

**PENGEMBANGAN VEKTOR KLONING BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL)
YANG AMAN UNTUK INDUSTRI FERMENTASI SUSU**Widodo¹**INTISARI**

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan vektor kloning BAL yang aman dikonsumsi (*food grade*). Pengembangan vektor kloning dilakukan dengan pembentukan DNA rekombinan pembawa gen *orf3* dari gen penyandi sifat resistensi terhadap tembaga (*lco*). Ekspresi gen *orf3* dilakukan dengan sistem ekspresi yang diinduksi nisin (*nisin-induced expression system*) pada inang *L. Lactis* NZ9000. Transforman pembawa gen *orf3* diseleksi berdasarkan kemampuannya menghasilkan warna koloni biru ketika ditumbuhkan pada medium M17G disuplementasi 0,5 mM Xgluc dan nisin (5 ng/ml). Seleksi transforman juga dilakukan dengan isolasi plasmid rekombinan, diikuti dengan konfirmasi keberadaan gen *orf3* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dari plasmid rekombinan terpilih. Klon *L. lactis* positif pembawa gen *orf3* dapat diketahui dengan keberadaan pita DNA 0,9 kb setelah elektroporesis pada 1% gel agarosa. Konfirmasi sintesis protein *orf3* pada 12% Tris-glycine SDS PAGE gel menunjukkan protein dengan ukuran ~40 kDa. Uji kemampuan resistensi zat tembaga dari klon *L. lactis* terpilih kemudian dilakukan dengan uji konsentrasi penghambatan minimum (*minimum inhibitory concentration*, MIC) pada medium M17G dengan konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ berbeda. Hasil uji menunjukkan bahwa *L. lactis* NZ9000 pembawa gen *orf3* mempunyai kemampuan untuk tumbuh pada medium mengandung 0,5mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Kemampuan resistensi tembaga sulfat ini dapat digunakan sebagai penanda seleksi pengganti antibiotik pada vektor kloning yang baru (pNZ-*orf3*).

(Kata kunci : Aman dikonsumsi, Plasmid rekombinan, Gen resisten tembaga)

¹Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No. 3 Bulaksumur, Yogyakarta. 55281

DEVELOPMENT OF A FOOD-GRADE CLONING VECTOR OF LACTIC ACID BACTERIA FOR DAIRY FERMENTATION INDUSTRY

ABSTRACT

The purpose of the experiment was to develop a food-grade cloning vector for Lactic Acid Bacteria. This was achieved by means of construction of a recombinant DNA bearing open reading frame 3 (*orf3*) of copper resistance genes (*lco*) of *Lactococcus lactis*. The *orf3* gene was expressed through a nisin-induced expression system (NICE), and transformants were selected based on blue colonies appearance on XGluc-containing M17G agar supplemented with XGluc (0,5 mM) and nisin (5ng/ml). Recombinant plasmids isolated from the transformants with larger in size than the vector pNZ8010 were chosen as suspected of bearing *orf3* gene. The presence of the inserted *orf3* was then confirmed through polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Positive clones bearing the inserted *orf3* gene showed amplified 0.903 kb bands of PCR products on 1% agarose gel. Synthesized *orf3* proteins were shown as ~40 kDa protein bands on 12% Tris-glycine SDS PAGE gel. Further copper resistance assays showed a resistance to 0.5mM copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) for clones bearing *orf3* gene as compared to 3.5mM for clones bearing the whole *orf3*, *orf4* and *orf5*. The ability to survive on 0.5mM copper sulfate is of potential as a food-grade selection marker to replace chloramphenicol.

(Key words : Food grade, Recombinant plasmids, *Lco* genes)

Pendahuluan

Bakteri asam laktat (BAL) mempunyai peranan penting dalam proses fermentasi yogurt, keju, kefir, yakult dan berbagai susu asam. Seiring dengan kemajuan bioteknologi modern, pengembangan produk fermentasi susu sangat bergantung pada pengembangan genetik BAL (Widodo, 2003). Pengembangan genetik ini sangat didukung oleh vektor kloning yang merupakan piranti vital dalam proses rekayasa genetik, mengingat melalui vektor inilah kita akan menyisipkan gen yang dikehendaki untuk diekspresikan dalam bakteri penerima (*host*). Ada beberapa syarat penting bagi suatu plasmid untuk dapat dipakai sebagai vektor kloning, diantaranya adalah membawa penanda seleksi, mempunyai tempat pemotongan spesifik dan mempunyai kemampuan penggandaan diri (*plasmid copy number*) yang tinggi (Brown, 1995; Old and Primrose, 1989).

