g, 4°C). Supernatan hati-hati dibuang. Sel selalu diletakkan dalam es. Sel dilarutkan lagi dalam TFB1 buffer (30 ml untuk 100 ml kultur) dingin (4°C) dan tetap diletakkan dalam es selama 90 menit.

Disentrifuge kembali (5 menit, 4000 x g, 4°C), supernatan dibuang. Sel harus selalu dalam es..

Sel dilarutkan kembali dalam 4 ml TFB2 buffer dingin. Disiapkan 100–200 µl dalam tube microcentrifuge steril dan dibekukan dalam nitrogen cair. Kompeten sel disimpan pada suhu –70°C.

### **C. Transformasi pada sel *E.coli* M15 dan BL21**

Dilakukan persiapan transformasi sebagai berikut: *water bath* diatur pada 42 °C dan vial medium S.O.C. dihangatkan pada suhu kamar. Cawan yang akan digunakan dihangatkan pada 37°C selama 30 menit 1 vial sel M15 disimpan dalam es untuk setiap transformasi. 5 µl hasil reaksi ligasi ditambahkan ke vial sel *E. coli* M15 kemudian dicampur. Pencampuran tidak dengan memipet naik dan turun. Diinkubasi di es selama 30 menit. Sel diberi kejutan panas selama 45 detik pada suhu 42°C tanpa digoyang. Tube segera dipindahkan ke es selama 2 menit.. Ditambahkan 150 µl medium S.O.C. pada suhu ruang. Tube ditutup dan digoyang secara horizontal (180 rpm) pada suhu 37°C selama 1 jam.

Hasil transformasi disebarakan pada cawan yang sudah dihangatkan terlebih dahulu dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Untuk menjamin penyebaran dengan jumlah volume sedikit, ditambahkan 20 µl S.O.C. medium

Transformasi pada sel *E. coli* BL21 dilakukan dengan prosedur yang sama seperti pada transformasi pada sel *E. coli* M15.

### **D. Penumbuhan kultur bakteri dalam *tube* atau *flask***

Koloni tunggal diambil dari goresan pada cawan selektif dan diinokulasi pada 1-5 ml LB medium yang mengandung antibiotik selektif (Ampicilin, 100 µg/ml). Diinkubasi selama 12-16 jam pada 37 °C dengan digoyang.

Sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi > 8000 rpm (6800 X g) pada sebuah *table top microcentrifuge* selama 3 menit pada temperatur ruang (15-25 °C). Supernatan dibuang hingga tinggal peletnya.

#### **E. Purifikasi Plasmid DNA dengan *QIAprep Spin miniprep Kit* dan *microcentrifuge*.**

Pelet sel bakteri direndam dalam 250 µl Buffer P1 dan ditransfer ke tube *microcentrifuge*. Ditambahkan RNase A pada buffer P1. Tak ada sel yang terlihat mengumpul sesudah pellet terendam. Jika LyseBlue reagent telah ditambahkan ke Buffer 1, botol buffer dikocok untuk menjamin partikel LyseBlue telah larut semuanya.

250 µl Buffer P2 ditambahkan dan dicampur langsung dengan membolak-balikkan tube 4-6 kali, proses tidak boleh lebih dari 5 menit. Jika Lyse Blue telah ditambahkan pada Buffer P1, suspensi sel akan menjadi biru sesudah penambahan Buffer P2. Pencampuran akan menghasilkan suspensi warna yang homogen.

350 µl Buffer N3 ditambahkan dan segera dicampur langsung dengan cara membolak-balik tabung 4-6 kali.. Campuran akan terlihat keruh. Jika LyseBlue telah digunakan, suspensi harus dicampur sampai semua warna biru hilang dan menjadi tak berwarna. Suspensi yang homogen tanpa warna menunjukkan bahwa SDS telah menguap seluruhnya. Disentrifuge selama 10 menit pada 13.000 rpm ( $\approx 17,900 \times g$ ) pada sebuah *table-top microcentrifuge*. Akan terbentuk pelet putih.

Supernatant dari langkah sebelumnya dimasukkan ke *QIAprep spin column* dengan pipet. Disentrifuge selama 30-60 detik kemudian supernatan dibuang. *QIAprep spin column* dicuci dengan menambahkan 0.5 Buffer PB dan disentrifuge kembali selama 30-60 detik, kemudian supernatan dibuang. *QIAprep spin column* dicuci dengan menambahkan 0.75 ml Buffer PE dan disentrifuge selama 30-60 detik. Supernatan dibuang, dan disentrifuge lagi selama 1 menit untuk membuang residu buffer pencuci.

*QIAprep column* diletakkan pada 1.5 ml *microcentrifuge* yang bersih. Untuk melarutkan DNA, ditambahkan 50 µl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) atau air di

tengah setiap *QIAprep spin column*, dibiarkan selama 1 menit dan dicentrifuge kembali selama 1 menit. Ditambahkan enzim restriksi *PstI* (7,7  $\mu$ l Aqua, 1,00  $\mu$ l Buffer NEB3, 0,20  $\mu$ l *PstI* (20 U/ $\mu$ l), 0,10  $\mu$ l 100X BSA (10 mg/ml)) dan disimpan dalam thermocycler 37 °C selama 23 jam

#### F. Analisis Elektroforesis Gel Agarosa

Dibuat 1 % gel agarosa (1 g agar dalam 100 ml TAE buffer (20 ml stock + 980 ml destillation water). Ditaruh dalam microwave 360 W selama 5 menit. Didinginkan dengan air mengalir, kemudian ditambahkan 5  $\mu$ l Ethidium bromide.

Plasmid ditambahkan 1  $\mu$ l loading buffer, kemudian dicentrifuge 10000 rpm, selama 8 detik pada 23 °C. Pada agarose gel, ditambahkan plasmid dan primer pada masing-masing sisi ( 1 kbp dan 100 bp) sebanyak 11  $\mu$ l, kemudian ditambahkan marker 5  $\mu$ l. Elektroforesis pada 83 V dan 84 mA

Setelah 1 jam gel agarosa diambil dan diperiksa menggunakan Biodoc Analyze dari *Biometra*.

#### G. Sekuensing DNA

Analisa sekuen DNA dilakukan di *Eurofin GmbH*, Jerman. Pencarian kesamaan database untuk sekuen nukleotida dilakukan dengan program BLAST dari *the National Center of Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.com](http://www.ncbi.nlm.nih.com)).

#### 4.6. Tahap III : Ekspresi dan Purifikasi Protein.

Ekspresi protein ditentukan dengan penentuan Massa molekul relatif protein melalui analisis SDS-Page dan Western Blot. Penentuan kdr prot yg diekspresikan ditentukan dgn metode bradford. Uji aktifitas protein dilakukan dengan menggunakan substrat N-hexanoyl-L-Homoserinelactone (3-oxo-C6-HSL).

##### 4.6.1. Bahan

Pada penelitian ekspresi protein diperlukan bahan-bahan : IPTG, 4Xlysis buffer (Promega), Lysis buffer P1 (Qiagen), BSA, MagneHis™ Protein Purification System and

protocol , larutan 1M imidazole (pH 8.0; untuk sel insekta atau mammalia atau medium kultur) , *additional binding/wash buffer*, NaCl padat, gel Acrylamide, 1.5 M Tris HCl pH 8.8, ddH<sub>2</sub>O, 10% (w/v) APS, TEMED, 25mM Tris, 190 mM glycine, 0.1 % SDS, larutan 10% asam asetat Rehidrasi (7 M urea, 65 mM DTT, 2 % CHAPS, 2 M thiourea, 0.8 % ampholyte, dan 0.02 % bromophenol blue), IPG drystrips (Bio-Rad atau Amersham), serta Reagent Silver staining, yaitu : *Fixing solution* (40% ethanol/ 10% asam asetat), *Sensitizing solution* ([Oxidizer] 30% ethanol/ 0.2% sodium thiosulphate/6.8 % sodium acetate), *Silver solution* (0.25% silver nitrat), *Developing solution* (2.5 % sodium carbonate/ 0.015% formaldehyde), menambahkan formaldehyde segera sebelum dipergunakan.

Untuk memurnikan protein pada transforman diperlukan bahan-bahan: Ni-NTA Spin Columns, LB medium, larutan stok Kanamycin dan Ampicillin, larutan stok IPTG, Buffers A–D, 5x SDS-PAGE sample buffer

Pada metode Bradford digunakan bahan-bahan : Bradford dye reagent concentrate (Bio-Rad), serta protein standard: 1 mg/ml BSA dalam air. Analisa protein dengan SDS-PAGE digunakan bahan-bahan: Reagent: *Fixing solution* (40% ethanol/ 10% asam asetat), *Sensitizing solution* ([Oxidizer] 30% ethanol/ 0.2% sodium thiosulphate/ 6.8 % sodium acetate), *Silver solution* (0.25% silver nitrat), *Developing solution* (2.5 % sodium carbonate/ 0.015% formaldehyde) menambahkan formaldehyde segera sebelum dipergunakan; serta *Stop solution* (5% acetic acid).

#### 4.6.2. Alat

Peralatan untuk ekspresi dan purifikasi Lactonase adalah : 37°C inkubator, shaker, magnetic separation stand, densitometer. Pada uji Bradford diperlukan peralatan : Glass test tube, disposable 1 ml plastic cuvettes, Spectrophotometer. Sedangkan uji aktifitas memerlukan HPLC dengan panjang gelombang 280 nm, kolom ResQ, eluent A: Tris pH 8,0 dan eluent B: 1 M NaCl.



### 4.6.3. Metode

#### A. Ekspresi Protein

Single koloni dari hasil klon yang ditumbuhkan diambil dan ditumbuhkan dalam 5 ml LB medium. Ditambahkan 5  $\mu$ l Ampicilin(100 mg/ml), 5 $\mu$ l Kanamycin (50 mg/ml) kemudian sel diinduksi dengan menambahkan 5  $\mu$ L IPTG (1M); dikultur selama 23 jam pada 30 °C dan 175 rpm.

Keesokan harinya dipindahkan ke tube falcon dan disentrifuge 5000 rpm selama 3 menit. Pelet ditambahkan 30  $\mu$ L 4Xlysis buffer (Promega) dan 100  $\mu$ L Lysis buffer P1 (Qiagen), Volume ( $V_{ges}$ ) = 250 $\mu$ L. Supernatan dipindahkan dalam 0,5 ml tube dan pengukuran kadar protein diduga dengan metode Bradford

Standard kurva dibuat dengan larutan BSA dengan kadar yang berbeda, larutan stock BSA (1 mg/ml atau 10 mg/ml) dicampur dengan air di test tube. Kadar BSA dibuat dari 1 sampai 14  $\mu$ g/ml.

#### 1. Analisa Protein pada Transforman

##### Prosedur:

Satu koloni transforman diambil dan dimasukkan ke 1.5 ml media kultur yang mengandung ampicillin (100  $\mu$ g/ml) dan kanamycin (25  $\mu$ g/ml). Satu ekstra kultur diinokulasi sebagai kontrol noninduksi. Kultur ditumbuhkan semalam.

Sepuluh ml medium yang dihangatkan (termasuk antibiotik) diinokulasikan dengan 500  $\mu$ l kultur semalam, dan ditumbuhkan pada 37°C selama 30 menit, dengan digoyang terus menerus, sampai OD600 mencapai 0.5–0.7.

Ekspresi diinduksi dengan menambahkan IPTG sampai konsentrasi akhir 1 mM. IPTG tidak ditambahkan pada kultur yang berfungsi sebagai kontrol non induksi, Kultur ditumbuhkan selama 4–5 jam tambahan, dan dipindahkan ke tabung *microcentrifuge*. Sel dipanen dengan sentrifugasi selama 1 menit pada 15.000 x g, dan supernatant dibuang. Jika waktu ekspresi telah tercapai, 2 ml sampel diambil setiap interval jam,

pellet sel dikumpulkan, dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai semua sample siap untuk diproses.

Sel dilarutkan lagi dalam 400  $\mu\text{l}$  buffer B. Sel dilysis dengan cara memvortex, dilakukan hati-hati supaya sel tidak pecah. Larutan akan menjadi bening jika lysis selesai. Volume kultur yang digunakan tergantung pada tingkat ekspresi yang diharapkan. Jika protein diekspresikan pada level yang sangat tinggi (50–100 mg/liter) Pellet dilarutkan dari 2 ml kultur dalam 400  $\mu\text{l}$  buffer B, dapat digunakan 400  $\mu\text{l}$  dari 5x-*concentrated cell lysate* dalam buffer B akan mengandung kira-kira 100–200  $\mu\text{g}$  6xHis-tag protein. Untuk tingkat ekspresi yang lebih rendah (1–5 mg/liter), 10 ml kultur sel dapat dipergunakan untuk 25x-*concentrated cell lysate*. Pellet dilarutkan dari 10 ml kultur dalam 0.4 ml buffer B. 0.4 ml cell lysate mengandung kira-kira 10–50  $\mu\text{g}$  6xHis-tag protein.

Lysate disentrifuge selama 20–30 menit pada 15,000 x g untuk memisahkan kotoran sel, kemudian supernatant dipindahkan ke tube baru. Satu Ni-NTA *spin column* diisi dengan 600  $\mu\text{l}$  buffer B. Disentrifuge selama 2 menit pada 2000 rpm (kira-kira 700 x g). Supernatan lysate yang mengandung 6xHis-tagged protein dimasukkan ke Ni-NTA spin column yang sudah diisi.

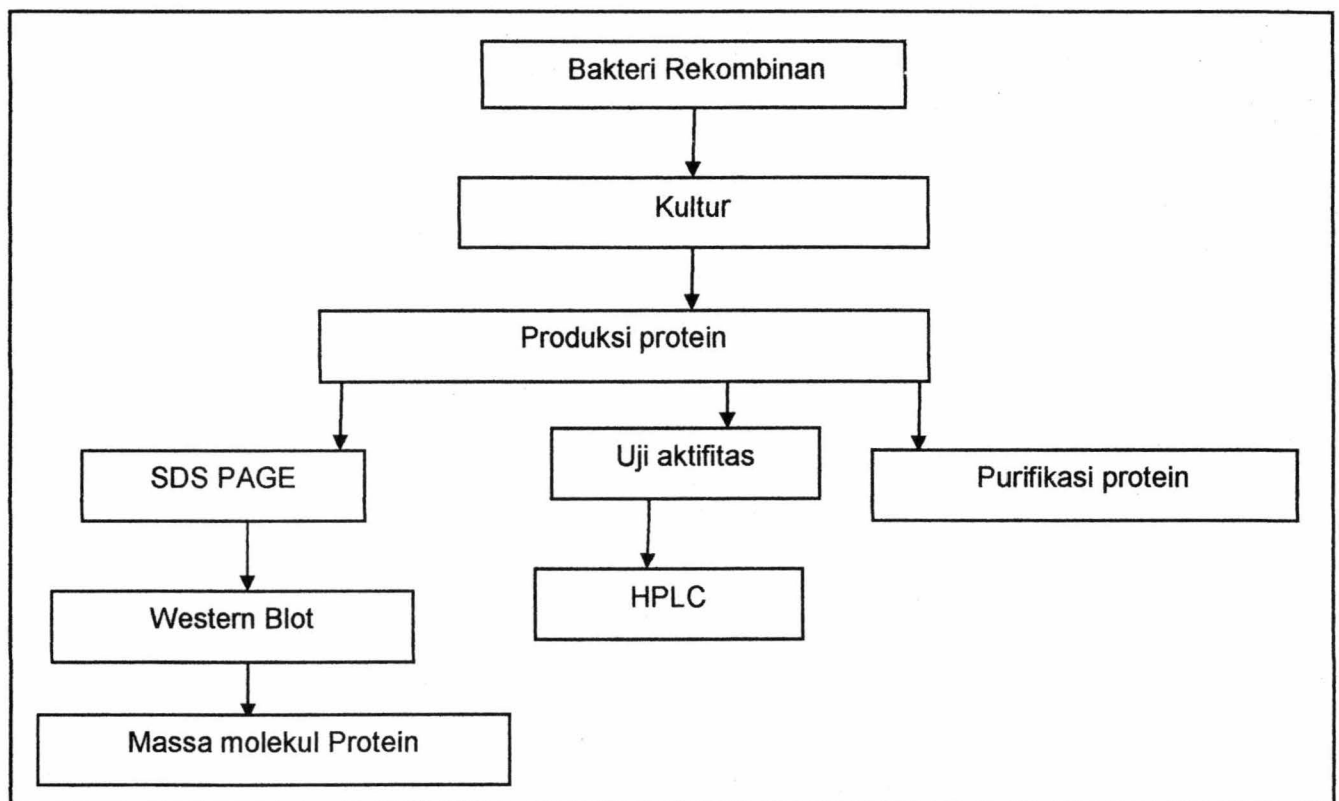
Ni-NTA *spin column* disentrifuge selama 2 menit pada 2000 rpm (sebanding dengan 700 x g), kemudian supernatant dikumpulkan digunakan untuk analisa SDS-PAGE. Ni-NTA spin column dicuci dua kali dengan 600  $\mu\text{l}$  buffer C. Disentrifuge selama 2 menit pada 2000 rpm (sebanding dengan 700 x g). Supernatan disimpan (fraksi pencucian) digunakan untuk analisa SDS-PAGE untuk mengecek kekuatan kondisi pencucian..

Protein dilarutkan dengan 2 x 200  $\mu\text{l}$  buffer E. Disentrifuge selama 2 menit pada 2000 rpm (sebanding dengan 700 x g), kemudian larutan dikumpulkan. Kebanyakan 6xHis-tag protein (>80%) dapat larut pada 200  $\mu\text{l}$  *bahan pelarut* pertama, khususnya jika protein lebih kecil daripada 30 kDa dimungkinkan. Sisanya akan larut pada 200  $\mu\text{l}$  kedua.

Jika protein bisa lebih dikonsentrasikan atau jika tingkat ekspresi yang diharapkan rendah, dilarutkan dalam 100–150  $\mu$ l pelarut dan/tanpa kombinasi pelarut.

Ditambahkan 2.5  $\mu$ l 5x SDS-PAGE sample buffer pada 10  $\mu$ l larutan semua sample, termasuk fraksi *unbound*, dan dididihkan selama 5 menit pada 95°C. Sampel dianalisa dengan SDS-PAGE.

Skema penelitian tahap III seperti yang terdapat pada Gambar 4.3 berikut ini



Gambar .4.3 Skema Penelitian Tahap III

## 2. Penentuan Konsentrasi Protein

Penentuan konsentrasi protein dilakukan dengan metode Bradford dengan prosedur sebagai berikut:

Dua blanko dan standar protein disiapkan masing-masing 1. 3. 5. 8 dan 15  $\mu$ g dalam 0,8 ml air. Dipipet 0,8 ml dan dipindahkan ke test tube. Ditambahkan 0,2 ml *concentrated dye reagent*. Tube dikocok hati-hati untuk mencegah busa. Diinkubasi

pada suhu kamar selama 5 menit. Spectrofotometer diatur pada posisi 0 (nol) pada OD<sub>595</sub> menggunakan dua blanko. Nilai OD versus blanko pada *reference cuve*.

Kurva diplot menggunakan angka-angka yang didapatkan dari standar A595 versus µg protein. Konsentrasi protein yang tidak diketahui dihitung dari kurva standard dan faktor pengenceran jika perlu.

## **B. Purifikasi protein**

### **1. Purifikasi protein**

Hasil biakan dikultur, ditambahkan 1 mmol IPTG ( µmol dalam pengenceran 1:1000) , kemudian dikultur lagi selama 3 jam dengan *shake* 28 °Cr. Hasil kultur dipindahkan ke botol plastik besar (1,5 liter) dan disentrifuge 4500 rpm, 4 °C selama 20 menit. Supernatan dibuang, pellet ditambah PBS kemudian di homogenisasikan 100000 psi, diulang 2 kali. Kemudian disentrifuge 1500 rpm selama 30 menit. Supernatan dicampur dengan 20 mL Ni -NTA pada ruang dingin yang bersuhu – 20 °C, dikocok 11 rpm selama 1 jam. Disentrifuge 2000 rpm selama 10 menit.

