

**PENYISIPAN GEN *CBHA* DARI *Aspergillus niger* PADA VEKTOR EKSPRESI YEAST SEBAGAI TAHAPAN PEMBENTUKAN STRAIN PENGHASIL ETANOL SELULOSA**

Oleh:

**Suci Aulia Ratu Fajrin**

**(15/377265/BI/09432)**

**INTISARI**

Produksi etanol selulosa sebagai energi alternatif membutuhkan enzim selulase untuk proses degradasi selulosa. Aktivitas enzim selulase terdapat pada beberapa mikrobial, salah satunya *Aspergillus niger*. Degradasi selulosa oleh mikrobial membutuhkan tiga jenis enzim yang bekerja secara sinergis, yaitu endoglukanase, eksoglukanase (*Cellobiohydrolase/CBH*), dan  $\beta$ -glukosidase. Produksi etanol selulosa dapat dilakukan dengan memanfaatkan teknik DNA rekombinan, yaitu dengan membentuk suatu strain yang memiliki aktivitas selulolitik yang mampu mendegradasi selulosa menjadi glukosa dan sekaligus memproduksi etanol. Salah satu aplikasi teknik DNA rekombinan adalah penyisipan gen (kloning gen). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi gen *CBHA* dari *Aspergillus niger* dan mengetahui hasil penyisipan gen *CBHA* pada vektor ekspresi yeast (pWYH257). RNA total diisolasi dari *Aspergillus niger* dan dijadikan *template* untuk memperoleh cDNA dengan teknik RT-PCR. Amplifikasi gen *CBHA* dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik. Hasil amplifikasi gen divisualisasi menggunakan elektroforesis. Gen *CBHA* dijadikan sebagai *insert* dan disisipkan pada vektor ekspresi yeast, yaitu pWYH257. Pemotongan fragmen DNA vektor dan *insert* menggunakan enzim restriksi *Pst*I dan *Spe*I. Proses ligasi dilakukan dengan bantuan T4 DNA ligase. Produk ligasi ditransformasi pada sel kompeten *Escherichia coli* DH10B dengan metode elektroporasi. Plasmid rekombinan sebagai hasil penyisipan gen dipurifikasi dan divisualisasi dengan elektroforesis. Untuk mengetahui keberhasilan penyisipan gen, dilakukan digesti enzim pada plasmid rekombinan. Hasil penelitian ini diperoleh adanya gen *CBHA* yang diisolasi dari *Aspergillus niger* dengan ukuran 1.514 bp. Penyisipan gen *CBHA* pada vektor ekspresi yeast (pWYH257) belum menghasilkan plasmid rekombinan.

Kata kunci: plasmid rekombinan, RNA, RT-PCR, enzim restriksi.

## CLONING OF *CBHA* GENE FROM *Aspergillus niger* INTO YEAST EXPRESSION VECTOR AS A STAGES TO CREATE CELLULOSIC ETHANOL-PRODUCING STRAIN

By:

Suci Aulia Ratu Fajrin

(15/377265/BI/09432)

### ABSTRACT

Cellulosic ethanol production as alternative energy requires cellulase enzyme in cellulose degradation process. Several microorganisms have cellulase enzyme activity, one of them is *Aspergillus niger*. Cellulose degradation require three kinds of cellulase enzyme, they are endoglucanase, exoglucanase (cellobiohydrolase/*CBH*), and  $\beta$ -glucosidase. Cellulosic ethanol production can utilize recombinant DNA technique, which is forming a strain that has cellulolytic activity and can hydrolyze cellulose to glucose, also can produce ethanol. One of the application of recombinant DNA technology is gene cloning. This research aims to isolate the *CBHA* gene from *Aspergillus niger* and find out the result of *CBHA* gene cloning into yeast expression vector (pWYH257). The total RNA was isolated from *Aspergillus niger* and made as a template to obtain cDNA by RT-PCR. The amplification of *CBHA* gene was carried out using the PCR and specific primer and visualized by electrophoresis. The *CBHA* gene inserted into pWYH257. DNA fragments cleaved by *Pst*I and *Spe*I restriction enzymes. T4 DNA ligase was used for connecting DNA fragments. Ligation products were transformed into *E. coli* DH10B competent cells using the electroporation method. The recombinant plasmid purified and visualized using electrophoresis. The digestion enzyme on the recombinant plasmid was used to determine the success of gene cloning. Based on this research, *CBHA* gene can be isolated from *Aspergillus niger* and show 1,514 bp in size. The *CBHA* gene cloning to pWYH257 has not produced recombinant plasmid.

Keywords: recombinant plasmid, RNA, RT-PCR, restriction enzymes.