Berbagai plasmid vektor diketahui aplikatif untuk BAL, diantaranya adalah pGB301 (Behnke *et al.*, 1982), pSA3 (Dao and

Ferretti, 1985), pMU1327 (Achen *et al.*, 1986) dan pND951 (Khunajakr, 1999). Sebagai penanda seleksi transforman, plasmid-plasmid diatas membawa gen resisten terhadap antibiotik. Plasmid pSA3 membawa gen resisten terhadap eritromisin (Em^R), kloramphenikol (Cm^R) dan tetrasiklin (Tc^R). Plasmid pMU1327 membawa gen resisten eritromisin (Em^R), sedangkan plasmid pND951 membawa gen resisten eritromisin (Em^R) dan kloramphenikol (Cm^R). Beberapa contoh plasmid vektor tersebut telah diketahui berperan dengan baik sebagai vektor kloning pada beberapa spesies BAL (Dao and Ferretti, 1985; Achen *et al.*, 1986; Khunajakr, 1999). Namun demikian, untuk dapat diterapkan dalam sistem fermentasi yang aman dikonsumsi (*food-grade fermentation*), plasmid vektor diatas mengalami kendala serius. Kendala tersebut adalah keberadaan sifat resistensi antibiotik yang dikhawatirkan dapat berpindah ke bakteri lain baik selama proses pengolahan maupun setelah dikonsumsi. Kemampuan berpindah gen resisten antibiotik ini secara etis, moral dan

ditinjau dari sudut pandang ilmiah tidak dapat diterima (de Vos, 1999). Plasmid vektor kloning yang aman dikonsumsi (*food-grade cloning vectors*) harus memenuhi syarat keamanan, stabil pada proses pengolahan, karakter genetiknya diketahui, berasal dari bakteri yang aman dikonsumsi, aplikatif pada proses pengolahan pangan, dan tidak membawa gen resisten terhadap antibiotik (de Vos, 1999). Dengan alasan inilah pengembangan plasmid vektor kloning yang *food grade* sekarang diprioritaskan.

Beberapa plasmid vektor kloning yang sifatnya *food grade* telah banyak dikembangkan. Supaya memenuhi syarat *food grade*, beberapa peneliti menggunakan komponen non antibiotik sebagai penanda seleksi. Diantaranya adalah metabolisme laktosa (MacCormick *et al.*, 1995), resistensi terhadap nisin (Nis[®]) (Froseth and McKay, 1991; Duan *et al.*, 1996) dan resistensi terhadap kadmium (Cd[®]) (Liu *et al.*, 1996). Keterbatasan dari plasmid vektor dengan penanda seleksi laktosa adalah ukurannya yang besar, banyak gen yang terlibat dan mempunyai jumlah kopi plasmid yang rendah (de Vos, 1999). Keterbatasan dari plasmid vektor dengan penanda seleksi nisin adalah batas pemakaian nisin yang sangat ketat (maksimal 14 ng/ml), ukuran plasmid yang besar, banyaknya gen terlibat dalam metabolisme nisin dan tidak stabil (de Vos, 1999).

Potensi pemanfaatan resistensi terhadap zat tembaga (*copper-resistant genes*) sebagai penanda seleksi terbuka lebar mengingat BAL secara alami menyandi gen resisten tembaga (*lco*). Leclawatcharamas *et al.* (1997) melaporkan bahwa sifat resistensi tembaga diperoleh dari *L. lactis* pND306 dengan ukuran 10,6 kilo basa (kb). Sekuensing dari 10,6 kb ini menunjukkan adanya dua operon. Satu operon terdiri atas lima ORFs (*open reading frames*) yaitu *orf1*, *orf2*, *orf3*, *orf4* dan *orf5* (Khunajakr, 1999). Sedang operon kedua terdiri atas dua ORFs yaitu *orf7* dan *orf8* yang sekuennya mirip transposon. Dua ORFs yaitu *orf2* dan *orf3*

diketahui berfungsi sebagai signal regulator. Tiga ORFs yaitu *orf3*, *orf4* dan *orf5* diketahui berperan dalam resistensi tembaga, sedangkan *orf6* tidak diketahui secara detail fungsinya.