Dilakukan *Gravity protocol* dengan cara supernatan dibuang, pellet dicuci berturut-turut dengan larutan 2 mL 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan 300 mM NaCl pH 8.0 (dilakukan 4 kali). Dilanjutkan fraksinasi dengan 700 µL 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 300mM NaCl 200 mM Imidazol (dilakukan 8 kali)

Ditambahkan 140 µL gliserol pada fraksi 200 mM Imidazol, kemudian dilakukan kejutan dingin dengan Nitrogen cair, diambil dan disimpan di freezer. Diambil 20 µL untuk Westernblot.

### **2. Analisis Sodium Dodecylsulphate-Polyacrilamide Gel Electerophoresis (SDS-PAGE).**

Hasil purifikasi diambil 2 sample dari sampel yang digunakan, yaitu:

1. Hasil pencucian dengan Imidazol ditambahkan 16 µL air dan 4 µL air menjadi 20 µL
2. Fraksi: 20 µL

Sampel ditambahkan 8  $\mu\text{L}$  loading buffer serta 1,6  $\mu\text{L}$  *reducing agent* X 10 sampel. Masing-masing sampel diberi 8  $\mu\text{L}$  campuran ini, kemudian dipanaskan 99 °C selama 3 menit

Disiapkan 3  $\mu\text{L}$  marker dan 1  $\mu\text{L}$  loading buffer, serta gel disiapkan. Sampel disentrifuge selama 30 detik, kemudian disiapkan sample 12  $\mu\text{L}$  ditambah 7  $\mu\text{L}$  marker dan 1  $\mu\text{L}$  loading buffer.

Dimasukkan ke dalam elektroforesis gel agarosa, yang pertama diatur pada voltage 100 V selama 15 menit, kemudian dilanjutkan pada voltage 150 V selama 40 menit.

Setelah selesai gel dicuci dengan air destilasi 3 X masing-masing selama 5 menit, digoyang secara terus menerus (Biometra WT 12). Dikeringkan, ditambah *staining solution*, kemudian ditambahkan air dan *dishaker* selama 1,5 jam

### 3. Western blot

Penentuan massa molekul protein dilakukan dengan metode Western Blot, dengan cara sebagai berikut: 9  $\mu\text{L}$  (11,88 mg) protein dicampur dengan 3  $\mu\text{L}$  4X Roti Loading buffer, kemudian dipanaskan selama 10 menit pada 95 °C.

Protein dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa, biasanya dengan metode SDS-PAGE, kemudian protein ditransfer ke selebar kertas khusus *blotting* yang disebut nitrocellulose, Protein akan menunjukkan pola yang sama dengan yang ada di gel.

*Blot* diinkubasi dengan protein (misalnya protein susu) untuk berikatan dengan daerah yang lengket pada nitrocellulose. Antibodi kemudian ditambahkan kelarutan yang dapat berikatan dengan protein spesifik.

Letak antibodi nampak dengan menginkubasinya dengan substrat bening yang ditempelinya enzim yang melapisi produk berwarna yang dapat dilihat dan difoto.

Pertama kali Blot buffer disiapkan, serabut *scotch* direndam sampai tidak ada gelembung. Gel diletakkan dengan posisi antara *scotch*-kertas filter –kertas blot - sample-kertas filter -*scotch*. Kemudian di elektroforesis 250 A selama 60 menit

Setelah selesai kertas blot diambil, diberi larutan Ponceau dan dicuci lagi dengan air destilasi. Blotting di fotocopy, dikeringkan kemudian dipotong. Blot dipisahkan dengan marker dan sample direndam dalam larutan campuran 5 % susu bubuk dengan air, ditunggu 1,5 jam dengan digoyang. Blot antibody diambil, dikeringkan, dan dicuci dengan PBS 0,3 %, dan dikeringkan lagi. Ditambahkan 4 mL PBS, kemudian ditambahkan 1  $\mu$ L AB- $\alpha$  His Tag- Mouse IgG (Histag Antibody), hingga pencairan 1:4000. Setelah itu digoyang semalam.

Kertas Blot dicuci dengan PBS 0,3 % Tween, direndam dengan PBS lagi 5 menit 3 X shaker. Setelah selesai dikeringkan dan direndam dengan ditambahkan 4 mL PBS 0,3 % dan 1  $\mu$ L  $\alpha$  R-POD, kemudian *dishaker* selama 1 jam

Marker dicuci dengan PBS 0,3 % Tween, kemudian direndam dengan PBS 3 X shaker, masing-masing selama 5 menit. Dikeringkan, direndam dengan 2 mL PBS 0,3 %, kemudian ditambah 2  $\mu$ L  $\alpha$  R-POD dan *dishaker* selama 1 jam

Kertas Blot dan Marker dicuci 2 X dengan PBS, kemudian direndam PBS selama 5 menit, *dishaker*, diulang 3 X. Selanjutnya dikeringkan, dan direndam dengan destilated water. Ditambahkan 3 mL Western Lighting Plus ECL (Perkin Elmer LAS. Inc.), masing-masing:

A. Oxidizing Reagent Plus

B. Enhanced Luminol Reagent Plus

Setelah selesai dikeringkan dan dimasukkan plastik, dan dibaca menggunakan Las-1000 Fuji Film, program Mac OS 9.2.

### C. Uji Aktifitas dengan Substrat N-hexanoyl-L-Homoserinelactone (3-oxo-C6-HSL)

Uji aktifiitas protein rekombinan dilakukan dengan HPLC dengan panjang gelombang 280 nm, kolom ResQ, eluent A: Tris pH 8,0 dan eluent B: 1 M NaCl .

Kontrol disiapkan 1000  $\mu$ L 0,1 M NaPi pH 8.0 ditambah 5  $\mu$ L Substrat, Sedangkan sampel disiapkan 1900  $\mu$ L 0.1 M NaPi pH 8.0 ditambah 100  $\mu$ L Lactonase dan 10  $\mu$ L substrat N-hexanoyl-L-Homoserinelactone (3-oxo-C6-HSL)

Ke duanya dipanaskan 28 °C, setelah 15 min dan 60 min, diambil 500  $\mu$ L kontrol ditambah 500  $\mu$ L Methanol, serta 500  $\mu$ L sample ditambah 500  $\mu$ L methanol. Setelah 30 menit dan 45 menit, diambil 500  $\mu$ L sampel dan 500  $\mu$ L Methanol, dimasukkan ke tube lain kemudian dicentrifuge 4 °C 14000 rpm selama 5 menit. Setelah itu supernatan diambil dan diperiksa dgn HPLC

### D. Analisis Bioinformatika

Dengan bioinformatika, kemudian hasil pengukuran ini dibandingkan dengan Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> atau <http://www.ncbi.nlm.nih.org> ). Kesamaan sekuen protein dari nukleotida dilakukan menggunakan program BLAST melalui Internet, dilanjutkan dengan pencarian sisi aktif protein yang dilakukan melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.org>.

# **BAB 5**

# **HASIL PENELITIAN**



## BAB 5 HASIL PENELITIAN

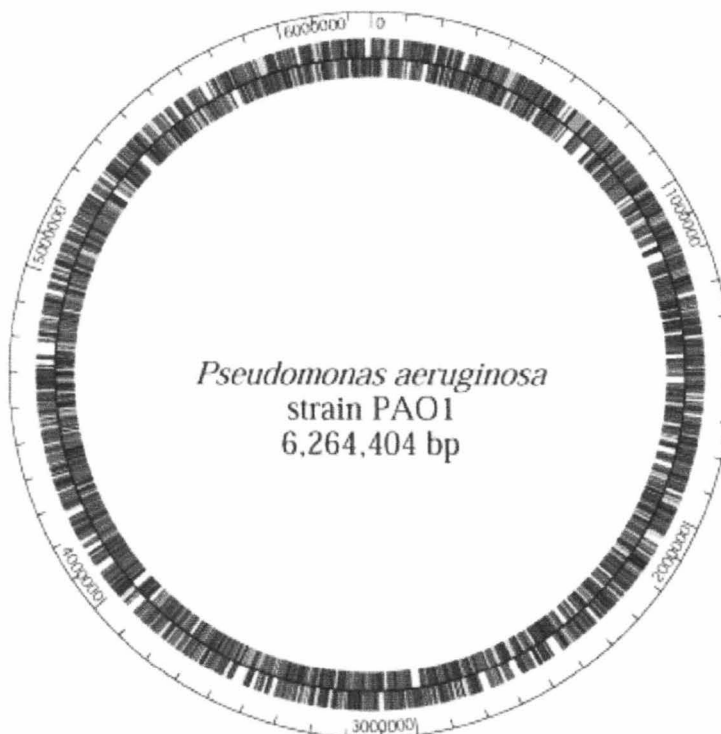
Hasil penelitian ini disusun berdasarkan tahapan penelitian yaitu :

1. Karakterisasi bakteri penyandi gen Lactonase
2. Konstruksi plasmid dengan gen Lactonase
3. Ekspresi dan purifikasi protein rekombinan Lactonase

### 5.1 Karakterisasi Bakteri dan Gen Penyandi Lactonase

Karakterisasi bakteri *P. aeruginosa* PAO1 dilakukan sebagai langkah awal untuk memperoleh gen penyandi Lactonase dari bakteri *P. aeruginosa* PAO1.

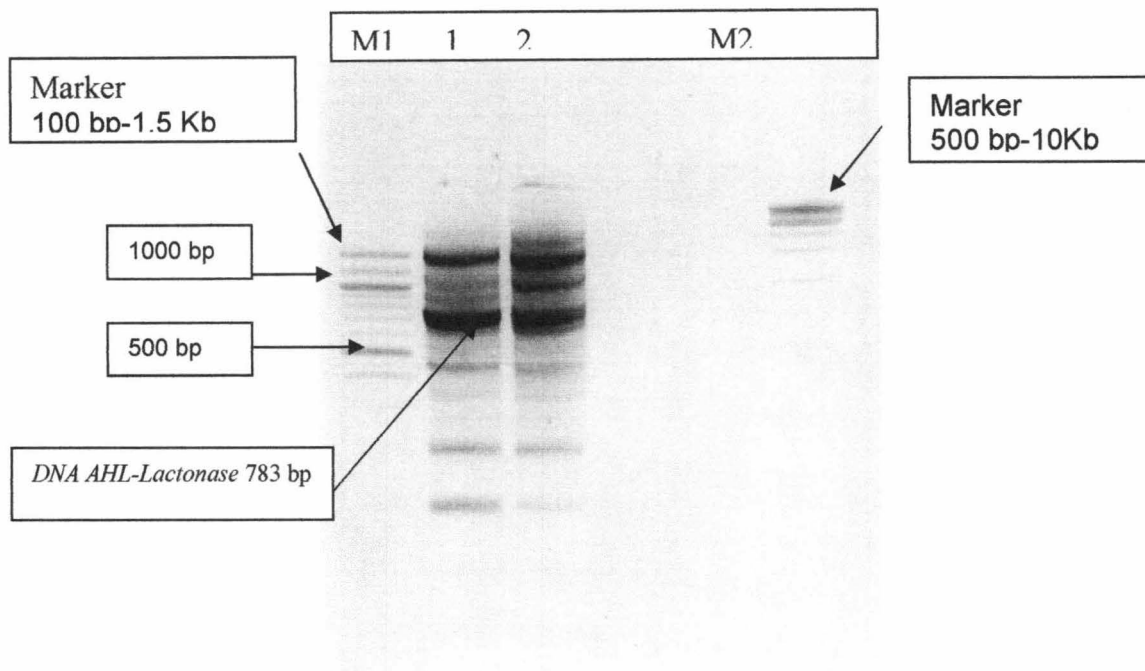
Dari data yang ada diperoleh panjang untaian DNA bakteri *P. aeruginosa* PAO1 yang digunakan adalah 6.264.404 bp ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) (Gambar 5.1).



**Gambar 5.1.** DNA bakteri *P. aeruginosa* PAO1 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

Konstruksi plasmid dengan gen penyandi Lactonase dilakukan pada teknik PCR dengan primer F-Primer (CAK55506:AHL-Sal1\_1F27) : 5' gTC gAC AgA ATC gTC AgC CgC gAC CgC 3' dan R-Primer ( CAK55506:AHL-Sal1\_763R21) : 5' gTC gAC gCT CTg

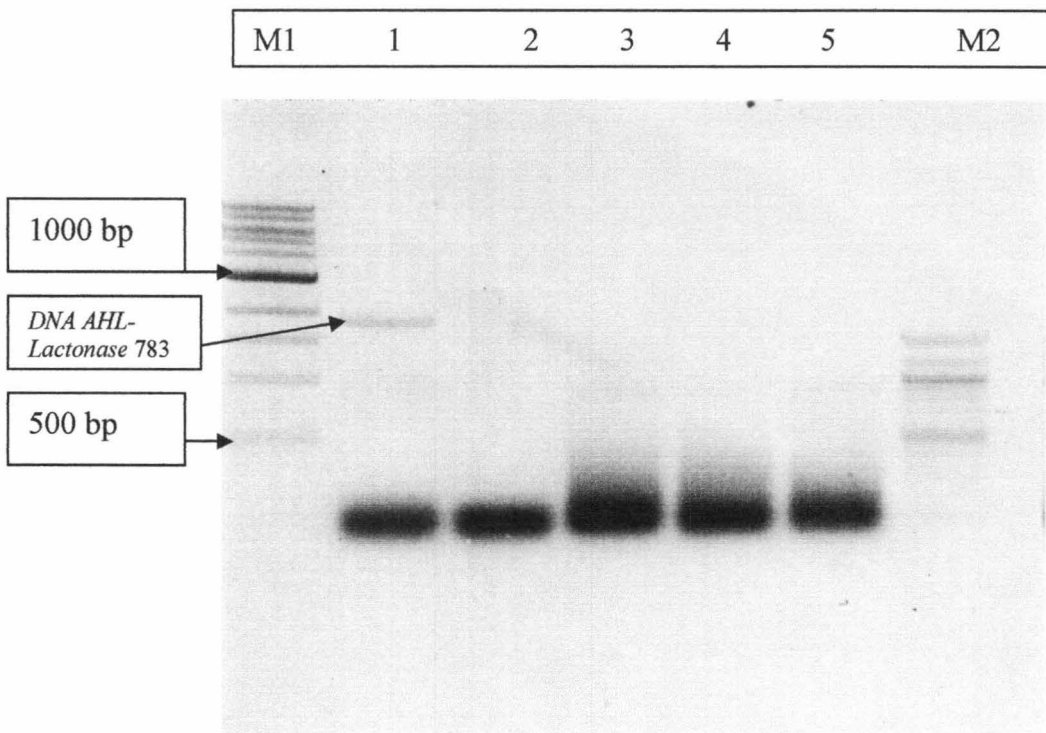
gCC TCC gCC 3'. Melalui teknik PCR diketahui panjang untai DNA AHL-Lactonase hasil PCR dari *P. aeruginosa* PAO1 adalah 783 bp (Gambar 5,2).



**Gambar 5.2.** Amplikon gen penyandi AHL-Lactonase

Keterangan : Tanda panah menunjuk pada pita 783 bp, merupakan pita DNA AHL-Lactonase, M 1 = marker 100-1,5 Kb , LANE 1-2 = sampel M2= marker 500 bp-10Kb

Hasil PCR kemudian dibuktikan melalui ligasi dengan enzim *T4DNA Ligase* dan restriksi dengan enzim *PstI* kemudian hasilnya dicek di gel agarose diperoleh panjang untai pita pada 783 bp (Gambar 5.3)



**Gambar 5.3.** Hasil elektroforesis kloning gen lactonase dengan enzim restriksi *Pst*I. Keterangan : Tanda panah 1 menunjuk pada pita 471 bp, merupakan pita hasil restriksi dengan enzim *Pst*I M1= marker 100 bp-1,5 Kb, LANE 1-5 = sampel hasil PCR, M2= marker 500 bp-10 Kb

Dari hasil *real time* PCR, selain mendapatkan gen penyandi Lactonase juga didapatkan hasil 16S rRNA *P aeruginosa* PAO1 yang hasil *alignment*nya identik 100 % dengan *P. aeruginosa* strain ATCC 10145T. Hasil *alignment*nya dapat dilihat pada Gambar 5.5.

*Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 10145T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Length=1489  
 Score = 812 bits (900), Expect = 0.0  
 Identities = 450/450 (100%), Gaps = 0/450 (0%)  
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1      GTATTAACTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTC
60          |
Sbjct 455    GTATTAACTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTC
396
Query 61     ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCC
120        |
Sbjct 395    ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCC
336
Query 121    TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAG
180        |
Sbjct 335    TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAG
276
Query 181    TTACGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTC
240        |
Sbjct 275    TTACGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTC
216
Query 241    ATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCACTTTCTCCCTCAGGACGTATGCGGTATTA
300        |
Sbjct 215    ATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCACTTTCTCCCTCAGGACGTATGCGGTATTA
156
Query 301    GCGCCCGTTTCCGGACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTCACCCG
360        |
Sbjct 155    GCGCCCGTTTCCGGACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTCACCCG
96
Query 361    TCCGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCT
420        |
Sbjct 95     TCCGCCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCT
36
Query 421    GCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCA 450
          |
Sbjct 35     GCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCA 6
  
```

**Gambar 5.4.** Hasil *alignment* 16S rRNA *P. aeruginosa* PAO1

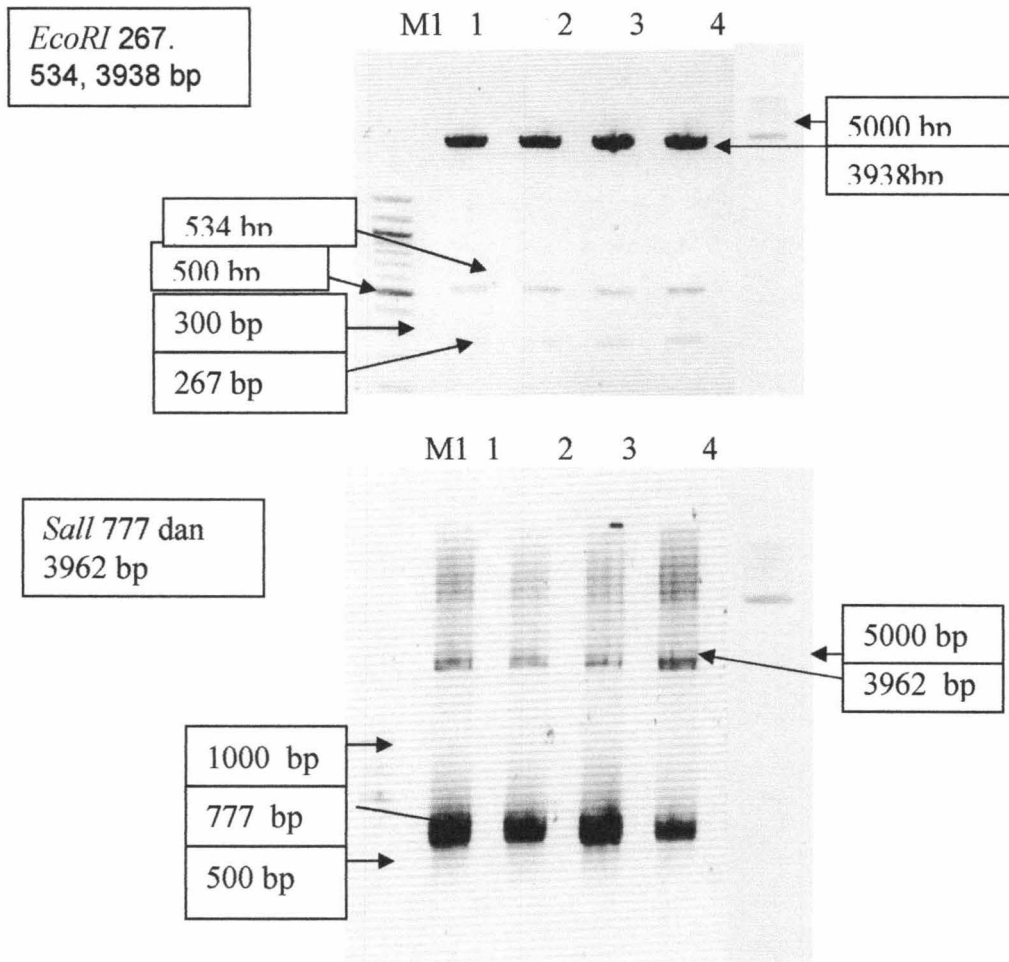
Keterangan : warna merah menunjukkan ciri gen penyandi Lactonase (Kalia *et al.*, 2011)

## 5.2 Kloning gen Lactonase pada vector *E. coli* TOP10, M15[pREP4] dan BL 21

Kloning gen penyandi Lactonase dilakukan dengan menggunakan vektor plasmid pQE yang dimasukkan ke dalam inang *E. coli* TOP10.

Pemurnian DNA yang mengandung gen penyandi Lactonase diambil dari potongan gel agarose hasil PCR yang mengandung gen penyandi Lactonase, dilakukan dengan QIA *quick column*. Setelah diperoleh elusi DNA, selanjutnya diinsersi ke dalam vektor TOPO TA pCR®4 dan ditransformasikan ke inang *E. coli* TOP10, yang ditumbuhkan pada agar dan diperoleh 100-150 koloni.

Plasmid yang diperoleh kemudian direstriksi dengan *EcoRI* dan terpotong pada 267, 534, dan 3938 bp; sedangkan ketika direstriksi dengan *Sall* terpotong pada 777 dan 3962 bp (Gambar 5.5).



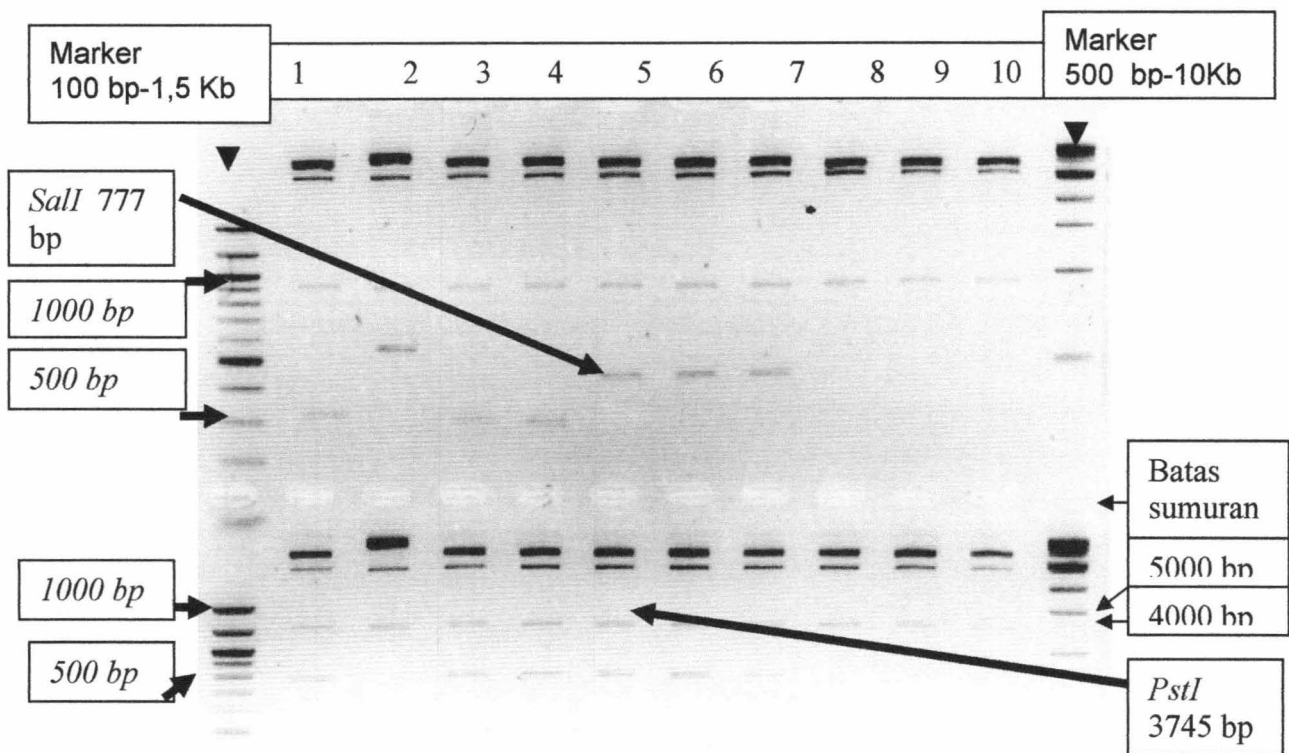
**Gambar 5.5.** Hasil restriksi hasil PCR dengan *EcoRI* dan *Sall* pada gel agarosa  
Keterangan: M1=marker 100-1,5 Kb , LANE 1-4 = sampel, ,

Plasmid dengan gen penyandi Lactonase diligasi dengan T4-DNA Ligase, kemudian disimpan semalam dan diklon pada *E. coli* TOP10 dan berhasil ditumbuhkan 150 koloni.

Hasil ditransformasi, kemudian dilakukan uji ulang untuk mengecek hasilnya dengan enzim restriksi *PstI* dan *Sall*. Hasil agarose terhadap fragmen *PstI* menunjukkan adanya pita dengan bp sebesar 318 bp dan 3898 bp yang tidak sesuai dengan hasil orientasi

sebelumnya yaitu 417 bp. Sedangkan hasil restriksi dengan *Sall* menunjukkan pita dengan orientasi yang tepat di 777 bp dan 3439 bp .

Plasmid ditransformasi pada sel *E. coli* M15, hasilnya diuji kembali dengan enzim restriksi *Sall* dan *PstI* diperoleh hasil yang tepat, yaitu *Sall* pada 777 bp dan *PstI* pada 3745 bp. Pengecekan hasil kloning gen Lactonase dengan plasmid pQE9 pada sel inang *E. coli* M15 pada gel agarose diperoleh hasil elektroforesis dengan orientasi enzim restriksi *Sall* dan *PstI* yang tepat (Gambar 5.6 dan Lampiran 1-6).

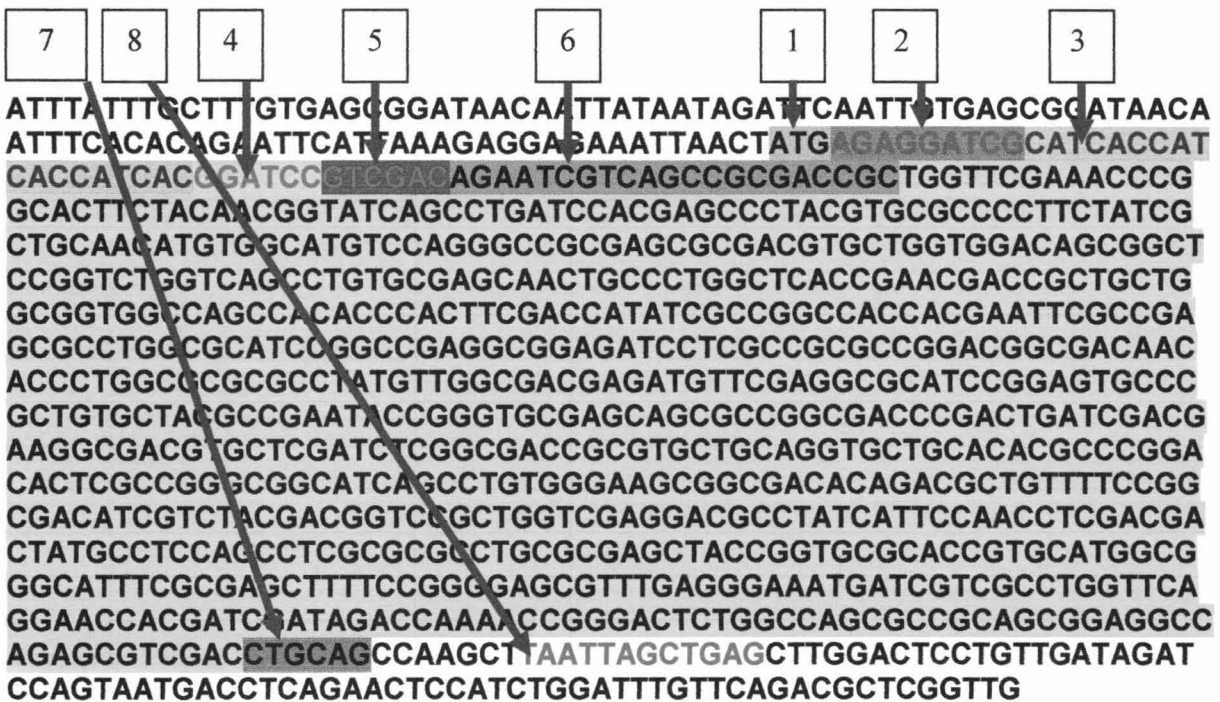


**Gambar 5.6.** Hasil elektroforesis kloning gen lactonase dengan enzim restriksi (a) *Sall* dan (b) *PstI*.

Keterangan : Tanda panah 1 menunjuk pada pita 3745 bp, merupakan pita hasil restriksi dengan enzim *PstI*, tanda panah 2 menunjukkan pita hasil restriksi dengan enzim *Sall* pada 777 bp. LANE 1 = marker 100-1,5 Kb , LANE 1-10 = sampel *Sall* (atas) , sampel *PstI* (bawah) , LANE 12 = marker 500 bp-10Kb,

Dari hasil sekuen plasmid dengan gen Lactonase/*haIS* yang diperoleh kemudian dilakukan sekuensing dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.7 berikut ini. Plasmid hasil kloning ini selanjutnya disebut sebagai plasmid *HaIS*.

Hasil plasmid yang diperoleh kemudian ditransformasikan kembali pada sel inang *E. coli* BL21 dan berhasil ditumbuhkan 15 koloni, yang nantinya akan dapat dipergunakan untuk produksi AHL-Lactonase.



**Gambar 5.7** . Sekuen sample no 1,

Keterangan : tanda panah menunjukkan 1 = *Start codon*, 2 = *RGS-His epitope*, 3 = *6Xhis*, 4 = Sisi restriksi , 5 = *Sall*, 6 = F primer, 7 = *PstI*, 8 = *Stop codon*

Sekuen sampel menunjukkan *6X his* tag, enzim restriksi yang digunakan (*Sall* di awal dan *PstI* di akhir sekuen), dan F primer. Phenogram dan hasil skuensing dapat dilihat pada Lampiran 1-6.

### 5.3 Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan Lactonase

Sel inang *E. coli* M15 sesuai orientasinya kemudian dikultur untuk purifikasi dan produksi protein rekombinan Lactonase. Purifikasi dilakukan dengan Ni-NTA dengan *Gravity protocol* (LG) menggunakan Imidazol; dilanjutkan dengan kejutan dingin menggunakan Nitrogen cair.

Ekspresi protein diukur dengan metode Bradford , menggunakan persamaan garis dari kurva standar yaitu  $Y = 0,66 X$ , dengan nilai  $R^2 = 0,9348$ , dimana protein rekombinan Lactonase memiliki kadar protein sebesar 32  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Lampiran 7)

Hasil *alignment* dapat dibaca bahwa gen Lactonase yang dikloning merupakan gene *haIS*, yaitu *putative AHL-lactonase*, dimana *Max score* 1341, *query coverage* 88%, *E value* 0.0, *max identity* 100% (Lampiran 8)

*Cluster alignment* dari gen Lactonase dari DNA bakteri *P. aeruginosa* PAO1 dengan gen *haIS* diperoleh kecocokan 100 %. Sehingga dapat dikatakan bahwa kloning telah sesuai dengan gen Lactonase yang dikehendaki.

Sekuensing protein yang mengandung Lactonase diperoleh dengan menggunakan program *blastx* dari [www.ncbi.nlm.nih.com](http://www.ncbi.nlm.nih.com) (Lampiran 10 ) adalah seperti yang terdapat pada Gambar 5.8 berikut ini

Query	43	RIVSRDRWFETRHFYNGISLIHEPYVRPFYRCNMWHVQGRERDVLVDSGSLVSLCEQLP	222
		RIVSRDRWFETRHFYNGISLIHEPYVRPFYRCNMWHVQGRERDVLVDSGSLVSLCEQLP	
Sbjct	2	RIVSRDRWFETRHFYNGISLIHEPYVRPFYRCNMWHVQGRERDVLVDSGSLVSLCEQLP	61
Query	223	WLTERPLLAVASHTHFDHIAGHHEFAERLAHPAEAEILAAPDGDNTLARAYVGDEMFEAH	402
		WLTERPLLAVASHTHFDHIAGHHEFAERLAHPAEAEILAAPDGDNTLARAYVGDEMFEAH	
Sbjct	62	WLTERPLLAVASHTHFDHIAGHHEFAERLAHPAEAEILAAPDGDNTLARAYVGDEMFEAH	121
Query	403	PECPLCYAEYRVRAAPATRLIDEGDVLDLGDRVLQVLHTPGHSPGGISLWEAATQTLFSG	582
		PECPLCYAEYRVRAAPATRLIDEGDVLDLGDRVLQVLHTPGHSPGGISLWEAATQTLFSG	
Sbjct	122	PECPLCYAEYRVRAAPATRLIDEGDVLDLGDRVLQVLHTPGHSPGGISLWEAATQTLFSG	181
Query	583	DIVYDGPLVEDAYHSNLDDYASSLARLRELPRVTVHGGHFASFSGERLREMIVAWFRNHD	762
		DIVYDGPLVEDAYHSNLDDYASSLARLRELPRVTVHGGHFASFSGERLREMIVAWFRNHD	
Sbjct	182	DIVYDGPLVEDAYHSNLDDYASSLARLRELPRVTVHGGHFASFSGERLREMIVAWFRNHD	241
Query	763	R 765	
		R	
Sbjct	242	R 242	

**Gambar 5.8.** Sekuensing protein *Lactonase* rekombinan ([www.ncbi.nlm.nih.com](http://www.ncbi.nlm.nih.com)).

Keterangan : huruf berwarna merah menunjukkan sisi aktif dari enzim ini

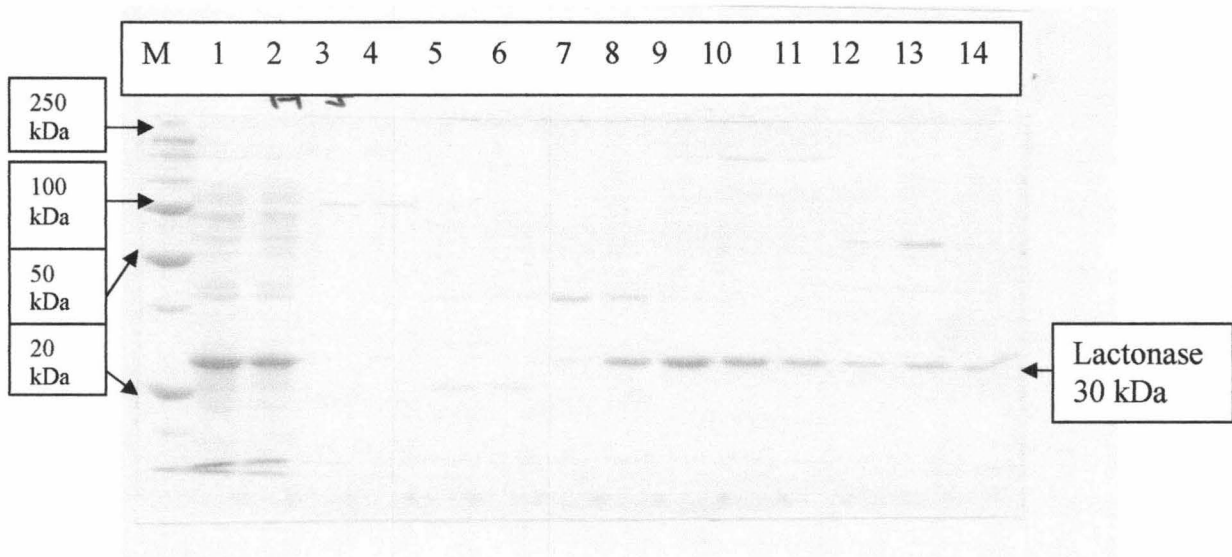
Hasil *blastx* menunjukkan bahwa protein ini menunjukkan kesamaan 100% dengan *hypothetical protein* pada asam amino ke 2 sampai dengan ke 242, atau disebut juga sebagai *putative lactonase*.

Protein ini terdiri dari 242 asam amino dengan fungsi aktifitas molekuler menghidrolisis AHL, dengan bahan aktif Beta Lactamase yang terletak pada daerah asam amino ke 28 sampai asam amino ke 220, termasuk dalam famili *Metallo-beta-lactamase* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Lampiran 9). Dari penelusuran sisi aktif residu melalui *web-site* [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), diketahui bahwa Beta Lactamase ini memiliki sisi aktif pada asam amino Cys (Cysteine) untuk aktifitas sulfurtransferase (Lampiran 10). Pada protein



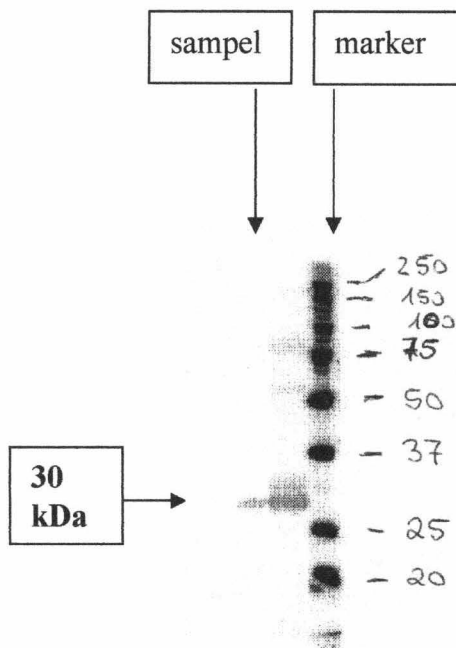
Lactonase rekombinan Cysteine (C) terletak pada urutan asam amino ke 124 dan 127 (Gambar 5.8)

Hasil *comasive blue* SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 5.10 di bawah ini. Sedangkan hasil Western blot untuk mengetahui berat molekul protein adalah seperti yang terdapat pada Gambar 5.9. Massa molekul protein yang diukur dengan Western Blot menunjukkan berat protein Lactonase sebesar 30 kDa .



**Gambar 5.9.** Protein Lactonase dengan SDS-PAGE  
Keterangan : M= marker 10-250 kDa, 1-14= sampel

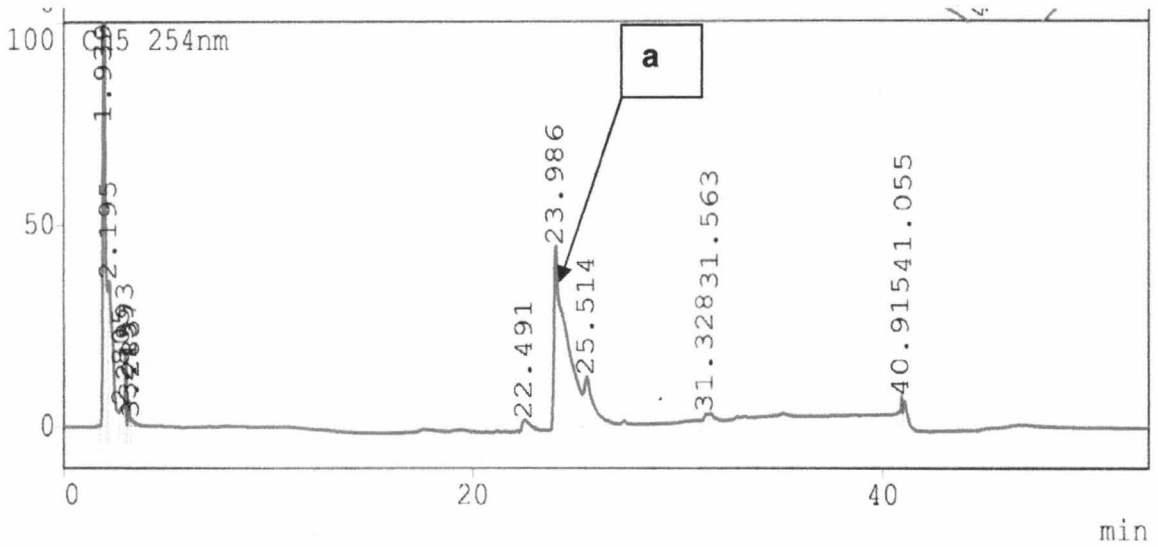
Dari hasil SDS-PAGE dilanjutkan dengan teknik Western blot terhadap protein AHL-Lactonase, dengan menggunakan *antibody mouse* IgG untuk Lactonase , serta anti body *Anti mouse antibody*  $\alpha$  Mouse, yang mengenali bahan bermassa molekul 30 kDa adalah Lactonase (Gambar 5.10).



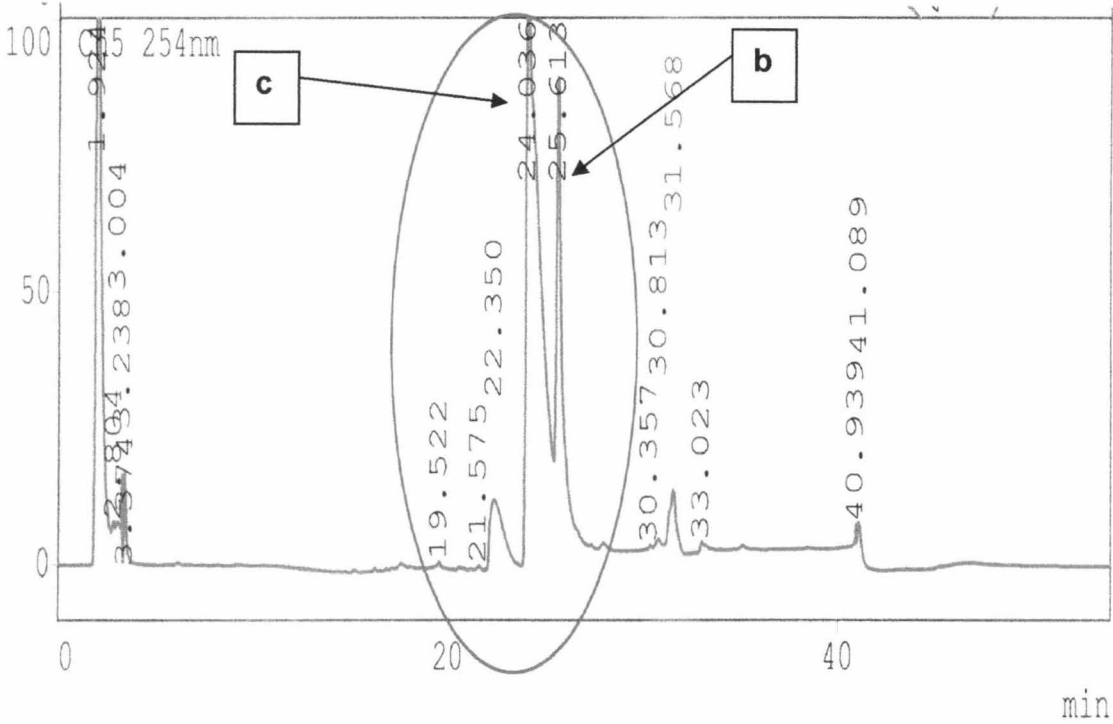
**Gambar 5.10** . Hasil Western Blot protein Lactonase rekombinan  
Keterangan: tanda panah menunjuk pada pita 30kDa

Hidrolisis protein rekombinan dilakukan dengan salah satu substrat AHL , yaitu N-hexanoyl-L-Homoserinelactone-d3 (3-oxo-C6-HSL). Hasil analisis HPLC dengan panjang gelombang 254 nm, dengan kolom ResQ, eluent A: Tris pH 8,0 dan eluent B: 1 M NaCl dapat dilihat pada Gambar 5.11. Hasil kromatogram substrat tanpa penambahan AHL-Lactonase menunjukkan puncak pada menit ke 23,986. Hasil kromatogram substrat yang ditambah dengan AHL-lactonase menunjukkan adanya dua puncak yaitu pada menit ke 24,036 dan pada menit ke 25,613. Puncak pada menit ke 24,036 adalah puncak dari AHL-Lactonase dan puncak pada 25,613 diduga adalah produk yang merupakan hasil reaksi dari substrat dan enzim AHL-Lactonase. Hal ini menunjukkan adanya aktivasi dari enzim Lactonase rekombinan. Namun produk yang dihasilkan belum diketahui nama dan strukturnya.

1. Substrat N-hexanoyl-L- Homoserine-lactone (3-oxo-C6- HSL) tanpa penambahan AHL-Lactonase



2. Produk hasil inkubasi AHL-Lactonase dan substrat N-hexanoyl-L-Homoserine-lactone (3- oxo-C6-HSL)



**Gambar 5.11** Hasil Analisis HPLC Lactonase dengan Substrat N-hexanoyl-L-Homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) padapanjang gelombang 254 nm  
 Keterangan: (a): substrat N-hexanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL), (b) AHL-Lactonase, (c) Produk yang dihasilkan.

# **BAB 6**

# **PEMBAHASAN**

## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1. Karakterisasi Bakteri dan Konstruksi Plasmid Gen Penyandi Lactonase

Penelitian ini menggunakan DNA bakteri *P. aeruginosa* PAO 1. Panjang untai DNA bakteri *P. aeruginosa* PAO1 yang digunakan adalah 6.264.404 bp ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), sedangkan panjang untai DNA AHL-Lactonase hasil PCR dari *P. aeruginosa* PAO1 adalah 783 bp, yang kemudian dilakukan sekuensing. Kegunaan dari sekuensing DNA adalah untuk mendeterminasi runutan basa yang ada pada molekul DNA (Alphey, 1997).

Konstruksi plasmid dengan gen penyandi Lactonase dilakukan pada teknik PCR, dimana teknik ini menghasilkan amplifikasi yang selektif dari suatu molekul DNA terpilih, sepanjang sekuen pada batas daerah yang terpilih diketahui. Dua oligonukleotida yang pendek harus menghibridisasi molekul DNA, satu untuk setiap pita untai ganda. Oligonukleotida ini beraksi sebagai primer untuk reaksi sintesa DNA, membatasi daerah yang akan diamplifikasi

Primer dibuat dengan program DNASTar Lasergene, yaitu F-Primer (CAK55506:AHL-Sal1\_1F27) : 5' gTC gAC AgA ATC gTC AgC CgC gAC CgC 3' dan R-Primer (CAK55506:AHL-Sal1\_763R21) : 5' gTC gAC gCT CTg gCC TCC gCC 3', masing-masing terdiri dari 27 mer. Panjangnya primer mempengaruhi laju hibridisasi terhadap cetakan DNA. Primer yang panjang menghibridisasi dengan kecepatan yang lebih lama. Efisiensi PCR, diukur oleh jumlah molekul yang teramplifikasi dan diproduksi selama eksperimen, karenanya primer yang terlalu panjang harus dikurangi, Hibridisasi yang lengkap terhadap molekul cetakan tidak dapat terjadi dalam waktu yang tersedia selama siklus reaksi. Dalam prakteknya, primer yang lebih panjang dari 30-mer jarang digunakan (Brown, 2006).

Temperatur *annealing* pada teknik PCR yang sesuai untuk penelitian ini adalah 65-68 °C setelah dilakukan beberapa kali pengujian. Temperatur *annealing* ini penting karena dapat mempengaruhi spesifitas reaksi, dimana pada temperatur tersebut primer menempel pada cetakan DNA. Hibridisasi DNA adalah suatu fenomena yang tergantung temperatur. Jika temperatur terlalu tinggi tidak akan terjadi hibridisasi, karena primer dan cetakan tidak dapat bergabung. Akan tetapi jika temperatur terlalu rendah, tidak semua pasangan basa yang benar terbentuk dan amplifikasi terjadi pada sisi non-target pada molekul cetakan. Temperatur *annealing* yang ideal harus cukup rendah untuk memungkinkan hibridisasi antara primer dan template, tetapi cukup tinggi untuk mencegah hibrida yang tidak sepadan terbentuk. Temperatur *annealing* untuk penelitian PCR ditentukan dengan menghitung titik leleh/*melting temperature* ( $T_m$ ) untuk setiap primer dan menggunakan 1-2 °C dibawahnya..

Pemilihan penggunaan enzim *Sall* dan *PstI* untuk konstruksi plasmid berdasarkan adanya sisi restriksi *Sall* dan *PstI* pada plasmid pQE9 (Anonymous, 2003). Selain itu juga berdasarkan titik leleh ( $T_m$ ) yang dimiliki oleh kedua enzim restriksi tersebut cukup tinggi sehingga enzim masih tetap bisa aktif pada kondisi temperatur tinggi pada saat amplifikasi PCR. Hal ini berbeda dengan Heckmann (2005) yang mengklon gen *halS* menggunakan beberapa enzim restriksi *Sall*, *HindIII*, *BamHI*, *XbaI*, *SacI*, *NdeI*, dan *MluI*; serta beberapa vektor plasmid lain.

Pada transformasi plasmid digunakan antibiotik Ampicillin, sebagai penanda resistensi. Hasil penelitian menunjukkan hasil yang positif dengan tumbuhnya beberapa koloni bakteri, yang menunjukkan resistensi hasil transformasi terhadap Ampicillin. Ampicillin akan mengganggu dengan membentuk lapisan *peptidoglycan* dan merusak sel pemisah yang membentuk dinding sel baru. Antibiotik beraksi cepat untuk mencegah terjadinya sintesa protein dan membunuh sel yang akan tumbuh, dan tidak secara aktif mengekspresikan protein yang resisten (Micklos and Freyer, 2003).

Dari hasil BLAST 16S rRNA ini terlihat bahwa DNA bakteri yang digunakan untuk diambil gen Lactonasenya identik dengan DNA bakteri *P. aeruginosa* strain ATCC 10145T. karena memang diperoleh dari DNA *P. aeruginosa* PAO1 komersial.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kalia *et al.* (2011), lokasi urutan lestari gen penyandi Lactonase dari setiap grup taksonomi beragam bakteri yang dapat dipergunakan untuk mengamplifikasi gen spesifik tersebut pada kelompok gamma proteobakteria seperti *P. aeruginosa* PAO1, adalah ATGTCGAG atau CCCAT. Sekuen CCCAT dapat dijumpai pada hasil sekuen 16S rRNA *P. aeruginosa* PAO1 (Gambar 5.5). Dengan demikian hasil sekuen 16S rRNA *P. aeruginosa* PAO1 menunjukkan bahwa sampel gen bakteri yang digunakan memang memiliki gen penyandi Lactonase.

## **6. 2. Kloning gen penyandi Lactonase (*hals*) pada vektor *E. coli* TOP10 , M15 dan BL 21**

Hasil konstruksi kloning Gen Lactonase pada plasmid pQE9 dalam *E. coli* M15 dengan menggunakan enzim restriksi *Sall* dan *PstI* tepat pada sisi restriksi 777 bp untuk *Sall* dan 3898. bp untuk *PstI* hal ini dibuktikan dengan hasil elektroforesis. Selanjutnya gen penyandi Lactonase (*hals*) dalam vektor plasmid pQE9 sebagai hasil kloning yang dilakukan disebut sebagai gen *HalS*.

Keuntungan utama penggunaan enzim restriksi (*Sall* dan *PstI*) adalah kemampuannya untuk memotong dasar untai DNA yang direproduksi pada tempat yang sama. Penggunaan enzim restriksi ini adalah dasar berbagai teknik yang digunakan untuk menganalisa gen dan ekspresinya. Banyak enzim restriksi membuat potongan teratur pada dua untai DNA, meninggalkan sisi yang menggantung, atau ujung yang melekat, yang dapat memasangkan basa bersama-sama dengan rapi. Hal ini akan mempermudah untuk merekatkan dua molekul DNA yang berbeda bersama-sama (Weaver, 2002). Enzim restriksi yang dipergunakan pada penelitian ini adalah *Sall* dan *PstI*, dimana *Sall* berada diantara fragmen 777 bp dan 3439 bp sedangkan *PstI*

berada diantara fragmen 417 bp dan 3898 bp. *Sall* diletakkan pada awal sedangkan *PstI* pada akhir untuk membentuk ujung yang melekat. Hal tersebut dapat dilihat pada hasil sekuen Gambar 5.7 , serta sesuai dengan hasil sekuen dalam Anonymous (2003) tentang penggunaan plasmid pQE9 dengan 6X His tag; dimana enzim restriksi *Sall* terdapat di awal sekuen diapit oleh 6X His tag dan F primer. Sedangkan enzim restriksi *PstI* terdapat diujung sekuen gen *Hals*.

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi efisiensi transformasi adalah sehatnya sel *E. coli*, bagaimana keadaan sel yang tersuspensi kembali pada  $\text{CaCl}_2$ , temperatur dan lamanya kejutan panas, jumlah plasmid DNA yang digunakan, teknik penyebaran, dan panjang periode pemulihan (Micklos and Freyer, 2003, Weaver, 2002).

Penggunaan vektor ekspresi *E. coli* TOP 10, M15 serta BL21 pada penelitian ini karena *E. coli* TOP10 adalah inang yang umum digunakan untuk penggunaan kloning dan plasmid yang tidak menggunakan BAD promoter, sedangkan *E. coli* M15 adalah inang ekspresi yang penggunaannya dikombinasikan kebanyakan dengan vektor pQE (Qiagen) dan *E. coli* BL 21 adalah inang ekspresi yang digunakan secara umum untuk plasmid yang tidak menggunakan T7 promoter ([http://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/cloning/transformation/](http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/transformation/))

### 6.3 Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan Lactonase.

Langkah pertama untuk mengekspresikan protein rekombinan dilakukan dengan *Bradford assay* (Bradford *et al.*, 1976). *Bradford assay* adalah suatu *protein assay* yang banyak digunakan karena mudah, murah, cepat dan sensitif. *Bradford assay* berdasarkan ikatan langsung pewarnaan dengan *Coomassie brilliant blue G-250* (CBBG) terhadap protein pada residu *arginine*, *tryptophan*, *tyrosine*, *histidine*, dan *phenylalanine*. Assay terutama merespon pada residu arginine (delapan kali lebih banyak dari residu lain), karenanya, jika sample banyak memiliki arginine (misalnya histone), mungkin penting untuk menggunakan suatu standar untuk arginine. Anionik



CBBG mengikat residu ini, memproduksi suatu serapan maksimum pada 595 nm, sedangkan residu bebas dalam larutan memiliki serapan maksimum pada 470 nm.

*Bradford assay* hanya akan mendeteksi protein dengan massa molekul lebih besar daripada 3-5 kDa (Rosenberg, 1996), dimana pada pemeriksaan dengan Western Blot diketahui massa molekul protein rekombinan ini adalah 30 kDa.

