

Intisari

Penelitian bertujuan untuk mengetahui kloning dan ekspresi gen kitinase bakteri *E. cloacae* LCK 20. Proses kloning gen dilakukan dengan merestriksi vektor dan gen target dengan dua enzim berbeda (BamH1 dan EcoR1). Hasil restriksi diligasi dengan bantuan enzim ligase dan ditransformasikan ke dalam sel inang DH5 α . Konfirmasi koloni positif yang membawa gen kitinase dengan melakukan PCR koloni selanjutnya dilakukan tahap isolasi plasmid untuk menghasilkan plasmid rekombinan. Plasmid rekombinan langsung dianalisis dengan melakukan sekuensing untuk mengetahui urutan basa nirtogennya. Berdasarkan hasil kloning menunjukkan berat molekul kitinase rekombinan sebesar 6516 bp, Hasil tersebut didapat dari ukuran vektor 5369 bp dan ukuran gen kitinase dari *E. cloacae* sebesar 1147 bp, serta mampu mengkode 392 asam amino. Analisis sekuen menggunakan BLAST menunjukkan bahwa plasmid rekombinan memiliki tingkat homologi sebesar 99% dengan kitinase dari *E. cloacae* CAV1669, *E. cloacae* CAV1668, *E. cloacae* CAV1411, *E. cloacae* CAV1311 dan *E. cloacae* FRM. Proses selanjutnya melakukan ekspresi gen dengan mentransformasi kitinase rekombinan ke dalam sel inang BL21. Koloni yang tumbuh dikultur lalu di induksi IPTG dan dianalisis menggunakan SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE tidak terdapat pita yang menunjukkan pada ukuran 42,534 kDa. Berdasarkan dari hasil yang diperoleh menyatakan bahwa *E. coli* BL21 tidak mampu terekspresi, hal ini dapat disebabkan oleh penurunan kualitas sel inang sehingga daya respon terhadap induksi IPTG sangat lemah dan menyebabkan RNA polimerase tidak mampu melakukan transkripsi gen struktural. Indikasi lain penyebab kegagalan ekspresi gen yaitu fase pertumbuhan *E. coli* (BL21) berada pada fase lag, dimana sel bakteri belum mengalami pembelahan secara aktif sehingga menghasilkan OD yang rendah.

Kata kunci: *E. cloacae*, ekspresi gen, kitinase rekombinan, kloning

Abstract

The study aims to determine cloning and expression chitinase gene of *E. cloacae* LCK 20. Gene cloning process was done by restoring vector and target gene with two different enzymes (BamH1 and EcoR1). Restriction results are ligated with the aid of ligase enzyme and transformed into DH5 α host cell. Confirmation of positive colonies are carrying the chitinase gene by performing PCR colonies further carried out the plasmid isolation stage to produce recombinant plasmids. The recombinant plasmid is directly analyzed by sequencing to determine the order of its nitrogen base. Based on the cloning result, the recombinant chitinase molecule was 6516 bp. The result was obtained from the vector size 5369 bp and the chitinase gene size of *E. cloacae* of 1147 bp, and it was able to encode 392 amino acids. Sequence analysis using BLAST showed that the recombinant plasmid had a 99% homology level with chitinase from *E. cloacae* CAV1669, *E. cloacae* CAV1668, *E. cloacae* CAV1411, *E. cloacae* CAV1311 and *E. cloacae* FRM. The next process performs gene expression by transforming the recombinant chitinase into the BL21 host cell. The colonies, itgrew were cultured, then in IPTG induction and analyzed using SDS-PAGE. Result of SDS-PAGE there is no band showing at size 42,534 kDa. Based on the result obtained stated that *E. coli* BL21 is not able to be expressed, this can be caused by the deterioration of host cell quality so the response to IPTG induction is very weak and cause to RNA polymerase unable to transcription the structural genes. Another indication of the cause of gene expression failure is that the growth phase of *E. coli* (BL21) is in the lag phase, where the bacterial cell has not actively cleaved to produce a low OD.

Key words : cloning, *E. cloacae*, gene expression, recombinant chitinase