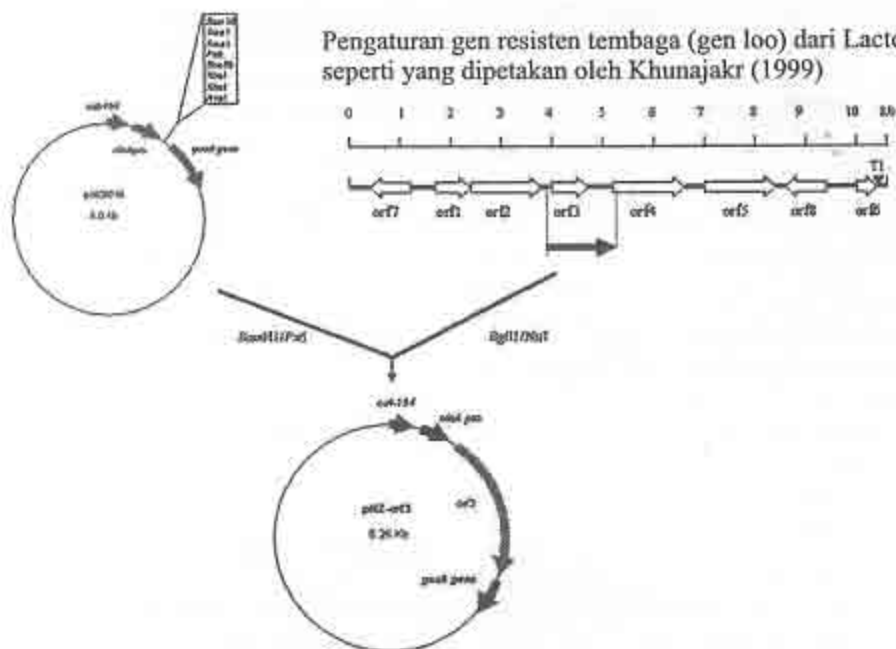
Penelitian ini bertujuan untuk melakukan konstruksi plasmid rekombinan dengan gen *orf3* sebagai insert. Ekspresi *orf3* pada *L. lactis* dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui peranan *orf3* terhadap kemampuan resistensi tembaga. Peranan ini selanjutnya dapat dikembangkan sebagai penanda seleksi pengganti antibiotik, dan plasmid yang dikembangkan dapat dimanfaatkan sebagai vektor kloning yang memenuhi persyaratan keamanan.

Materi dan Metode

Strain, bahan dan alat penelitian

Plasmid pNZ8010 dan bakteri inang *L. lactis* NZ9000 dibeli dari NIZO Food Research, The Netherlands. Plasmid pND954 dan pND951 pembawa gen *lco* diperoleh dari Departemen Bioteknologi, University of New South Wales, Sydney, Australia. *E. coli* ditumbuhkan pada medium Luria Bertani (LB) pada suhu 37°C dengan penambahan eritromisin (80 µg/l). Untuk ekstraksi plasmid, sel ditumbuhkan dalam medium LB plus eritromisin dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan penggojogan 180 rpm selama semalam. *L. lactis* NZ9000 ditumbuhkan pada medium M17 dengan suplementasi 0,5% glukosa (M17G). Penumbuhan *L. lactis* NZ9000 dilakukan pada suhu 30°C dan regenerasi dilakukan dengan sub-kultur setiap 2 minggu serta disimpan pada suhu 4°C.

Bahan penelitian yang diperlukan diantaranya medium LB dan M17G, Larutan I (Tris/Glukosa/EDTA), Larutan II (1% SDS; 0,2% NaOH), Larutan III (5M potasium asetat), loading dye (terdiri atas bromophenol biru, xylene cyanol, dan sukrosa), X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D glucoronide sodium salt), isopropanol, es pendingin, 1% agarose gel untuk elektroforesis, 1X bufer TAE (Tris/Asetat/EDTA), dNTPs, buffer PCR, MgCl₂, DNA polymerase, primer,



Gambar 1. Konstruksi plasmid rekombinan pembawa *orf3*
(Figure 1. A recombinant plasmid construction for bearing *orf3*)

Tris/EDTA bufer mengandung RNase, beberapa enzim restriksi (*restriction enzymes*) seperti *Bam*HI, *Nsi*I, *Bgl*II dan *Pst*I, antibiotik eritromisin dan kloramphenikol, larutan EtBr untuk pengecatan, *Bio-rad ready* 4-15% untuk elektroporesis protein, cat *coomassie blue* dan akuades untuk pembilasan.

Alat yang diperlukan meliputi sentrifus 14000 rpm, *shaking incubator*, inkubator dengan pengontrol suhu, seperangkat alat untuk pembuatan gel agarose, mesin PCR (Perkin-Elmer Gen Amp PCR System 2400), seperangkat alat elektrophoresis, Bio-Rad apparatus untuk *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE), transluminator UV dan kamera untuk pemotretan plasmid DNA.

Konstruksi plasmid rekombinan

Plasmid rekombinan dihasilkan dari ligasi plasmid pNZ8010 yang dipotong dengan enzim *Bam*HI/*Pst*I dan gen *lco* yang

diisolasi dengan enzim *Bgl*II/*Nsi*I, seperti disajikan pada Gambar 1. Ligasi dilakukan sesuai dengan prosedur produk fermentasi yaitu dengan menggabungkan 2µl buffer ligase, 1µl T4 DNA ligase, 1 : 3 (2µl plasmid vektor dengan konsentrasi 100ng: 6µl fragmen DNA dengan konsentrasi 300ng) dalam total volume 20µl. Campuran ligasi diinkubasi pada suhu sekitar 22°C semalam untuk selanjutnya ditransformasikan ke inang dengan sistem elektroporasi.