Protein yang telah dipurifikasi dan diekspresikan dengan *Sodium Deodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Polyacrylamide biasanya digunakan pada elektroforesis protein. SDS-PAGE digunakan untuk memisahkan polipeptida berdasarkan massanya. Hal ini biasanya dilakukan dengan memperlakukan enzim dengan suatu deterjen (*Sodium Deodecyl Sulfate* atau SDS) untuk melumerkan ikatan sehingga tidak saling mengikat. SDS memiliki dua keuntungan, yaitu : (1) Melapisi polipeptida dengan muatan negatif, sehingga terelektroforesis menuju anoda, (2) Menutupi muatan alami dari subunit, sehingga terelektroforesis berdasarkan massa molekulernya dan bukan oleh muatan negatifnya. Polipeptida kecil akan bergerak cepat, sedangkan yang lebih besar bergerak lebih lambat (Weaver, 2002).

Hasil SDS-PAGE menunjukkan adanya pita lain selain Lactonase, hal ini menunjukkan masih adanya protein lain pada hasil purifikasi. Untuk langkah lebih lanjut adalah perlunya optimalisasi kandungan Imidazole yang digunakan agar diperoleh hasil purifikasi Lactonase yang maksimal.

Langkah selanjutnya adalah *Western Blotting*, yaitu melakukan transfer protein secara elektronis dari sebuah gel ke sebuah membran (Rosenberg, 1996). Mengkombinasikan kemampuan resolusi pemisahan protein secara elektroforesis dengan spesifitas identifikasi immunological dalam format cepat dan sensitifitas tinggi.

Pengenalan spesifik dan afinitas penggabungan yang kuat antara antigen dan antibodi adalah dasar dari teknik ini. Target protein terletak pada suatu antibodi spesifik. Antibodi kedua, yang mengenali antibodi primer, digunakan untuk meletakkan posisi

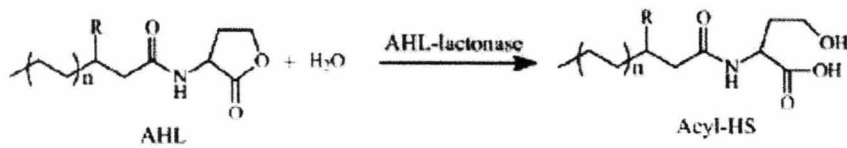
antigen-antibodi primer. Antibodi kedua yang *species specific* dapat di beri label dengan sejumlah cara untuk memproduksi gambaran nyata akhir (Rosenberg, 1996). Pada penelitian ini digunakan *antibody mouse* IgG untuk Lactonase sebagai antibodi spesifik, serta anti bodi *Anti mouse antibody  $\alpha$  Mouse* sebagai antibodi kedua yang mengenali antibodi primer.

Protein Lactonase rekombinan yang dihasilkan terdiri dari 242 asam amino dengan fungsi molekuler aktifitas hidrolisis AHL, dimana pada region 28-220 adalah Lactamase B, termasuk dalam famili Metallo-beta-lactamase ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Metallo-beta-laktamase adalah enzim *zinc-dependent* yang berguna untuk ketahanan terhadap antibiotik beta-laktamase dalam berbagai inang bakteri, biasanya spesies Gram-negatif yang bertindak sebagai patogen oportunistik. Enzim ini menghidrolisis semua antibiotik kelas beta-laktamase, termasuk carbapenems, dan melepaskan inhibitor beta-laktamase yang ada (Spencer *et al.*, 2005.).

Acyl homoserine-lactone (AHL) terdapat pada sinyal *quorum sensing* bakteri dan telah dideteksi pada lebih dari 50 species protobacteria (Eberhard *et al.*, 1981; Eberl, 1999; Fuqua *et al.*, 2001). Bakteri patogen dan simbiosis hewan serta tumbuhan membutuhkan *quorum sensing* untuk berkoloni dan menyerang inang eukaryotiknya (Eberl *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1999; Visick and Ruby, 1999; de Kievit and Iglewski, 2000; Loh *et al.*, 2002).

Pengrusakan QS dengan AHL-Lactonase dilakukan dengan cara merusak cincin *Lactone* yang ada menjadi suatu bentuk *Acyl-HS* (Barnard and Salmond, 2004; Dong *et al.*, 2007), seperti yang terdapat pada Gambar 6.1 di bawah ini.



Gambar 6.1.. Pemutusan ikatan Lactone oleh AHL-Lactonase dan AHL-Acylase (Wang *et al.*, 2004).

Penelitian ini menghasilkan protein *Lactonase* rekombinan dari hasil kloning gen penyandi *Lactonase* (*halS*) yang berasal dari *P. aeruginosa* PAO1 dengan massa molekul sebesar 30 kDa, sama dengan protein *Lactonase* yang dihasilkan oleh Park *et al.* (2003) dari gen *AhiD* yang berasal dari *Arthrobacter* sp. Akan tetapi massa molekul ini sedikit lebih besar dari protein rekombinan yang dihasilkan Heckmann (2006), yaitu 27,479 kDa. Sedangkan Wang *et al.*, (2004) dan Dong *et al.* (2000) menghasilkan massa protein *Lactonase* sebesar 28 kDa dan 28,036 kDa; keduanya menggunakan gen penyandi *Lactonase aiiA*, dari *Bacillus subtilis*. AHL-*Lactonase* yang dihasilkan massa molekulnya lebih kecil dari AHL-*Lactonase* (AiiAB546) dari *Bacillus* sp. B546 yang diproduksi secara ekstraseluler pada *P. pastoris* sebesar 33.6 kDa (Chen *et al.*, 2010). Rata-rata massa molekul yang diperoleh dari berbagai penelitian tergantung pada sifat fisik atau kimia dari molekul yang ada dan relatif pada besar kecilnya molekul (Cazes dalam [www.ampolymer.com](http://www.ampolymer.com)).

Hasil *blastx* hasil penelitian menunjukkan bahwa protein ini merupakan *putative lactonase*, yang berarti bahwa substansi ini merupakan protein tetapi masih belum banyak diketahui aktifitasnya sehingga masih memerlukan pengujian lebih lanjut.

Protein ini terdiri dari 242 asam amino dengan fungsi aktifitas molekuler menghidrolisis AHL, dengan bahan aktif Beta Lactamase, termasuk dalam famili *Metallo-beta-lactamase* dengan sisi aktif pada asam amino Cys (*Cysteine*). Pada AHL-*Lactonase* yang dihasilkan Cys terletak pada asam amino ke 124 dan 127. Menurut

Zhou *et al.*, (1994) dalam Arino and Alexander (2002), kelompok sulfhidril C124 membentuk enzim *thiophosphate intermediate* dengan substrat. Enzim dengan sisi katalistik cysteine memiliki peran penting dalam proses biologi seperti pengaturan siklus sel, apoptosis, dan transduksi sinyal (Nagahara, 2011). Dengan adanya sisi aktif C124 dalam AHL-Lactonase, diduga akan mengaktifkan proses hidrolisis ikatan lactone pada AHL oleh AHL-Lactonase.

*AHL-Lactonase* tampak sebagai suatu enzim yang penting. Enzim ini bekerja sangat baik terhadap sinyal AHL dan menghidrolisis empat AHL, yaitu: C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, dan 3-oxo-C12-HSL (Dong *et al.*, 2001)

Hidrolisis *AHL-Lactonase* terhadap substrat 3-oxo-C6-HSL-d pada penelitian ini menunjukkan adanya aktifitas. Dalam penelitian ini, dapat dilihat dari munculnya produk hasil interaksi protein Lactonase rekombinan dan substrat 3-oxo-C6-HSL pada menit ke 25,613, sedangkan senyawa yang dihasilkan tidak diketahui karena tidak adanya standard. Menurut Wang *et al.* (2004) dan Dong *et al.* (2007), hasil reaksi antara AHL-Lactonase dengan substrat AHL akan menghasilkan Acyl-Homoserine. Hal serupa terjadi pada penelitian yang menggunakan N-acylhomoserine Lactonase yang diproduksi dari gen *AhiD* dari bakteri *Arthrobacter* sp dimana hanya puncaknya terdeteksi dalam analisis HPLC. Hasil ini menunjukkan adanya aktifitas hidrolisa dari cincin lactone (Park *et al.*, 2003).

Penggunaan substrat 3-oxo-C6-HSL, disebabkan karena substrat tersebut merupakan AHL utama pada *V. Fishery*, yang berfungsi dalam bioluminansi. *V. fischeri* menggunakan 3-oxo-C6-HSL [*N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone]; sebagai molekul sinyal *quorum sensing*. Sinyal 3-oxo-C6-HSL dibuat oleh *LuxI* AHL synthase, menggunakan protein *S*-adenosylmethionine dan hexanoyl-acyl sebagai substrat untuk reaksi. Regulator respon *quorum sensing* adalah *LuxR*, suatu pengatur transkripsi

pengikat DNA, yang menjadi aktif setelah penggabungan fisik sinyal 3-oxo-C6 -HSL (Barnard and Salmond, 2004).

Dari hasil penelitian Wang *et al.* (2004) yang menggunakan substrat 3-oxo-C6-HSL menunjukkan aktifitas sebesar 91,8 % dengan AHL-Lactonase yang berasal dari *Bacillus subtilis*. Analisis kinetik dan spesifisitas substrat menunjukkan bahwa AHL-Lactonase tidak memiliki aktifitas atau sedikit residu terhadap *non-acyl lactone* dan ester *noncyclic*, tetapi menunjukkan aktifitas enzim yang kuat terhadap semua AHL yang diujikan pada penelitian tersebut, berbagai panjang dan asal substitusi posisi C3 rantai *acyl*. Data juga mengindikasikan bahwa kelompok amida dan keton pada posisi C1 pada rantai *acyl AHL* agaknya merupakan bentuk struktur yang penting dalam interaksi substrat enzim.

Penggunaan enzim Lactonase pada kegiatan budidaya perairan belum pernah dilakukan akan tetapi penggunaan enzim Lactonase, dari gen AiiA yang diisolasi dari *Bacillus sp.* Strain 240B1, ternyata berpengaruh terhadap aktifitas inaktivasi AHL dengan aktifitas yang kuat. Enzim yang dipurifikasi pada konsentrasi 50 mg/l, mengurangi konsentrasi salah satu substrat AHL, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (Dong *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004) .

#### 6.4 Kebaruan Penelitian

Kebaruan penelitian ini dapat ditinjau dari::

- Aspek gen Lactonase yang belum pernah diteliti sebelumnya untuk memproduksi protein *Lactonase* rekombinan

Protein Lactonase rekombinan dihasilkan melalui kloning dengan menggunakan hanya dua enzim restriksi *Sall* dan *PstI* belum pernah diteliti sebelumnya. Protein rekombinan yang dihasilkan adalah protein dengan 242 asam amino yang merupakan protein *Lactonase* rekombinan dengan massa molekul sebesar 30 kDa.

Protein rekombinan ini memiliki aktifitas yang menghasilkan produk menggunakan substrat 3-oxo-C6-HSL [*N*-(3-oxohexanoyl)- *L* -homoserine lactone].

# **BAB 7**

# **KESIMPULAN**

# **DAN SARAN**

## BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian tentang "Kloning dan ekspresi gen Lactonase dari *P. aeruginosa* PAO1, sebagai kandidat inhibitor *autoinducer quorum sensing*." ini dapat disimpulkan:

1. Karakter gen penyandi Lactonase mempunyai panjang untaian DNA AHL-Lactonase hasil PCR dari *P. aeruginosa* PAO1 sebesar 783 bp, adalah gen *haIS*.
2. Gen penyandi Lactonase dapat diisolasi dengan metode PCR dan di klon pada plasmid pQE 9, menghasilkan plasmid *pHaLS*.
3. Karakter gen Lactonase pada sel inang *E. coli* M15 dapat dibuktikan ketepatannya melalui pengujian dengan enzim restriksi *Sall* dan *PstI*
4. Protein Lactonase rekombinan dapat diekspresikan sebagai *putative Lactonase* dengan massa molekul protein 30 kDa.
5. Protein Lactonase rekombinan memiliki aktifitas dengan substrat N-hexanoyl-L-homoserine lactone (3 oxo-C6-HSL) menghasilkan produk, tetapi belum diketahui senyawanya.

### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian tentang produksi protein Lactonase rekombinan dengan spesies bakteri asal Indonesia.
2. Perlu dilakukan uji aktifitas protein Lactonase rekombinan lebih lanjut dengan berbagai macam substrat AHL-Lactonase yang sesuai.
3. Perlu dilakukan pengujian aktifitas protein Lactonase rekombinan secara langsung terhadap bakteri patogen yang menyerang budidaya perairan



# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, T. I. 2004. Antibacterial marine bacterium determine luminous vibriosis in shrimp larvae. *NAGA*, World Fish Center Quart 27:28-31.
- Adonizio, A., Kong, K., and Mathee, K.. 2008. Inhibition of Quorum Sensing –Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida Plant Extracts. *Antimicrob Agents and Chemo* 52:198-203.
- Aguirre-Guzman, G., Ruíz, H.M., and Ascencio, F. 2004. A review Of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in disease of cultivated shrimp. *Aquacult Res* 35:1395–1404.
- Alderman, D.J. and Hastings, T. S. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of Antibiotic resistance–potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33:139–155.
- Anonymous, 2003, *The QIAexpressionist™*. A handbook for of 6xHis-tagged proteins. 5<sup>th</sup> Ed. Qiagen, 127 p.
- Arachchige, D. R. H. 2010. Expression of virulence genes of vibrios belonging to the *Harveyi* clade in the brine shrimp *Artemia*. Disertation. Ghent University, Ghent, Belgium. 248 p.
- Arino, J., and Alexander, D. 2006. *Protein phosphatases*. Springer. 343 p.
- Austin, B. and Zhang, X.H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 119–124.
- Bai F, Han Y, Chen J, Zhang X-H. 2008. Disruption of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by the AiiA protein of *Bacillus thuringiensis*. *Aquacult* 274: 36-40.
- Barnard, A.M.L., and Salmond, G.P.C. 2005. Quorum Sensing : The Complexities of Chemical Communication between Bacteria. *Complexus* 05:2:87–101.
- Bassler, B.L. Wright, M., Showalter, R.E., and Silverman, M.R. 1993. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi* sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* 9: 773–786.
- Bassler, B.L. Wright, M., and Silverman, M. R. 1994. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* 13: 273-286.
- Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2: 582-587.
- Baticados, M.C.L., F.R. Crus Lucierda, M.C. de La Cruz, L.C. Duremdes, Fernandez R. Rgacutan, C.R. Lavilla-Pitogo, and G.D. Lio-Po. 1990. Diseases of penaeid -shrimp in the Philippines. *Aquaculture Extention Manual No. 16.. SEAFDEC.* 46 p.
- Bauer, W.D., Mathesius, U., and Teplitski, M. 2005. Eukaryotes Deal with Bacterial Quorum Sensing. *ASM News* 71:129-135.

- Baumann, P., Gauthier, M.J., and Baumann, L. 1984. Genus *Alteromonas* Baumann, Baumann, Mandel and Allen. 1972,. In N.R. Kreig and J.G Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, MD: p. 343-352.
- Bollag, D.M. and Edelstein, S.J.. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc. New York. 230 p.
- Borchardt, S.A., Allain, E. J., Michels, J. J., Stearns, G. W., Kelly, R. F., and McCoy, W.F. 2001. Reaction Of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl Environ Microbiol* 67:3174-3179.
- Brown, T. A. 2006. *Gene Cloning & DNA Analysis*. Blackwell Publishing. 386 p.
- Buchholtz, C., Nielsen, K.F., Milton, D.L., Larsen, J.L., and Gram, L . 2006. Profiling of acylated homoserine lactones of *Vibrio anguillarum* in vitro and in vivo: Influence of growth conditions and serotype. *Syst Appl Microbiol*. p:29433-45.
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol*. 8:1137-1144.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., and Hughson, F.M.. 2002. Structural identification of a bacterial quorumsensing signal containing boron. *Nature* 415:545-549.
- Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y, Bai, Y., and Yao, B.. 2010. High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microb Cell Fact* 9-39
- Crowford, J.T. 1998. Molecular approaches to the detection of *Mycobacteria*. In Gangadharma, P.R.J. and Jenkins, P.A. Eds. *Mycobacteria I Chemotherapy*. Chapman and Hall. London. p:131-144.
- David, V. A., Deutch, A. H., Sloma, A., Pawlyk, D., Aly, A., and Durham, D. R. 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene* 112:107-112.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. , and Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295-298.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., and Verstraete, W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquacult* 240:69-88.
- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T.K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P. .2006. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol* 72: 6419-6423

- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., and Bossier, P.. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *TRENDS in Biotech* 25:472-479.
- de Kievit, T. R. and Iglewski B. H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immunol* 68:4839–4849.
- de Kievit, T. R., Gillis, R. J., Marx, S., Brown, C. , and Iglewski, B. H. 2001. Quorum sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ Microbiol* 67:1865–1873.
- Diggles, B.K., Moss, G.A., Carson, J., and Anderson, C.D.. 2000. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda:Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* 43:127–137.
- Dong Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3526-3531.
- Dong Y. H., Wang, L. .H., Xu, J.L, Zhang, H.B., Zhang,, X.F., and Zhang, L.H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817.
- Dong Y. H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.-L., and Zhang, L..H., 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1754– 1759.
- Dong Y. H., Zhang, X.. F., Xu, J.L., and Zhang, L..H., 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol* 70: 954–960.
- Dong Y. H. and Zhang, L..H. 2005 Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* 43:101–109.
- Dong Y. H., Lian-Hui Wang and Lian-Hui Zhang. 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362:1201–1211.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Neilson, K. H., and Oppenheimer, N. J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20:2444-2449
- FAO, 2002. State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries Department, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy. 150 p.
- Fuqua, C. , Winans, S.C., and Greenberg, E.P. 1996. Localization of OccR-activated And TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the traR gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol. Microbiol.* 20:1199–1210.
- Gardiner, S. M., Chhabra, S. R., Harty, C., Williams, P., Pritchard, D. I., Bycroft, B. W. and Bennett, T. 2001. Haemodynamic effects of the bacterial quorum sensing signal molecule, *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, in conscious, normal and endotoxaemic rats. *Br J Pharmacol* 133:047-1054.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147-165.

- Gatesoupe, F.J., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., and Quazuguei, P. 1997. Early weaning of Seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158:117-127.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F. L., and Swings, J. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150:769–1777.
- González, J.E. dan Keshavan, N. D.. 2006. Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:859-875.
- Hansen, L. S. and Blackburn, T. H. 1991 Aerobic and anaerobic mineralization of organic material in marine sediment microcosms. *Marine Ecology Progress Series* 75: 283–291
- Heckmann, S. 2005. Thesis. Der Einfluss des Proteins HalS von *Pseudomonas aeruginosa* auf die interzelluläre Kommunikation (The influence of HalS from *Pseudomonas aeruginosa* on intercellular communication). Department of Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich Heine University, Duesseldorf, Germany.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. 2004a. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 186:3794–3805.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. 2004b. Three parallel quorum sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 186:6902–6914.
- Hill, J. and Williams, P.. 2002. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone *Microbiol* 148:909-922.
- Huang, J. J., Han, J.-I., Zhang, L.-H., and Leadbetter, J. R. 2003 Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol* 69: 5941–5949.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A., and Stunnenberg, H. G. 1991. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-8976.
- Juhas, M., Eberl, L., and Tümmler, B. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* 7:459–471
- Kalia, V. C., Sajjan C. Raju, and Purohit, H. J.. 2011. Genomic Analysis Reveals Versatile Organisms for Quorum Quenching Enzymes: Acyl-Homoserine Lactone-Acylase and –Lactonase. *The Open Microbiol Journal* 5:1-13 1
- Kennedy, S.B., Tucker, J.W. Jr., Neidig, C.L., Vermeer, G.K., Cooper, V.R., Jarrell, .L. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with Common Snook (*Centropomus undecimalis*). *B. Mar. Sci* 62:573-588.

