



AMPLIFIKASI ORF (OPEN READING FRAME) ENZIM PROTEASE NETRAL (NPr) TERMOSTABIL DARI BAKTERI TERMOFILIK

YANG DIISOLASI DARI KAWAH SIKIDANG, DIENG, JAWA TENGAH

JOSHUA HALIM, Dr.rer.nat. Lucia Dhiantika Witasari, S.Farm., Apt., M.Biotech.; Yunika Mayangsari, S.Si., M.Biotech.

Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

AMPLIFIKASI ORF (*Open Reading Frame*) ENZIM PROTEASE NETRAL (NPr)  
TERMOSTABIL DARI BAKTERI TERMOFILIK YANG DIISOLASI DARI  
KAWAH SIKIDANG, DIENG, JAWA TENGAH

## INTISARI

Oleh:

**JOSHUA HALIM**  
**17/414023/TP/11965**

Protease netral merupakan protease yang memiliki penggunaan yang luas dalam industri pangan seperti industri daging dan industri bir karena sifatnya yang optimal di pH netral. Pada praktiknya, terdapat banyak tahapan proses dalam industri yang bersuhu tinggi sehingga termostabilitas enzim menjadi penting. Bakteri termofilik yang diisolasi dari kawah Sikidang, Dieng, Jawa Tengah yang teridentifikasi sebagai *Geobacillus* sp. memiliki aktivitas proteolitik pada *Minimal Synthetic Medium* (MSM) *agar* + 1% *Skim Milk* berdasarkan penelitian terdahulu. Penelitian ini bertujuan untuk mengamplifikasi *Open Reading Frame* (ORF) protease netral termostabil dari *Geobacillus* sp. supaya ORF tersebut dapat dimasukkan ke dalam bakteri mesofilik (*E. coli*) melalui metode kloning molekuler sehingga enzim protease netral termostabil dapat diproduksi pada suhu moderat.

Penelitian ini dimulai dengan menganalisis ORF protease netral (NPr) termostabil yang berasal dari berbagai *Bacillus* ataupun spesies yang memiliki kedekatan dengan *Bacillus*. Setelah itu, dilakukan desain primer internal berdasarkan *conserved region* ORF protease netral termostabil. Dengan metode PCR, primer internal mengamplifikasi bagian *conserved region* dari ORF protease netral termostabil yang terdapat pada genome *Geobacillus* sp. Hasil amplifikasi primer internal lalu disekuensing dan dianalisis menggunakan BLAST untuk mencari kedekatan ORF sampel dengan ORF protease dari spesies lain yang terdapat dalam database NCBI. Setelah itu, dilakukan desain primer eksternal berdasarkan ORF protease netral yang memiliki kemiripan paling tinggi dengan ORF target NPr. Menggunakan PCR, primer eksternal mengamplifikasi ORF NPr mulai dari *start codon* hingga *stop codon*. Hasil gel elektroforesis menunjukkan panjang basa 1500-2000 bps. Analisis BLAST mengkonfirmasi bahwa ORF yang teramplifikasi memiliki kemiripan yang tinggi dengan protease netral dari *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

**Kata Kunci:** Amplifikasi ORF, Protease Netral Termostabil, *Geobacillus* sp., Desain Primer PCR



**AMPLIFIKASI ORF (OPEN READING FRAME) ENZIM PROTEASE NETRAL (NPr) TERMOSTABIL DARI BAKTERI TERMOFILIK YANG DIISOLASI DARI KAWAH SIKIDANG, DIENG, JAWA TENGAH**

JOSHUA HALIM, Dr.rer.nat. Lucia Dhiantika Witasari, S.Farm., Apt., M.Biotech.; Yunika Mayangsari, S.Si., M.Biotech.

Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

**AMPLIFICATION OF THERMOSTABLE NEUTRAL PROTEASE (NPr) ENZYME ORF (Open Reading Frame) FROM THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM SIKIDANG CRATER, DIENG, CENTRAL JAVA**

**ABSTRACT**

**By:**

**JOSHUA HALIM**  
**17/414023/TP/11965**

Neutral protease is a protease that has a lot of uses in the food industry – for instance, the meat and beer industry – due to its stability at neutral pH. Practically, there are a lot of industrial processes that operate at high temperatures; therefore, the thermostability of an industrial enzyme becomes important. A thermophilic bacteria species which was isolated from Sikidang Crater, Dieng, Central Java and was identified as *Geobacillus* sp. shows proteolytic activity in *Minimal Synthetic Medium* (MSM) agar + 1% *Skim Milk* in accordance to previous research. This research aimed to amplify the Open Reading Frame (ORF) of thermostable neutral protease ORF from *Geobacillus* sp. so that it could be cloned into a mesophile (*E. coli*) so that it could be produced at moderate temperature.

This research started by analyzing ORF of thermostable neutral protease (NPr) from various *Bacillus* or *Bacillus*-related species. Then, a pair of internal primers were designed based on the conserved region in the thermostable neutral protease ORF. Using the PCR method, the internal primers amplified the conserved region of the thermostable neutral protease ORF from the genome of *Geobacillus* sp. The amplification result was sequenced and analyzed using BLAST to check its similarity with neutral protease genes from other species in the NCBI database. ORF with the most similarity was used for designing external primer. Thermostable neutral protease ORF was then amplified from its start to stop codon using external primer. Agarose gel electrophoresis run showed that the ORF was 1500-2000 bps in length. Analysis using BLAST confirmed that the amplified ORF had a high similarity with the neutral protease from *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

**Key words: ORF Amplification, Thermostable Neutral Protease, *Geobacillus* sp., PCR Primer Design**