Transformasi dengan elektroporasi

Transformasi dilakukan dengan metode elektroporasi langsung (*direct electroporation*) ke sel kompeten *L. lactis* NZ9000 sebagai inang (Widodo, 2002). Elektroporasi dilakukan dengan menggunakan 40µl sel kompeten dan 2µl hasil ligasi. Campuran ini ditempatkan dalam kuvet elektroporasi, didinginkan dalam es, dilanjutkan dengan elektropolasi pada

tegangan 2500 volt, 25 μ F dan 200 ohm. Setelah elektroporasi, 1 ml medium SGM17GC (M17G plus 0,5M sukrosa, 20mM CaCl_2 , dan 2 mM MgCl_2) ditambahkan dalam kuvet dan diinkubasi 30°C selama 2-3 jam. Setelah inkubasi, 200 μ l suspensi sel ditumbuhkan pada medium M17G agar plus kloramphenikol, nisin dan X-Gluc dan diinkubasi selama 24-48 jam pada 30°C. Transforman diseleksi berdasarkan terbentuknya koloni biru pada M17G mengandung X-Gluc dan nisin. Keberadaan plasmid rekombinan dikonfirmasi dengan isolasi plasmid yang dibawanya.

Isolasi plasmid rekombinan

Isolasi plasmid DNA dilakukan dengan dua metode. Isolasi plasmid rekombinan dari sel *L. lactis* NZ9000 dilakukan berdasarkan metode O'Sullivan and Klaenhammer (1993) yang telah dimodifikasi. Isolasi plasmid DNA dari strain *E. coli* dilakukan menurut metode Sambrook *et al.* (1989).

Amplifikasi PCR (Polymerase chain reaction)

Amplifikasi PCR dilakukan dengan alat GeneAmp PCR sistem. PCR dilakukan dengan volume sampel 20 μ l dan 35 siklus amplifikasi pada suhu denaturasi 94°C, suhu penggabungan primer 55°C dan suhu amplifikasi 72°C. Primer dirancang menggunakan software perancang primer dari Macintosh (*Amplify*) dan ANGIS (*Primer*). Kedua primer yang digunakan untuk amplifikasi *orf3* adalah *orf3F* (5' CTC CCC TAT TGT GGT TCA TTG 3') dan *orf3R* (5' GCA TAG GGA GCG ATA GAG 3').

Ekstraksi protein

Protein intraseluler diekstraksi dari fase pertumbuhan logaritmik (*log-phase culture*) dan biomassa dipanen dengan sentrifugasi 6000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensikan pada 3 ml buffer phosphate (20 mM Na_2HPO_4) dan dipindahkan pada tabung reaksi yang telah diisi dengan *glass beads* steril ukuran 150-212

microns (Sigma katalog G1145). Lisis sel dilakukan dengan alat vortex pada kecepatan maksimum selama 30 detik diikuti dengan pendinginan es selama 1 menit dengan total waktu *vortexing* selama 6 menit. Setelah *glass beads* diendapkan beberapa saat, supernatan diambil dan sentrifugasi pada 12000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit dilakukan untuk mengendapkan sisa *glass beads*. Supernatan yang diperoleh kemudian dipindahkan pada tabung ependorf yang baru dan disimpan pada -20°C sampai dipakai untuk analisis SDS PAGE.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

Untuk analisis SDS PAGE, sampel protein yang diperoleh dipanaskan pada air mendidih selama 3 menit dan dilanjutkan pendinginan pada suhu ruang. Sebanyak 20 μ l sampel protein digunakan untuk analisis dengan menggunakan gel *Bio-Rad ready 4-15% PAGE* (12% Tris-glycine gel dengan 4% *stacking gels* dan 10 lubang sumuran). Aparatus Bio-Rad digunakan untuk analisis SDS PAGE dengan menggunakan voltase 125 V selama 90 menit. Setelah selesai, gel diambil dan dilakukan pengecatan dengan *coomasie blue*.

Uji resistensi tembaga dengan metode MIC (*minimal inhibitory concentration*)

Uji ketahanan klon terhadap tembaga sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dilakukan dengan menumbuhkan klon *L. lactis* NZ9000 pada medium M17G dengan suplementasi nisin (5 ng/ml) dan penambahan tembaga sulfat dengan kadar berbeda mulai dari 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 3,5 mM. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 3 hari, dan MIC ditentukan dengan minimal konsentrasi minimal $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang menghambat pembentukan koloni tunggal pada medium M17G.