- Kjelleberg, S., Steinberg, P., Givskov, M., Gram, L., Manefield, M., Nys, R. 1997. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquatic Microbial Ecol* 13: 85–93.
- Kjelleberg, S., Steinberg, P. D., Givskov, M., Gram, L., Manefield, M. and de Nys, R. 1999. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems?. *Aquat Microb Ecol* 13: 85-93.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E. N., Kuipers, O. P, and de Vos, W. M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two component signal transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24:895-904.
- Kothary, M. H., and A. S. Kreger. 1987. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.* 133:1783-1791.
- Laue, B. E., Y. Jiang, S. Ram Chhabra, S. Jacob, G. S. A. B. Stewart, A. Hardman, J. A. Downie, F. O’Gara, and P. Williams. 2000. The Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium small* bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146:2469–2480.
- Lavila-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of Luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* Larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91:1-13.
- Lavila-Pitogo, C.R., L.J. Albright, M.C. Paner, and N.A. Sunaz. 1992. Studies on the source of lumiscent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries. In I.M. Shariff, R.P. Subasinghe, and J.R. Arthur (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture I*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society.. Manila, Philippines. p:157-164.
- Lazazzera, B. A. and Grossman, A. D. 1998. The ins and outs of peptide signalling. *Trends Microbiol* 6:288-294.
- Lazdunski, A.M., Ventre, I., and Strurgis, J.H. 2004. Regulatory circuits and communications in Gram negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*2:581-592
- Leadbetter, J.R. and Greenberg, E. P. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J.Bacteriol*, 182:6921-6926.
- Lee, K.K. , Liu, P.C., and Chang, W.H. 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar. Biotechnol.* 4: 267–277.
- Lilley, .B.N. and Bassler, B.L. 2000. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Molecular Microbiology* 36: 940.
- Lin, Y.-H., Xu, J.-L., Hu, J., Wang, L.-H., Ong, S. L., and Leadbetter, J. R. m and Zhang, L.-H. 2003 Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47: 849– 860.
- Liu, C.H., Cheng, W., Hsu, J.P., and Chen, C.. 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Disease of Aquatic Organism* 61: 169–174.

- Liu, P.C. , Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H. , and Chen, S.N. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol* 33: 129–132.
- Liu, P.C. , Chuang W.H., and Lee, K.K. 2003. Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J. Appl. Ichthyol* 19:59–61.
- Liu, P.C. , Lin, Y.H., Chuang, W.H., and Lee, K.K. 2004. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V-carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World J. Microbiol. Biotechnol* 20:495–499.
- Lodish, H., Berk,A., Zipursky LS., Matsudaira P., Baltimore D., and Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4<sup>th</sup> Ed. WH Freeman and Co. New York. p:246-293.
- Lodish, H, Berk, A., Kaiser.C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., and Matsudaira, P. 2007. *Molecular Cell Biology*. 6<sup>th</sup> Ed. W.H. Freeman & Co. 961 p.
- Lory, S. 1998. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Curr Opin Microbiol*. 1:27-35.
- Lyczac, J. B., Cannon, C. L., and Pier, C. L.. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*. 2:1051-1060.
- Mangampa, M. dan Suwoyo, . H.S. 2009. Dinamika kualitas air tambak intensif udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) di desa Borimasunggu, Maros, Sulawesi Selatan. Makalah pada Seminar Nasional Kelautan V. Surabaya 23 April 2009. II-45.
- March, J.C. and Bentley, W.E. . 2004. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology* 15:495-502.
- Mariyono, A. Wahyudi, dan Sutomo. 2005. Teknik penanggulangan udang menyala melalui pengendalian populasi bakteri di laboratorium. *Buletin Teknik Pertanian* 7: 25-27
- Martin, G.G. , Rubin, N., and Swanson, E. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Dis. Aquat. Org.* 60:21–29.
- Martinelli, D., Grossmann, G., Sequin, U., Brandt, H., and Bachofen, R. 2004. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* . *BMC Microbiology* 4:25:71-80.
- Micklos, D.A. and Freyer, G.A. 2003. *DNA Science*. Cold Spring Harbour Lab. Press. New York. 575 p.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 165–199.
- Mok, K.C., Wingreen, N.S.,and Bassler, B.L. 2003. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *Embo J* 22: 870-881.

- Molina-Aja, A., Garcia-Gasca, A., Abreu-Grobois, A., Bolan-Mejia, C., Roque, A., Gomez-Gil, B. 2002. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiol. Lett.* 213: 7 – 12
- More´, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S. C. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272:1655–1658.
- Moriarty, D.J.W. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. *In*: R. Lésel (ed.), *Microbiology in Poecilotherms: Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier Science
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164:351– 358.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. *In* *Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. Publishers, B.V. pp. 217- 222.
- Muhammad, F. 2010. Rencana strategis Kementrian Kelautan dan Perikanan 2010-2014. 2010. Dept. KKP, Jakarta. 92 hal.
- Mullis , K. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp Quant Boil* 51:335-350.
- Munro, P.D., Barbour, A., and Birbeck, T.H. 1994. Comparison of the gut bacterial flora of start feeding larval turbot reared under different conditions. *J Appl Bacteriol*, 77:560-566.
- Nagahara, N., 2011. Catalytic site Cysteines of thiol enzyme: sulfurtransferases. *J Amin Acids*. Article ID 709404, 7 pages
- Neiditch, M.B., Federle M.J., Miller, S.T., Bassler B.L., and Hughson, F.M. 2005. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell* 18: 507-518.
- Nicolas, J.L. , Basuyaux, O., Mazurie, J., and Thubault, A. 2002 . *Vibrio charcharia*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50:35–43
- Nishimori, E. , Hasegawa, O., Numata, T., and Wakabayashi, H.. 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortality in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish pathol.* 33:495–502.
- Norqvist, A., Norrman, B., and Wolf-Watz, H. 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 58:3731-3736.
- Novick, R. P. 1999. Regulation of pathogenicity in *Staphylococcus aureus* by a peptide-based density-sensing system *In Cell–Cell Signaling in Bacteria* ,. Edited by G. M. Dunny & S. C. Winans. Washington, DC:American Society for Microbiology. pp. 129-146



- Novick, R.P., and Muir, W. M. 1999. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Cur Opin Microbiol.* 2:40-45.
- Nurdjana, M.L. 2007. Paper pada Seminar Aquaculture Indonesia 2007 "Menuju Industri Akuakultur Indonesia Berkelanjutan, Inovatif dan Kompetitif dalam Era Global" Surabaya, 5-7 Juni 2007.
- Olafsen, J.A. 2001. Interaction between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquacult* 200:223-247.
- Page, M.I. and Laws, A.P.. 1998. The mechanism of catalysis and the inhibition of  $\beta$ -lactamases. *Chem. Commun.*, 1609-1617
- Panjaitan, P.J. 1991. Serangan penyakit kunang-kunang pada larva kepiting bakau. Badan Penelitian dan Pengembangan Perikanan. Jakarta 86 hal.
- Park, S.Y., Lee, S.J., Oh, T.K., Oh, J.W., Koo, B.T., Yum, D.Y., and Lee, J.K. 2003. AhID, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter sp.* and predicted homologous in other bacteria. *Microbiol* 149:1541-1550.
- Pass, D.A., Dybdahl, R., and Manion, M.M. 1987. Investigations into the causes of mortality in the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquacult* 65:149-169.
- Prayitno, S.B. and Lactford, J.W. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to photobacterium and vibrio. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquacult* 132:105-112.
- Prieur, D., Mevel, G., Nicolus, J.L., Plusquellec, A. and Vigneulle, M. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the 99 marine environment. *Oceanography and Marine Biol Annl Rev* 28:277 - 352.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev* 57:50-108
- Rajamani, S. 2006. Small molecule Signaling and Detection Systems in Protists and Bacteria. Dissertation. The Ohio State University, Ohio. 203 p.
- Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaart, P., Krishnapillai, V., Zala, M., Heurlier, K., Triandafallu, K., Harms, H., Defago, H., and Haas, D. 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol* 148:923-932.
- Rice, S. A., McDougald, D., Givskov, M., and Kjelleberg, S. 2008. Detection and Inhibition of Bacterial Cell-Cell Communication. *Methods in Mol Biol* 431:55-68.
- Ringe, E and Strem, E. 1994. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquacult Fish Manage* 25:523-629.
- Ringe, E., Olsen, R.E., Overli, O., and Lovik, F. 1997. Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) *Aquac. Res.* 28:901-904.

- Roche, D.M., Byers, J.T., Smith, D.S., Glansdorp, F.G., Spring, D.R., and Welch, M. 2004. Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing. *Microbiol* 150:2023-2028.
- Rosenberg, I.M. 1996. *Protein Analysis and Purification*. Birkhäuser. Boston. 434 p.
- Schaber, J.,A., Hammond, A., Carty, N.L., Williams, S. C., Namood, J.A., Burrowes, B.H., Dhevan, V., Griswold, J.A. and Namood, A.. 2007. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J of Med Microbiol* 56:738–748.
- Schauder S. and Bassler, B.L. 2001. The languages of bacteria. *Genes Dev* 15: 1468-1480.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., and Bassler, B. L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 41: 463–476.
- Sio, S.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P., and Quax, W.J. 2006. Quorum Quenching by an N-Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect and Immun* 74:1673-1682.
- Smith, R. S. and Iglewski, B. H. 2003. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6:56-60
- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D. R., Specker, J.L., Manuel, M., and Gomez-Chiarri, M. 1999. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Org* 38:201–210.
- Soto-Rodriguez, S.A., Roque, A., Lizarraga-Partida, M.L., Guerra-Flores, A.L., and Gomez-Gil, B. 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Dis. Aquat. Org* 53: 231–240.
- Spencer, J., Read, J., Sessions, R.B., Howell, S., Blackburn, G.M., and Gamblin, S.J. 2005. Antibiotic recognition by binuclear metallo-beta-lactamases revealed by X-ray crystallography. *J.Am Chem.Soc* 127: 14439-14444.
- Stover, C. K. , Pham, Q.X., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.d., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, M.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.S., Wu, Z., Paulsenk, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., and Olson., M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* an opportunistic Pathogen. *Nature* 406:959-964.
- Subasinghe, R.P., Bondad-Reantaso, M.G., McGladdery, S.E., 2001. Aquaculture development, health and wealth. In: Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E., Arthur, J.R. (Eds.), *Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium*. NACA, Bangkok and FAO, Rome, Italy.

- Sunaryanto, A. and Mariam, A. 1986. Occurrence of pathogenic bacteria causing luminescent in penaeid larvae in Indonesia hatcheries. *Bull. Brackish Water Aqua. Dev. Cent.* 8:64-70.
- Surette, M. G. and Bassler, B. L. 1999. Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 31:585-595.
- Taga, M. E, and Bassler, B. L. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2:14549-14554.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S. A. B., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule, *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66:36-42.
- Teo, J.W.P., Suwanto, A., and Laa Poh, C. 2000. Novel  $\beta$ -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1309–1314.
- Teo, J.W.P., Tan, T.M.C., and Laa Poh, C. 2002. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1038–1045.
- Thompson, F.L. et al. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:403–431.
- Todar, K.L. 2008. Textbook of Bacteriology. Diakses dari <http://www.textbookonbacteriology.com>.
- Toyofuku, M., Nomura, N., Fujii T., Takaya, N., Maseda, H., Sawada, I., Nakajima, T., and Uchiyama, H.. 2007. Quorum Sensing Regulates Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J of Bacter* 189:4969–4972.
- Turovskiy, Y., Kashtanov, D., Paskhover, B., and Chikindas, M. L.. 2007. Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between. *Adv Appl Microbiol.* ; 62: 191–234.
- Uroz, S, D'Angelo-Picard, C, Carlier, A, Elasri, M, Sicot, C., Petit A., Oger, P., Faure, D., and Dessaux, Y. 2003. Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiol* 149:1981-1989.
- Vandenberg, N., Van Oorschot, R. A. H, Tyler-Smith C., and Mitchell, R. J. 1999. Y-Chromosome-Specific Microsatellite Variation in Australian Aboriginals. *Hum Biol*, 71: 915-931.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., and Kaiser, H. 2004. In vitro growth characteristics of the candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 231:145-152.
- Wagner, V. E., R. J. Gillis, and B. H. Iglewsky. 2004. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 22:S15-S20.
- Walker, J. M. and Rapley, R. 2008. 2<sup>nd</sup> Ed. Molecular biomethods handbook. Humana Press. 1124 p.

- Wang, X. H., Oon, H.L., Ho, G.W.P., Wong, W.F., Lim, T.M., and Leungl, K.Y. 1998. Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiol* 144:2987-3002.
- Wang, Y., and Leadbetter, R. 2005. Rapid Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signal Biodegradation in Diverse Soil. *App and Env. Microbiol.* 71:1291-1299.
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H., and Zhang, L.H. 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorumquenching N-acyl homoserine lactone lactonase (AHLlactonase). *J. Biol. Chem.* 14:13 645–13 651.
- Waters ,C..M.,and Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 319-346
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., and Zolier, M. 1992. Recombinant DNA. Scientific American Books. New York. 626 p.
- Weaver. R. F. 2002. Molecular Biology. Mc Graw Hill Co., Inc. New York. 858 p.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. 2001 Quorum-sensing in Gramnegative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:365–404.
- Williams, P., M., Camara, A H.,Swift,S., Milton, D., Hope, V.J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, I., and Bycroft, B.W. .2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355: 667–680.
- Winzer, K., Hardie, K.R., and Paul Williams. 2003. LuxS and Autoinducer-2: Their Contribution to Quorum Sensing and Metabolism in Bacteria. *Adv in App Microbiol* 53: 291-396.
- Woese, C., R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.
- Yates, E.,A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., and Williams, P.. 2002. N-Acyldhomoserine Lactones Undergo Lactonolysis in a pH-, Temperature-, and Acyl Chain Length-Dependent Manner during Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect and Immun* 70:5635-5646.
- Yuwono, T. 2005. Biologi Molekular. Erlangga. Jakarta. 269 hal.
- Zhang, X.H. and Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.* 23:93–102
- Zhang, L. H. 2003 Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.* 8:238–244.
- Zhang H. B., Wang L. H., and Zhang, L. H. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 4638-4643.
- Zhang, H. B., Wang, C. and Zhang, L. H. 2004 The quormone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* 52:1389–1401

Xavier, K. B. and Bassler, B. L. 2005. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 87:238–48.

Xavier, K. B. and Bassler, B. L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6: 191-197.

<http://bio.davidson.edu> diakses pada tanggal 10 Juli 2008

<http://en.wikipedia.org> diakses pada tanggal 10 Juli 2008

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> diakses pada tanggal 2 September 2008

<http://www.pseudomonas.com> diakses pada tanggal 2 Oktober 2010

[http://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/cloning/transformation/](http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/transformation/) diakses pada tanggal 1 Januari 2011.

<http://www.proteinmodelportal.com> diakses pada tanggal 30 Desember 2010

<http://www.ampolymer.com> diakses pada tanggal 2 Februari 2011

<http://www.elmhurst.edu> diakses pada tanggal 2 Februari 2011

<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/120> diakses pada tanggal 2 Februari 2011

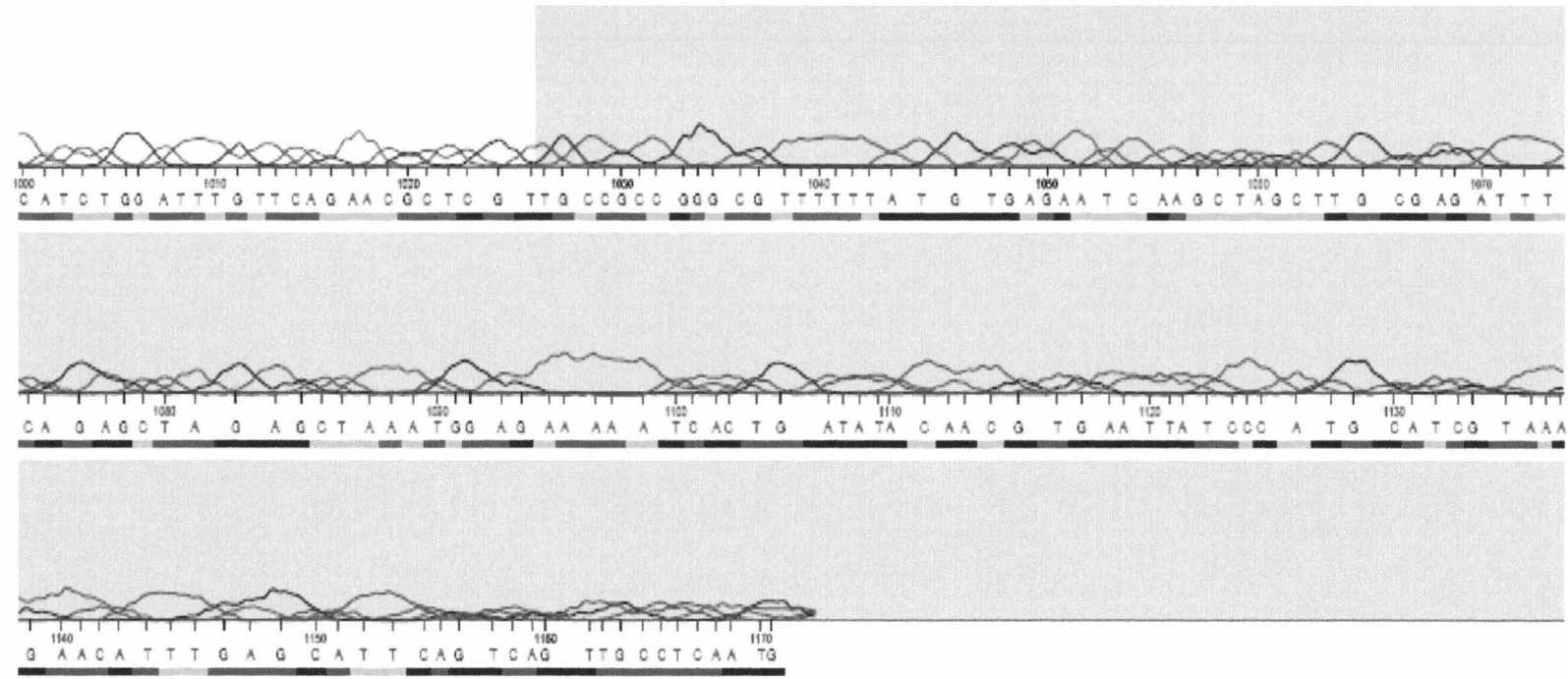
# LAMPIRAN

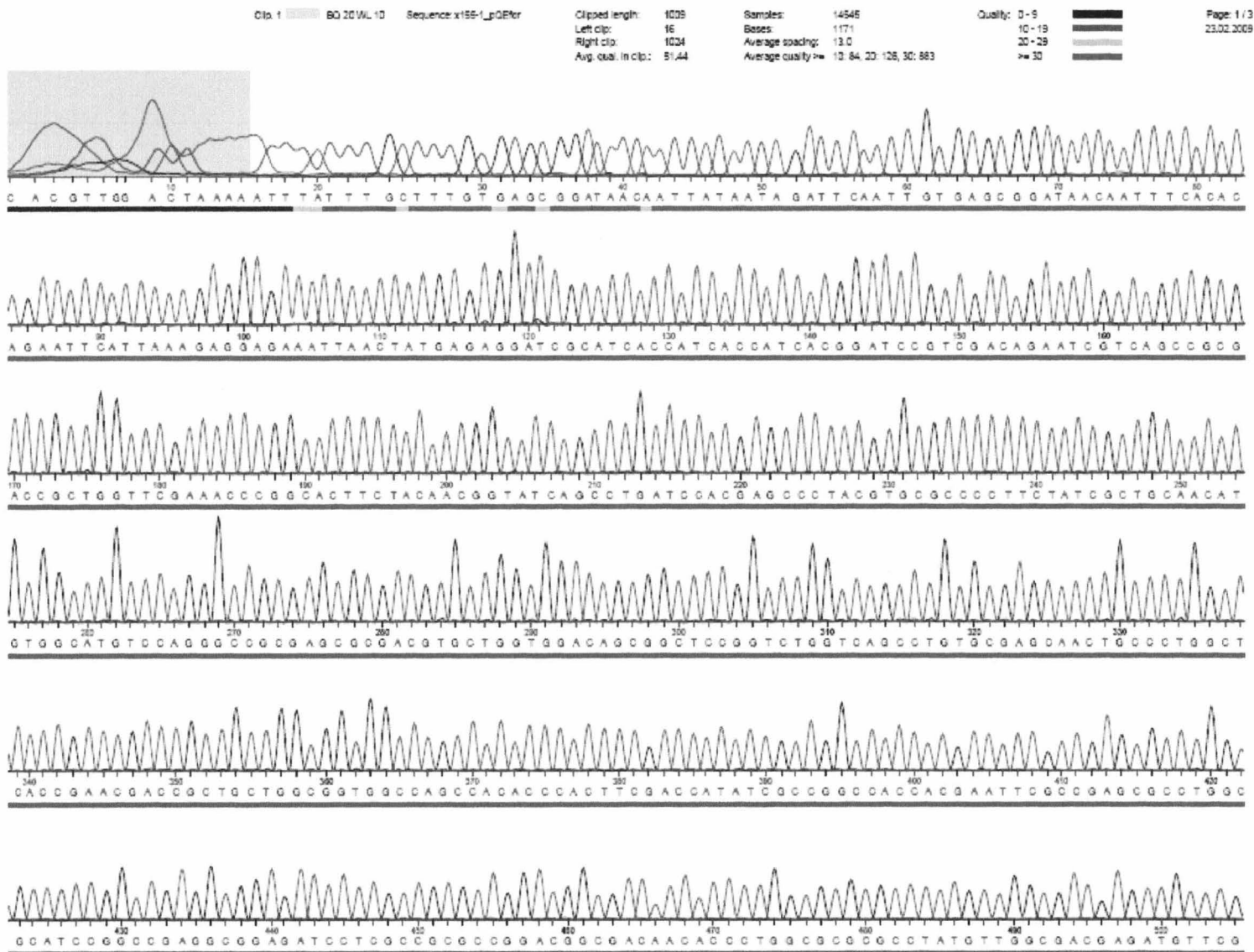











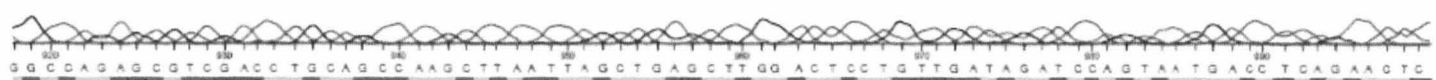
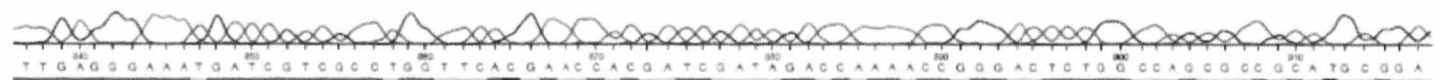
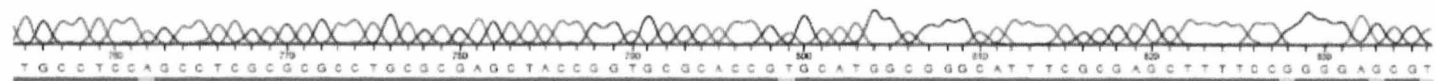
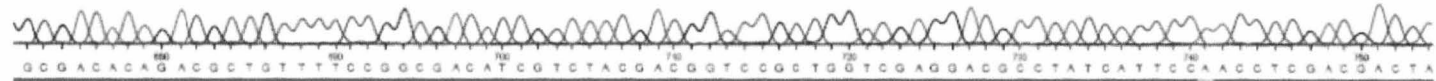
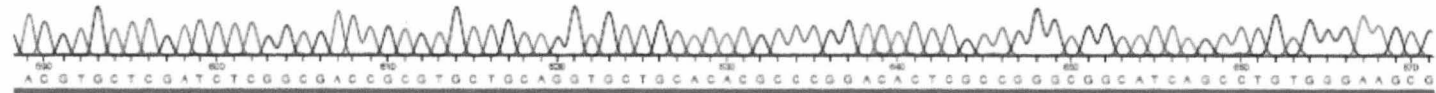
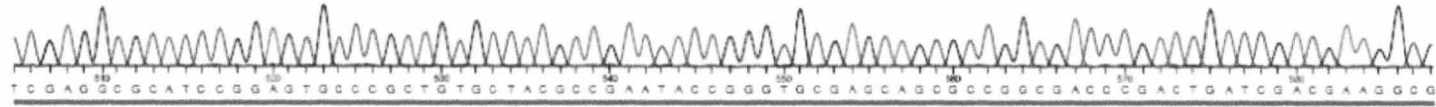
Clp. 1 BQ.20/WL.10 Sequence: x159-3\_pQEfor Clipped length: 1011 Samples: 14517 Quality: 0-9  
 Left clip: 15 Bases: 1172 10-19  
 Right clip: 1025 Average spacing: 13.0 20-29  
 Avg. qual. in clip: 51.59 Average quality >= 10: 62, 20: 132, 30: 862 >= 30



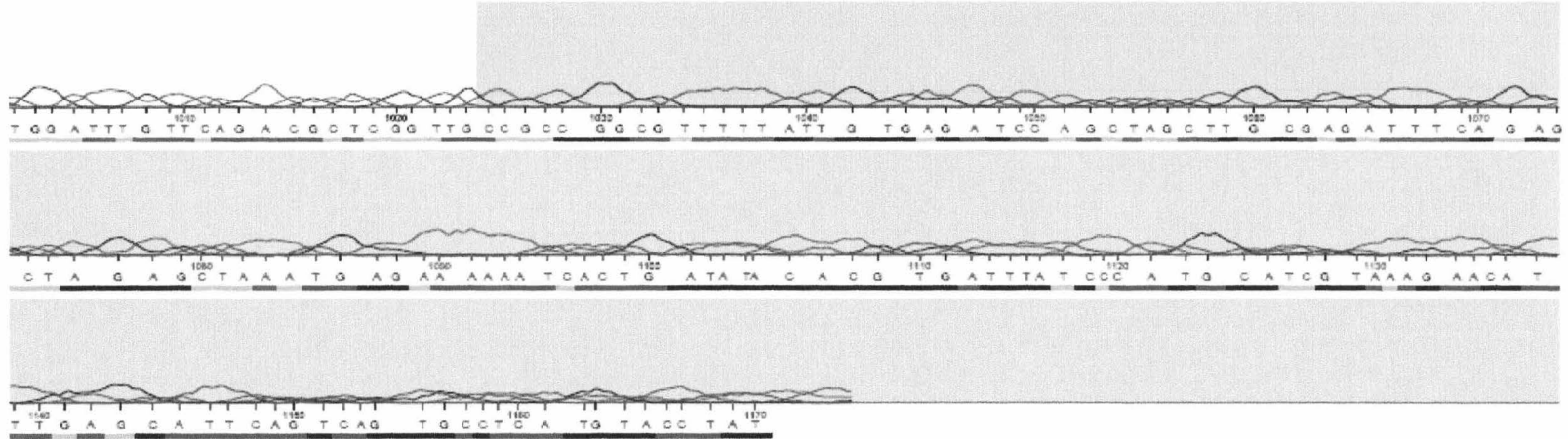


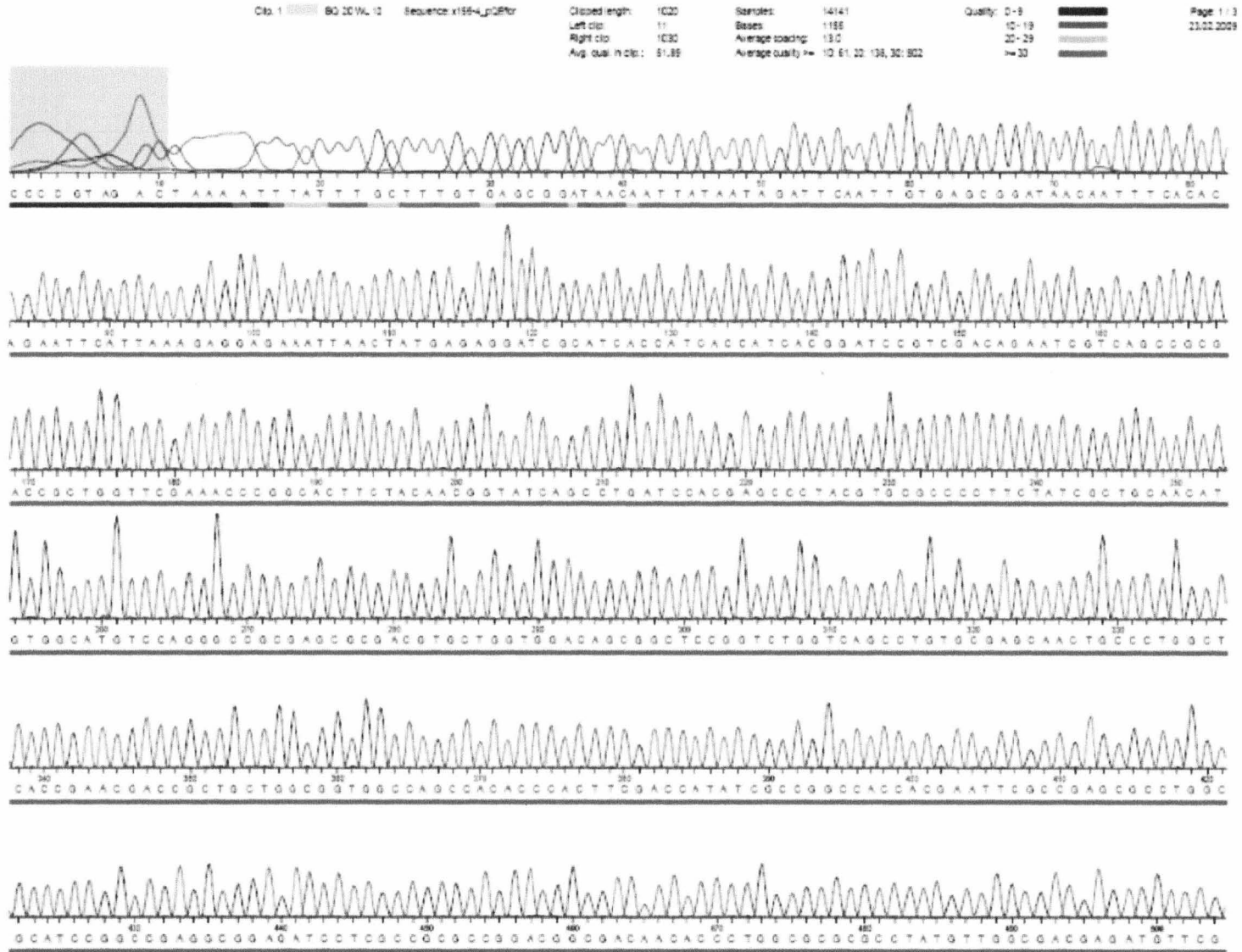
Lampiran 2. Phenogram Hasil Sekuenjing AHL-Lactonase Sampel 2.

Clip 1  BQ 20/AL 10 Sequence: x155-3\_p08ftr  
 Clipped length: 1011 Samples: 14517  
 Left clip: 15 Bases: 1172  
 Right clip: 1026 Average spacing: 13.0  
 Avg. qual. in clip: 51.55 Average quality >= 10: 82, 20: 132, 30: 882  
 Quality: 0-9   
 10-19   
 20-29   
 >= 30   
 Page 2 / 3  
 23.02.2009



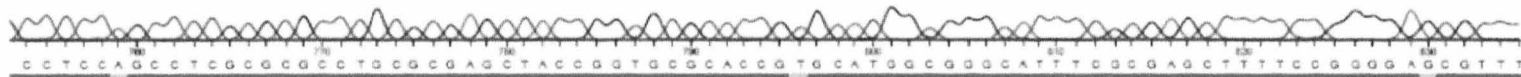
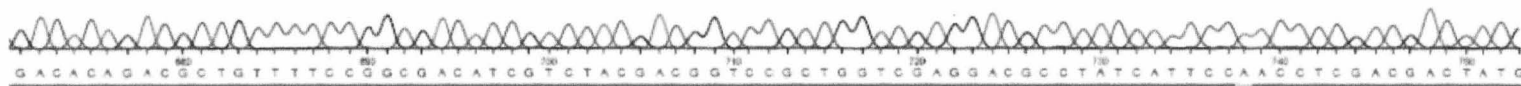
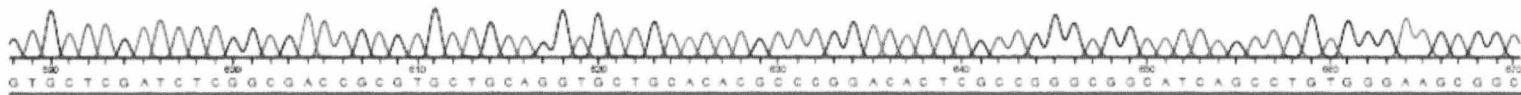
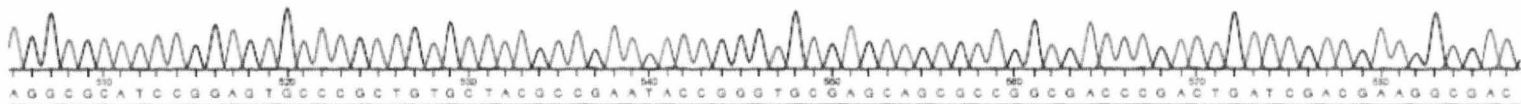
Clp\_1 [redacted] BQ 20 WL 10 Sequence: x155-1\_pGEfor Clipped length: 1039 Samples: 14545 Quality: 3-9 [redacted] Page: 3 / 3  
Left clip: 16 Bases: 1171 [redacted] 23.02.2009  
Right clip: 1024 Average coating: 13.0 [redacted] 10-19  
Avg. qual. in clip: 51.44 Average quality >= 10: 84, 30: 126, 30: 863 [redacted] 20-29  
[redacted] >= 30 [redacted]





Lampiran 3. Phenogram Hasil Sekuensing AHL-Lactonase Sampel 3.

Clip: 1 BQ 20 WL 10 Sequence: x155-4\_pQERr Clipped length: 1020 Samples: 14141 Quality: 0-9 Page 2 / 3  
 Left clip: 11 Bases: 1155 10-19 23.02.2009  
 Right clip: 1030 Average spacing: 13.0 20-29  
 Avg. out. in clip: 51.85 Average quality: 10 51 20 136 30 502 >= 30



Page 3 / 3  
23.02.2009

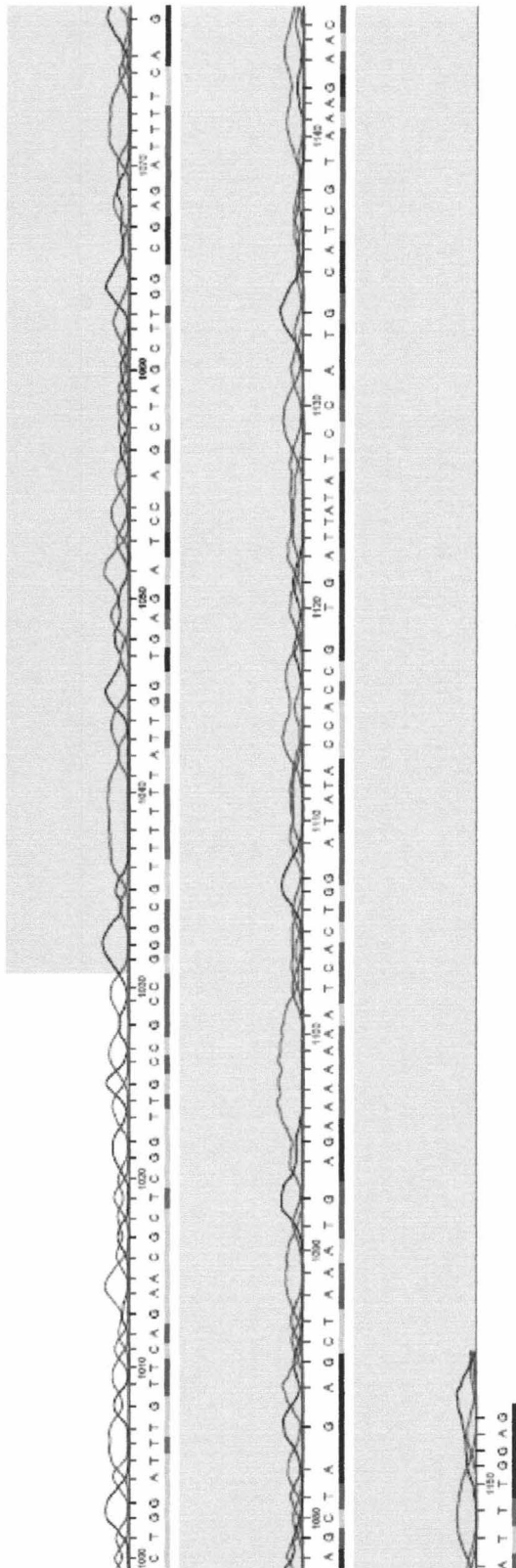


Quality: 0-9  
10-19  
20-29  
>=30

Samples: 14141  
Bases: 1155  
Average spacing: 13.0  
Average quality: 10.61, 20.158, 30.902

Clipped length: 1020  
Left clip: 11  
Right clip: 1020  
Avg. qual. in clip: 51.85

Clp. 1 BO 20Vh..10 Sequence: x155..\_p0E1cr



## Lampiran 4. Hasil sekuen plasmid dengan gen Lactonase sample 1

&gt;A-33690\_G9.ab1