Hasil dan Pembahasan

Penentuan jenis enzim endonuklease restriksi yang dipakai sangat menentukan

keberhasilan konstruksi DNA rekombinan. Hal ini karena hanya jenis enzim yang sesuai yang dapat melepaskan *orf3* dari plasmid pND954. Untuk pelepasan *orf3*, digunakan enzim *BglII/NsiI* yang menghasilkan 1,260 kb pembawa *orf3* (Gambar 1). Hasil pemotongan sekuen DNA dengan *BglII* berupa potongan DNA yang bersifat *cohesive ends* dengan urutan basa A/GATCT yang akan dapat diligasikan dengan hasil pemotongan dengan enzim *BamHI* yang menghasilkan *cohesive ends* G/GATCC. Enzim *NsiI* akan menghasilkan potongan *cohesive ends* ATGCA/T yang akan dapat disambungkan dengan hasil potongan DNA dengan enzim *PstI* yang berupa *cohesive ends* CTGCA/G. Karena alasan itulah maka pemotongan plasmid pND954 dengan enzim *BglII/NsiI* diligasikan dengan hasil potongan plasmid vektor pNZ8010 dengan enzim *BamHI/PstI*. Perlu dijelaskan disini bahwa plasmid pNZ8010 tidak membawa sekuen DNA yang dapat dikenali oleh enzim *BglII* dan *NsiI*.

Hasil penggabungan potongan DNA vektor dan donor dengan enzim ligase memberikan hasil yang baik (data tidak ditampilkan). Hal ini karena kedua potongan DNA mempunyai sisi yang cocok (*compatible*) dan juga aktivitas enzim ligase sangat memungkinkan untuk menyambungkan dua sisi potongan DNA atau mengisi kembali suatu sekuen DNA yang terpotong (Old and Primrose, 1989; Sambrook, *et al.*, 1989). Hasil ligasi ini selanjutnya ditransformasikan ke inang *L. lactis* NZ9000. *L. lactis* NZ9000 merupakan inang yang bebas plasmid serta tidak mempunyai sistem restriksi dan modifikasi sehingga keberadaan plasmid rekombinan sebagai DNA asing tidak akan terganggu. Transforman yang diperoleh diseleksi berdasarkan kemampuan tumbuh dan membentuk warna biru koloni pada medium M17G plus X-Gluc dan nisin. Transforman terpilih diseleksi untuk isolasi plasmid untuk mengetahui apakah transforman tersebut membawa plasmid rekombinan yang diharapkan. Hasil ekstraksi plasmid dapat dilihat pada Gambar 2.

Dari Gambar 2 dapat diketahui bahwa plasmid DNA rekombinan yang membawa gen *orf3* mempunyai ukuran (dalam kilo basa, kb) yang lebih besar dibandingkan dengan plasmid vektor pNZ8010. Hal ini dipahami karena plasmid DNA rekombinan merupakan plasmid vektor yang membawa sisipan (*insert*) yang berasal dari gen *orf3*. Dari Gambar 3 dapat diketahui bahwa ada 2 ukuran plasmid rekombinan yang diduga pembawa *orf3*, yaitu plasmid nomor 3, 12 dan 14. Kedua plasmid ini selanjutnya dipakai sebagai cetakan (*template*) untuk amplifikasi *orf3* dengan PCR menggunakan primer spesifik untuk memastikan keberadaan *orf3*. Hasil dari amplifikasi ini dapat dilihat pada Gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan bahwa amplifikasi gen *orf3* pada beberapa plasmid rekombinan menghasilkan ampikon 0,9 kb. Pada kontrol dengan menggunakan plasmid pNZ8010 yang tidak membawa *orf3* diketahui tidak menghasilkan ampikon 0,9 kb. Adanya hasil amplifikasi mengindikasikan adanya DNA template (sekuen gen *orf3*) berhasil dikenali oleh primer dan selanjutnya terjadi polimerasi DNA menghasilkan DNA untai ganda. Argumen ini diperkuat dengan tidak adanya hasil amplifikasi DNA, dengan kondisi PCR yang sama, ketika plasmid pNZ8010 dipakai sebagai cetakan. Adanya hasil amplifikasi juga menunjukkan bahwa suhu yang dipakai untuk denaturasi DNA (94°C), penempelan primer (55°C) dan suhu polimerasi (72°C) merupakan kondisi yang memenuhi syarat untuk terjadinya amplifikasi DNA.