```
ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCgtcgacAGAATCGTCAGCCGCGACCGCTGGTTCGAAACC
CGGCACTTCTACAACGGTATCAGCCTGATCCACGAGCCCTACGTGCGCCCCTTCTATCGCTGCAACATGTGGCA
TGTCCAGGGCCGCGAGCGCGACGTGCTGGTGGACAGCGGCTCCGGTCTGGTCAGCCTGTGCGAGCAACTGCC
CTGGCTCACCGAACGACCGCTGCTGGCGGTGGCCAGCCACACCCACTTCGACCATATCGCCGGCCACCACGAA
TTCGCCGAGCGCCTGGCGCATCCGGCCGAGGCGGAGATCCTCGCCGCGCCGGACGGCGACAACACCCTGGC
GCGCGCCTATGTTGGCGACGAGATGTTGAGGCGCATCCGGAGTGCCCGCTGTGCTACGCCGAATACCGGGT
GCGAGCAGCGCCGGCGACCCGACTGATCGACGAAGGCGACGTGCTCGATCTCGGCGACCGCGTGCTGCAGGT
GCTGCACACGCCCGGACACTCGCCGGGCGGCATCAGCCTGTGGGAAGCGGCGACACAGACGCTGTTTTCCGG
CGACATCGTCTACGACGGTCCGCTGGTCGAGGACGCCTATCATTCCAACCTCGACGACTATGCCTCCAGCCTCG
CGCGCCTGCGCGAGCTACCGGTGCGCACCGTGCATGGCGGGCATTTCGCGAGCTTTTCCGGGGAGCGTTTGA
GGAAATGATCGTCGCCTGGTTCAGGAACCACGATCGATAGACCAAACCGGGACTCTGGCCAGCGCCGCAGC
GGAGGCCAGAGCgtcgac
```

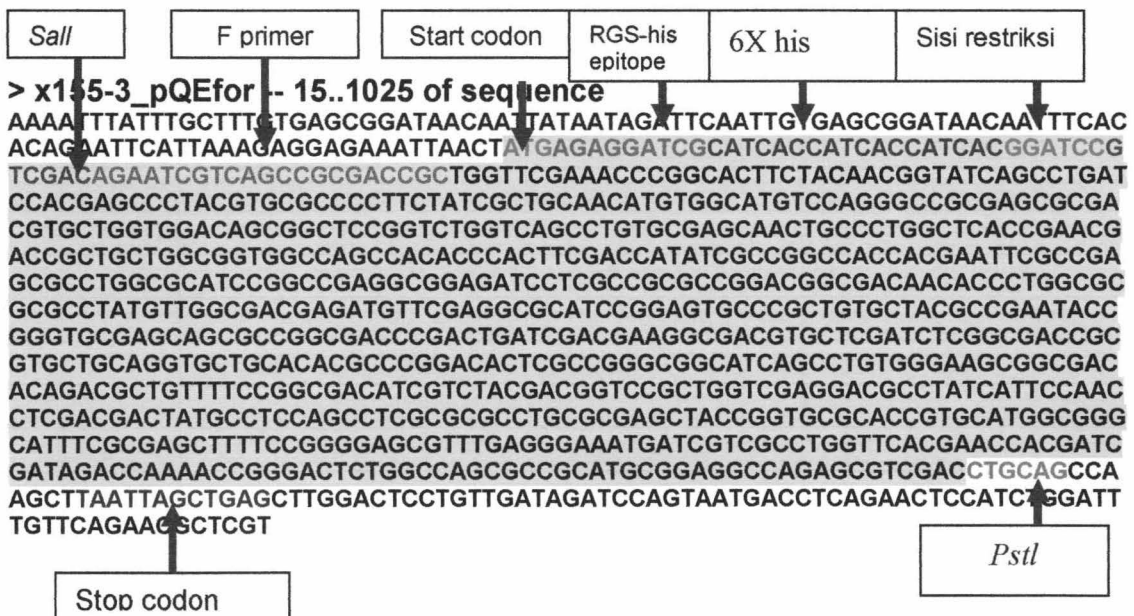


Lampiran 5. Hasil sekuen plasmid dengan gen Lactonase pada sampel No. 3

>A-33690\_H9.ab1

```

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCgtcgacAGAATCGTCAGCCGCGACCGCTGGTTCCG
AAACCCGGCACTTCTACAACGGTATCAGCCTGATCCACGAGCCCTACGTGCGCCCCTTCTATCGCTGC
AACATGTGGCATGTCCAGGGCCGCGAGCGCGACGTGCTGGTGGACAGCGGCTCCGGTCTGGTCAGC
CTGTGCGAGCAACTGCCCTGGCTCACCGAACGACCGCTGCTGGCGGTGGCCAGCCACACCCACTTCG
ACCATATCGCCGGCCACCACGAATTCGCCGAGCGCCTGGCGCATCCGGCCGAGGCGGAGATCCTCGG
CGCGCCGGACGGCGACAACACCTGGCGCGCGCCTATGTTGGCGACGAGATGTTTCGAGGCGCATCC
GGAGTGCCCGCTGTGCTACGCCGAATACCGGGTGCAGAGCAGCGCCGGCGACCCGACTGATCGACGA
AGGCGACGTGCTCGATCTCGGCGACCGCGTGTGTCAGGTGCTGCACACGCCCGGACACTCGCCGGG
CGGCATCAGCCTGTGGGAAGCGGGCGACACAGACGCTGTTTTCCGGCGACATCGTCTACGACGGTCCG
CTGGTGCAGGACGCCTATCATTCCAACCTCGACGACTATGCCTCCAGCCTCGCGCGCCTGCGCGAGCT
ACCGGTGCGCACCTGTCATGGCGGGCATTTCGCGAGCTTTTCCGGGGAGCGTTTGAGGGAAATGATC
GTCGCCTGTTTCAGGAACCACGATCGATAGACCAAACCGGGACTCTGGCCAGCGCCGCATGCGGAG
GCCAGAGCgtcgac
    