Karena sistem ekspresi genetik yang digunakan diinduksi nisin (*nisin-induced expression system*), transformasi ke inang *L. lactis* NZ9000 diharapkan akan mengaktifkan promotor *nisA*. Menurut Kuipers *et al.* (1997) promotor *nisA* bersifat inducibel dan hanya akan aktif jika nisin ditambahkan pada medium pertumbuhan. Dalam hal ini, nisin akan menginduksi proses transkripsi melalui promotor *nisA* menggunakan signal transduksi oleh dua sistem regulator yang terdiri dari



Keterangan :

M. DNA penanda, λ DNA dipotong enzim *Hind*III

1. Plasmid vektor pNZ8010
2. Plasmid rekombinan dari transforman nomor 3
3. Plasmid rekombinan dari transforman nomor 12
4. Plasmid rekombinan dari transforman nomor 14

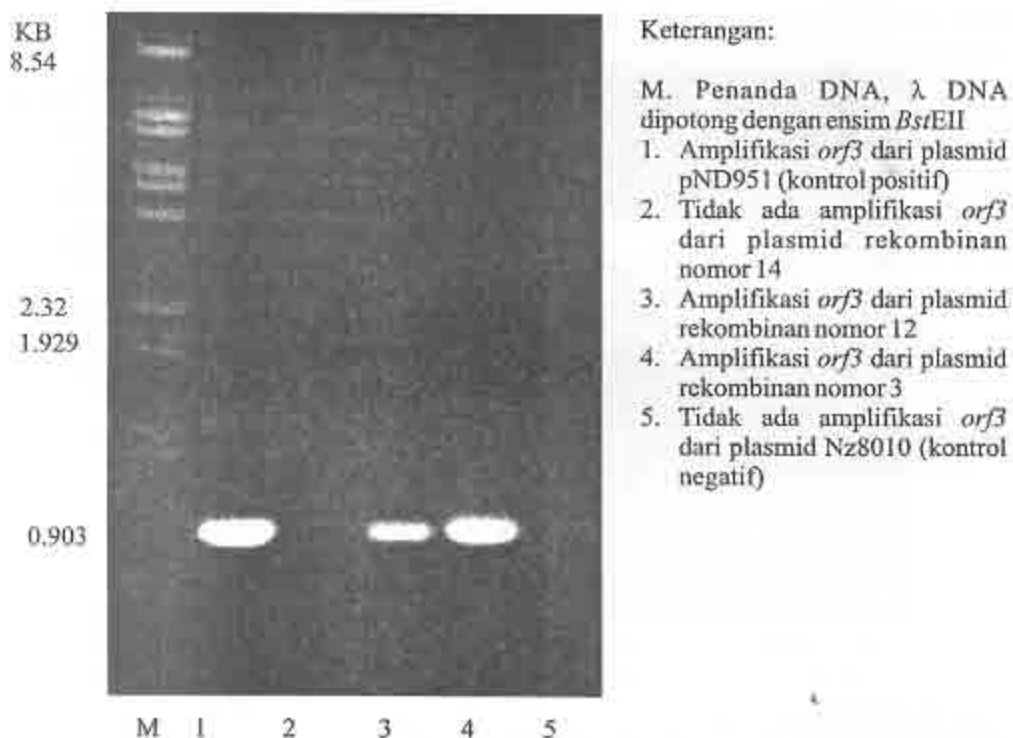
Gambar 2. Hasil isolasi plasmid plasmid rekombinan dari beberapa transforman *L. Lactis* (Figure 2. Isolation of the recombinant plasmids from *L. lactis* transformants)

Histidin kinase (*nisK*) dan respon regulator (*nisR*). Kedua protein ini berperan dalam sistem pengaturan dua komponen (*two-component regulatory systems*) dimana *nisR* berperan sebagai respon regulator sedang *nisK* sebagai sensor terhadap signal yang datang. Protein *nisK* mengenali signal eksternal dilanjutkan dengan phosphorylasi protein *nisR* dan aktivasi promoter *nisA* pada proses transkripsi (de Vos et al., 1995). Ditinjau dari sudut kepentingan gen *nisR* dan *nisK* inilah perlunya inang *L. lactis* NZ9000 mengingat pada inang ini gen *nisK* dan *nisR* telah terintegrasi dalam sistem genetik kromosomnya (de Ruyter et al., 1996).

Transkripsi akan diikuti oleh proses translasi dan pembentukan asam-asam amino (protein) dari gen yang dibawanya. Protein yang dihasilkan dari ekspresi gen *orf3* dapat dilihat dengan analisis SDS PAGE seperti disajikan pada gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan bahwa transforman 12 dan 3 yang sebelumnya diketahui membawa gen *orf3* (Gambar 3) mampu menghasilkan protein *orf3* yang terlihat dengan ukuran ~40 kDa pada analisis SDS PAGE. Perbandingan sekuen protein *orf3* dengan database protein (*in silico analysis*) mengindikasikan peranan protein *orf3* sebagai transporter untuk eflux (pembuangan) Cu^{2+} dari sitoplasma sel (Leelawatcharamas et al., 1997). Peranan ini penting untuk mencegah akumulasi Cu^{2+} pada level toksik bagi sel. Dengan demikian, sintesis protein yang disandi oleh gen *orf3* akan berakibat pada kemampuan klon *L. lactis* NZ9000 untuk resisten terhadap tembaga sulfat pada kadar tertentu. Hasil pengujian resistensi tembaga ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa kemampuan tumbuh klon *L. lactis* NZ9000