```

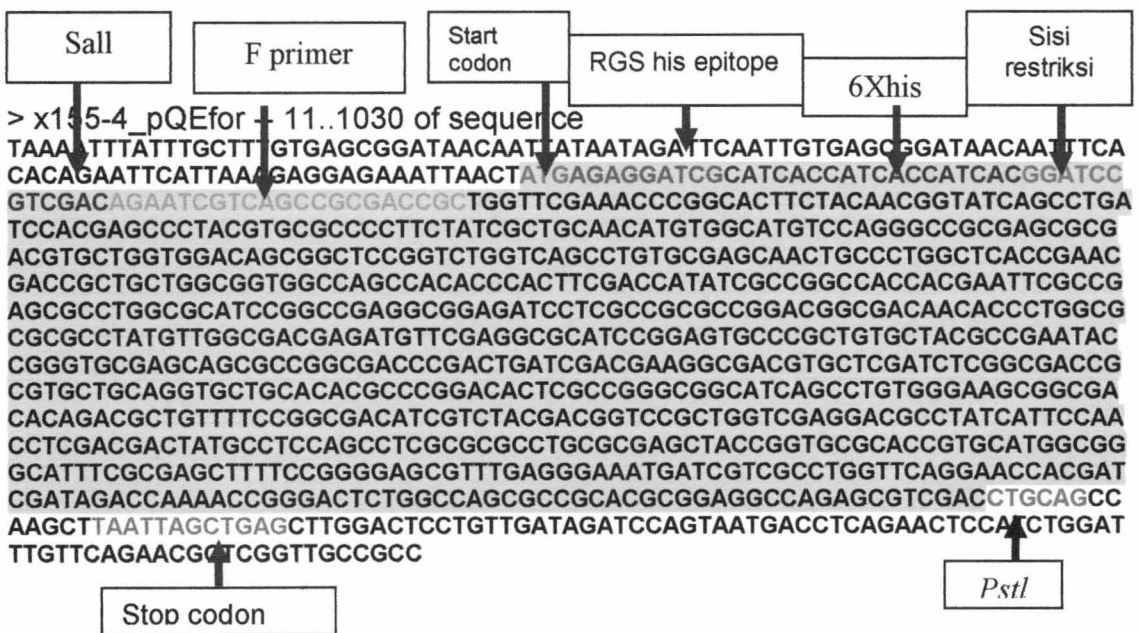


Lampiran 6. Hasil sekuen plasmid dengan gen Lactonase pada sampel No. 4

>A-33690\_A10.ab1

```

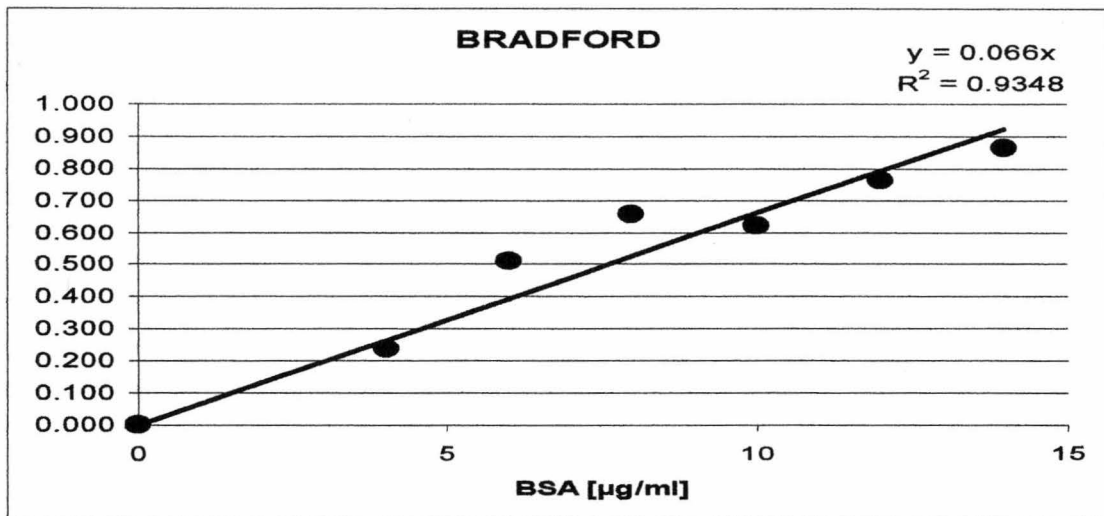
ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCgtcgacAGAATCGTCAGCCGCGACCGCTGGTTCCG
AAACCCGGCACTTCTACAACGGTATCAGCCTGATCCACGAGCCCTACGTGCGCCCCTTCTATCGCTGC
AACATGTGGCATGTCCAGGGCCGCGAGCGGACGTGCTGGTGGACAGCGGCTCCGGTCTGGTCAGC
CTGTGCGAGCAACTGCCCTGGCTCACCGAACGACCGCTGCTGGCGGTGGCCAGCCACACCCACTTCG
ACCATATCGCCGGCCACCACGAATTCGCCGAGCGCCTGGCGCATCCGGCCGAGGCGGAGATCCTCGC
CGCGCCGGACGGCGACAACACCCTGGCGCGCGCTATGTTGGCGACGAGATGTTGAGGCGCATCC
GGAGTGCCCGCTGTGCTACGCCGAATACCGGGTGCAGCAGCGCCGGCGACCCGACTGATCGACGA
AGGCGACGTGCTCGATCTCGGCCGACCGGTGCTGCAGGTGCTGCACACGCCCGGACACTCGCCGGG
CGGCATCAGCCTGTGGGAAGCGGCGACACAGACGCTGTTTTCCGGCGACATCGTCTACGACGGTCCG
CTGGTCGAGGACGCCTATCATTCCAACCTCGACGACTATGCCTCCAGCCTCGCGCGCCTGCGCGAGCT
ACCGGTGCGCACCGTGCATGGCGGGCATTTTCGCGAGCTTTTTCCGGGGAGCGTTTTGAGGGAAATGATC
GTCGCCTGGTTCAGGAACCACGATCGATAGACCAAACCGGGACTCTGGCCAGCGCCGACGCGGAG
GCCAGAGCgtcgac
    
```



Lampiran 7. Hasil Pengukuran Protein dengan Metode Bradford

BSA (Bovine Serum Albumin) [µg/ml]								[%]
0						<b>0.000</b>		
4	0.231	0.240	0.245	0.238	<b>0.239</b>	0.0058		2.43
6	0.507	0.503	0.521	0.509	<b>0.510</b>	0.0077		1.52
8	0.656	0.664	0.662	0.645	<b>0.657</b>	0.0085		1.30
10	0.621	0.614	0.621	0.621	<b>0.619</b>	0.0035		0.57
12	0.755	0.767	0.765		<b>0.762</b>	0.0064		0.84
14	0.865				<b>0.865</b>			

Samples	Protein [µg/2µl]	
158-1 (x151-1)	<b>0.296</b>	4.48
158-2 (x151-3)	<b>0.310</b>	4.70
158-3 (x151-4)	<b>0.320</b>	4.85
158-4 (x151:1,3,4 1:1:1)	<b>0.236</b>	3.58
x160	<b>0.087</b>	1.32



Lampiran 8. Hasil Pencarian Sekuen Protein dengan *blastx*.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident
<a href="#">NP_250106.1</a>	hypothetical protein PA1415 [Pseudomonas aeruginosa PA01]	<a href="#">506</a>	506	88%	8e-142	100%
<a href="#">ZP_01364766.1</a>	hypothetical protein PaerPA_01001880 [Pseudomonas aeruginosa PA01]	<a href="#">502</a>	502	88%	2e-140	99%
<a href="#">YP_791836.1</a>	hypothetical protein PA14_46150 [Pseudomonas aeruginosa UCBPP-P]	<a href="#">501</a>	501	88%	4e-140	99%
<a href="#">YP_002441581.1</a>	putative hydrolase [Pseudomonas aeruginosa LESB58]	<a href="#">496</a>	496	88%	1e-138	98%
<a href="#">YP_001349278.1</a>	hypothetical protein PSPA7_3924 [Pseudomonas aeruginosa PA7]	<a href="#">495</a>	495	88%	2e-138	97%
<a href="#">YP_001187289.1</a>	beta-lactamase domain-containing protein [Pseudomonas mendocina]	<a href="#">442</a>	442	87%	2e-122	86%
<a href="#">YP_347185.1</a>	Beta-lactamase-like [Pseudomonas fluorescens Pf0-1]	<a href="#">412</a>	412	87%	2e-113	78%
<a href="#">ZP_02140647.1</a>	beta-lactamase-like protein [Roseobacter litoralis Och 149]	<a href="#">306</a>	306	85%	2e-81	60%
<a href="#">ZP_01442821.1</a>	hypothetical protein 1100011001336_R2601_17554 [Pelagibaca bermi]	<a href="#">306</a>	306	86%	2e-81	59%
<a href="#">YP_003452760.1</a>	beta-lactamase [Azospirillum sp. B510]	<a href="#">301</a>	301	85%	5e-80	58%
<a href="#">ZP_05113964.1</a>	metallo-beta-lactamase superfamily, putative [Labrenzia alexandri DF]	<a href="#">301</a>	301	87%	7e-80	56%
<a href="#">ZP_05084339.1</a>	metallo-beta-lactamase domain protein, putative [Pseudovibrio sp. JE]	<a href="#">291</a>	291	87%	5e-77	55%
<a href="#">YP_574888.1</a>	beta-lactamase-like protein [Chromohalobacter salexigens DSM 3043]	<a href="#">289</a>	289	85%	3e-76	58%
<a href="#">ZP_05845237.1</a>	beta-lactamase domain protein [Rhodobacter sp. SW2]	<a href="#">281</a>	281	85%	7e-74	58%
<a href="#">WP_102074.1</a>	hypothetical protein ml0231 [Mesorhizobium loti MAFF303099]	<a href="#">270</a>	270	84%	1e-70	54%
<a href="#">ZP_05808940.1</a>	beta-lactamase domain protein [Mesorhizobium opportunistum WSM21]	<a href="#">269</a>	269	84%	2e-70	54%

Transferring data from blast.ncbi.nlm.nih.gov...

start Microsoft Excel - 201... Hasil Reng.docx - Mic... Firefox Local Area Connectio... 1:47 PM

## Nucleotide

Alphabet of Life

Display Settings: GenBank

### Pseudomonas aeruginosa PAO1, halS gene for putative AHL lactonase

GenBank: AM283463.1

FASTA Graphics

Go to:

```

LOCUS       AM283463                729 bp    DNA        linear    BCT 26-JUN-2006
DEFINITION  Pseudomonas aeruginosa PAO1, halS gene for putative AHL lactonase.
ACCESSION   AM283463
VERSION     AM283463.1  GI:109659788
KEYWORDS    AHL lactonase; halS gene.
SOURCE      Pseudomonas aeruginosa PAO1
  ORGANISM  Pseudomonas aeruginosa PAO1
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1
AUTHORS    Heckmann,S.
TITLE      Der Einfluss des Proteins HalS von Pseudomonas aeruginosa auf die
            interzellulaere Kommunikation (The influence of HalS from
            Pseudomonas aeruginosa on intercellular communication)
JOURNAL    Thesis (2005) Department of Mathematisch Naturwissenschaftliche
            Fakultae, Heinrich Heine University, Duesseldorf, Germany
REFERENCE   2
AUTHORS    Heckmann,S.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (23-JUN-2006) Heckmann S., Institute for Molecular
            EnzymeTechnology, Heinrich-Heine University Duesseldorf,
            Stettericher Forst, 52426 Juelich, GERMANY
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..729
                     /organism="Pseudomonas aeruginosa PAO1"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:208954"
     gene             1..729
                     /gene="halS"
     CDS              1..729
                     /gene="halS"
                     /function="hydrolysis of AHLs"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="putative AHL lactonase"
                     /protein_id="CAK55506.1"
                     /db_xref="GI:109659789"
                     /db_xref="GOA:Q17UC3"
                     /db_xref="InterPro:IPR001279"
                     /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q17UC3"
                     /translation="MRIVSRDRWFETRHFYNGISLIHEPYVRFFYRCNMWHVQGRERD
            VLVDSGSLVSLCEQLPWLTERPLLAVASHTHFDHIAGHHEFAERLAHPAEAEILAAP
            DGDNTLARAYVGDPEAHPECPCLCYAEYRVRAAPATRLIDEGDVLGDRVLQVLHT
            PGHSPGGISLWEAATQTLFSGDIVYDGPLVEDAYHSNLDYASSLARLRELPRVTVHG
            GHFASFSGERLREMIVAWFRNHDR"
ORIGIN
1 atgagaatcg tcagccgcga ccgctgggtc gaaacccggc acttctacaa cggtatcagc
61 ctgatccacg agccctactg gcgccccttc tctcgtctga acatgtggca tgtccaggcg
121 cgcgagccgc acgtgctggt ggacagcggc tccggtctgg tcagcctgtg cgagcaactg
181 ccctggctca ccgaacgacc gctgctggcg gtggccagcc acaccactt  cgaccatata
241 gccggccacc acgaattcgc cgagcgcctg gcgcatecgg ccgaggcgga gatcctcgcc
301 gcgcccggag cgcacaacac cctggcgcgc gcctatgttg cgcagcagat gttcgaggcg
361 catccggagt gcccgcctgt ctacccgcaa taccgggtgc gagcagcgc gccgaccgga
421 ctgatcgacg aaggcgcagt gctcgatctc ggcgaccggc tgctgcaggt gctgcacacg

```

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/109659788>

15/03/2011

Pseudomonas aeruginosa PAO1, *halS* gene for putativ... - Nucleotide result

Page 2 of 2

```
481 cccggacact cgcggggcgg catcagcctg tgggaagcgg cgacacagac gctgttttcc
541 ggcgacateg tatacgacgg tccgctggtc gaggacgect atcattccaa cctcgcgcac
601 tatgcctcca gctcgcgcgg cctgcgcgag ctaccggtgc gcaccgtgca tggcgggcat
661 ttccgcgagct tttccgggga gcgtttgagg gaaatgatcg tcgcctggtt caggaaccac
721 gatcgatag
```

//

## Lampiran 9. Hasil Pencarian Residu dari Sekuen Protein

putative AHL lactonase [Pseudomonas aeruginosa PAO... - Protein result

Page 1 of 1

**Protein**

Translations of Life

Display Settings: GenPept

**putative AHL lactonase [Pseudomonas aeruginosa PAO1]**

GenBank: CAK55506.1

FASTA Graphics

**Go to:**

```

LOCUS       CAK55506                242 aa                linear    BCT 26-JUN-2006
DEFINITION putative AHL lactonase [Pseudomonas aeruginosa PAO1].
ACCESSION   CAK55506
VERSION     CAK55506.1  GI:109659789
DBSOURCE    embi accession AM283463.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas aeruginosa PAO1
  ORGANISM  Pseudomonas aeruginosa PAO1
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1
AUTHORS    Heckmann,S.
TITLE      Der Einfluss des Proteins Hals von Pseudomonas aeruginosa auf die
            interzellulaere Kommunikation (The influence of Hals from
            Pseudomonas aeruginosa on intercellular communication)
JOURNAL    Thesis (2005) Department of Mathematisch Naturwissenschaftliche
            Fakultaeet, Heinrich Heine University, Duesseldorf, Germany
REFERENCE   2 (residues 1 to 242)
AUTHORS    Heckmann,S.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (23-JUN-2006) Heckmann S., Institute for Molecular
            EnzymeTechnology, Heinrich-Heine Univerity Duesseldorf,
            Stettericher Forst, 52426 Juelich, GERMANY
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..242
                     /organism="Pseudomonas aeruginosa PAO1"
                     /db_xref="taxon:208964"
     Protein         1..242
                     /product="putative AHL lactonase"
                     /function="hydrolysis of AHLs"
     Region          28..220
                     /region_name="Lactamase_B"
                     /note="Metallo-beta-lactamase superfamily; c100446"
                     /db_xref="CDD:186000"
     CDS             1..242
                     /gene="hals"
                     /coded_by="AM283463.1:1..729"
                     /transl_table=11
                     /db_xref="GOA:Q17UC3"
                     /db_xref="InterPro:IPR001279"
                     /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q17UC3"
ORIGIN
  1  mrivsrdrwf  etrhfyngis  lihepyvrpf  yrcnmwhvqg  rerdvldvsg  sglvslceql
  61  pwlterplla  vashthfdhi  aghhefaerl  ahpaeaeila  apdgdntlar  ayvgdemfea
 121  hpecplcyae  yrvraapatr  lidegdvldl  gdrvlqvlht  pghspggisl  weaatqtlfs
 181  gdivydgplv  edayhsnlld  yasslarlre  lpvrtvhggh  fafsfgerlr  emivawfrnh
 241  dr
//

```

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAK55506>

15/03/2011






15/03/2011

NCBI CDD cd00158

```

16E2 A      78  agfadyvqslgisndTRVVVYDQddl---gsEYAPRVWRIFrvg---hrtVSVLNgGFRWL 134
gi 15237291 286  iaalkisylkkinkgSNIIILDSy-----tdSAKIVAKTLkvlg---yknCYIVtdGFSGGR 341
gi 41352315 278  iaalkisylkrigkgSNVIIMDSy-----cDSSKIVAKTLnsvg---fknCNVMagGFGRK 341
gi 42523236 114  -aavkviqekgmtadSIIVVCSg-----gAGAEIDIAQQIfwtg---fprVNLNysgGYSGLF 148
gi 1463107   74  -----dklgdfeSPIIVYGSg-----fNKSYEAKKVLkm-----gfkNVEVagTLKIMP 118
gi 40863411 88  ---lntlnqnnqpcDHIYLMCQe-----gKRAEMAVEKLDat---ncqFVIIegGMNAVK 107
gi 11351924 180  -----apdprTRVIVNCAg-----rTRSTIGTQSLInag--ipnpVAALrnGTIGWF 224
gi 24372074 91  -----lpknkdAVMVFCAnr----lcTASNMARETmklg---ytgVRIMadGIFQNR 137
    
```

Cited CDD

 Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.* 39(D)225-9.

[| Disclaimer](#) | [Privacy statement](#) | [Accessibility](#) |

## Publikasi Sesuai Materi Penelitian Disertasi

No.	Judul Makalah	Nama Jurnal/Seminar	Tempat dan Waktu	Skala
1.	OPTIMALISASI TRANSFORMASI PLASMID DNA DENGAN GEN LACTONASE DARI <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAO1 UNTUK PRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN BAHAN ANTI-INFEKTIF VIBRIOSIS	Seminar Nasional Kelautan V	Surabaya, 23 April 2009	Nasional
2.	EKSPRESI MASSA MOLEKUL PROTEIN REKOMBINAN LACTONASE DENGAN METODE WESTERN BLOT	Jurnal Penelitian Perikanan	Juni 2010	Nasional
3.	MEKANISME LACTONASE SEBAGAI INHIBITOR AUTOINDUCER QUORUM SENSING <i>VIBRIO HARVEYI</i> , SEBUAH STRATEGI ANTI-INFEKTIF UNTUK MENEKAN PERKEMBANGAN VIBRIOSIS	Seminar Nasional Hasil Penelitian Hibah Doktor 2009	Jakarta, 22-23 September 2010	Nasional
4.	PURIFICATION OF LACTONASE, A RECOMBINANT PROTEIN PRODUCED IN <i>E. COLI</i> M15, AN OPPORTUNITY FOR A VIBRIOSIS INHIBITOR IN AQUACULTURE	International Conference of Aquaculture Indonesia (ICAI 2010)	Surabaya, 26-27 Oktober 2010	Internasional
5.	EXPRESSION OF LACTONASE, A RECOMBINANT PROTEIN PRODUCED IN <i>E. Coli</i> M15, AN OPPORTUNITY FOR A NEW ANTI-INFECTIVE AGENT IN AQUACULTURE	Asian Pacific Aquaculture 2011	Kochi, India, 17-20 Januari 2011	Internasional
6.	CLONING OF LACTONASE ENCODING GENE FROM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAO1 AND ITS RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION	Journal of Bioscience and Biotechnology	Submitted, 9 Maret 2011	Internasional