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen *orf3* dari plasmid rekombinan dengan primer spesifik (Figure 3. *Orf3* amplification of the selected recombinant plasmids using specific primers)

pada medium M17G dengan kadar tembaga sulfat tergantung pada jenis rekombinan plasmid dan potongan gen *lco* yang dibawanya. Pada klon *L. lactis* NZ9000 pembawa plasmid rekombinan pND951 dan pND955, tingkat resistensi terhadap tembaga mencapai 3,5 mM. Pada klon yang sama dengan plasmid rekombinan berbeda mempunyai tingkat resistensi berbeda. Dengan plasmid pND954 didalamnya, klon *L. lactis* NZ9000 mampu resisten terhadap tembaga sampai 1,0 mM sedangkan dengan plasmid rekombinan pembawa *orf3* mampu tumbuh pada kadar tembaga 0,5 mM. Inang *L. lactis* NZ9000 sendiri tanpa plasmid didalamnya hanya mampu tumbuh pada kadar 0,1 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Dibandingkan dengan plasmid pND951 dan pND954 kemampuan resistensi

tembaga dari plasmid pembawa gen *orf3* relatif lebih rendah. Hal ini dipahami mengingat plasmid pNZ-*orf3* hanya membawa sebagian kecil (1,26 kb) dari total 10,6 kb gen resistensi tembaga. Argumen ini didukung oleh penelitian Khunajakr (1999) dan Lelewatcharamas (1997) yang menyatakan bahwa yang berperan dalam kemampuan resistensi tembaga adalah *orf3*, *orf4* dan *orf5* dari gen *lco* secara bersama-sama. Menurut mereka, ketiga gen tersebut secara akumulatif saling bekerjasama untuk menentukan sifat resistensi tembaga sulfat. Pemisahan darimasing-masing gen *orf3*, *orf4* dan *orf5* hanya akan memberikan kemampuan resistensi parsial.

Dengan adanya data yang menerangkan keberadaan insert *orf3* dalam plasmid rekombinan, dapat dikatakan

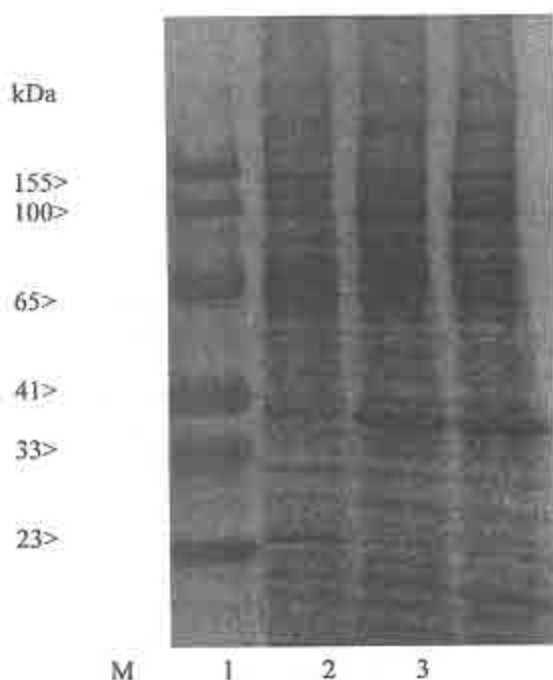
Tabel 1. Tingkat resistensi klon *L. lactis* NZ9000 pembawa plasmid rekombinan pada berbagai kadar tembaga sulfat (*Copper resistance of L. lactis* NZ9000 clones on a different level of $CuSO_4 \cdot 7H_2O$)

Klon <i>L. lactis</i> NZ9000 pembawa Plasmid rekombinan (<i>L. lactis</i> NZ9000 clones bearing different size of plasmid recombinants)	Resistensi terhadap berbagai level tembaga sulfat (<i>Copper resistance on different levels of $CuSO_4 \cdot 7H_2O$</i>)				
	0,5	0,75	1,0	2,0	3,5mM
Plasmid pND951, 10,6 kb gen <i>cop</i>	+	+	+	+	+
Plasmid pND955, 10 kb gen <i>cop</i>	+	+	+	+	+
Plasmid pND954, 7,1 kb gen <i>cop</i>	+	+	+	-	-
Plasmid pNZ-orf3, 1,26 kb gen <i>cop</i>	+	-	-	-	-

Sumber : Sebagian berdasarkan pada Khunajakr (1999) dan sebagian hasil penelitian ini

Keterangan table : (+) Klon *L. lactis* mampu tumbuh

(-) Klon *L. lactis* tidak mampu tumbuh



Keterangan:

M. Protein penanda (kDa)

1. Tidak ada pita protein orf3 pada transforman nomor 14
2. Pita protein orf3 pada transforman nomor 12
3. Pita protein orf3 pada transforman nomor 3

Gambar 4. Pita protein orf3 (~40 kDa) dari transforman *L. lactis* NZ9000 pada 12% Tris-glycine gel. (Figure 4. Bands of orf3 proteins from *L. lactis* NZ9000 transformans following SDS PAGE analysis on 12% Tris-glycine gel)

bahwa pembentukan plasmid DNA rekombinan telah berhasil. Dalam plasmid rekombinan ini, sekuen gen *orf3* terletak didalam suatu sistem ekspresi genetik dengan menggunakan promotor *nisA* dengan gen reporter *gusA* untuk ekspresi enzim β -glukoronidase. Indikator yang digunakan untuk mengamati adanya ekspresi gen *orf3* adalah terbentuknya enzim β -glukoronidase karena aktifnya gen reporter *gusA*. Terbentuknya enzim ini bisa terlihat dari perubahan warna koloni dari putih ke biru (de Ruyter *et al.*, 1996). Karena gen *orf3* terletak diatas *gengusA* (lihat Gambar 1), diekspresikannya gen *gusA* mengindikasikan diekspresikannya pula *gengen* yang terdapat diatasnya dengan catatan gen tersebut tersisip pada posisi yang benar. Penggunaan enzim gabungan (dua enzim) pada kasus ini memungkinkan gen *orf3* terletak pada posisi yang benar.

Kesimpulan

Gen *orf3* dari gen *lco* telah berhasil diklon pada *L. lactis* NZ9000 dengan menggunakan sistem ekspresi yang diinduksi nisin. Transforman *L. lactis* NZ9000 yang diperoleh diketahui mempunyai resistensi tembaga sampai 0,5 mM. Sifat resistensi terhadap tembaga sulfat ini selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai penanda seleksi pengganti kloramphenikol. Dengan digantikannya kloramphenikol, maka penanda seleksi antibiotik tidak digunakan lagi dan plasmid vektor yang dihasilkan memenuhi syarat aman dikonsumsi (*food grade*).

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kementrian Negara Riset dan Teknologi yang telah membantu pendanaan penelitian lewat proyek RUTIX.

Daftar Pustaka

Achen, M.G., B. E., Davidson and A. J. Hiller. 1986. Construction of plasmid vectors

for the detection of streptococcal promoters. *Gene*. 45:45-49.

- Brown, T.A. 1995. Gene Cloning: an introduction. Chapman and Hall. p:74-99.
- Behnke, D., M. S. Gilmore and J. Ferretti. 1982. pGB301 vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococci*. In Anonymous (1992). Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC. p:239-245.
- de-Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, M. M. Beerthuyzen, I. van Allen-Boerrigter and W. M. de Vos. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene clusters of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 178:3434-3439.
- de-Vos, W.M. 1999. Safe and Sustainable Systems for Food-Grade Fermentation by Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy Journal*. 9:3.
- Duan, K., M. L. Harvey, C. Q. Liu and N. W. Dunn. 1996. Identification and characterization of a mobilizing plasmid, pND300, in *Lactococcus lactis* M189 and its encoded nisin resistance determinant. *J. Appl. Bacteriol.* 81:493-500.
- Froseth, B.R and L. L. McKay. 1991. Development and application of pFM011 as a possible food-grade cloning vector. *J. Dairy Sci.* 74:1445-1453.
- Khunajakr, N. 1999. Gene regulation and vector construction in *Lactococcus lactis*. Unpublished Ph.D Thesis. Department Biotechnology, the University of New South Wales, Sydney, Australia. p:149-164
- Kuipers, O.P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerrebzem and W. M. de Vos. 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *TIBTECH* 15:135-140.
- Leclawactcharamas, V., L. G. Chia, P. Charoenchai, N. Khunajakr, C. Q. Liu and N. W. Dunn. 1997. Plasmid-encoded copper resistance in

- Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.* 19:639-643
- Liu, C. Q., V. Leclawatcharamas, M. L. Harvey and N. W. Dunn. 1996. Cloning vectors for lactococci based on a plasmid encoding resistance to cadmium. *Curr. Microbiol.* 33:35-39
- MacCormick, C. A., H. G. Griffin and M. J. Gasson. 1995. Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127:105-109
- Old, R. W and S. B. Primrose, 1989. Principles of Gene Manipulation: An introduction to genetic engineering. Blackwell Scientific Publications. p:11-15
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Widodo, 2003. Bioteknologi Industri Susu. Lacticia Press, Edisi Pertama. Yogyakarta
- Widodo, 2002. Direct electroporation as an alternative technique in transforming recombinant DNAs into *L. lactis*. *Indonesian Journal of Biotechnology.* June (2002):522-528