






<b>Deteksi dan Kloning Gen Penyandi Fitase Dari Yeast <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Galur PK-S20 Dalam Efisiensi Perbaikan Kualitas Pakan</b>	
 <b>Peneliti</b>	 <b>RingkasanEksekutif</b>
<p><b>Ketua : Seprianto, S.Pi, M.Si</b> (0309098702)</p> <p><b>Anggota</b> Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si (0323029101) Dr.Titta Novianti S.Si, M.Biomed (0318116801) Mahasiswa Regi Melati Fauziah (20190308004) Windy Wulansari (20190308005) Dimas Ridho Irvansyah (20190308010) Feren Stevany Wiranata (20200308001) Anwar Shafrial Irsyad (20200308008)</p>	<p>Fitase adalah enzim yang mampu menghidrolisa asam fitat menjadi inositol dan asam fosfat. Fitase dapat dijumpai pada mikroorganisme seperti kapang, yeast dan bakteri. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> salah satu yeast yang dilaporkan potensial menghasilkan enzim fitase. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PK-S20 dalam menghasilkan enzim fitase dengan mendeteksi gen penyandi fitase dan mengkloning gen tersebut kedalam sel <i>Escherichia coli</i>. Penelitian ini diawali dengan mendesain primer spesifik gen fitase, optimasi suhu <i>annealing</i> primer, deteksi gen fitase dan ligasi dan transformasi gen kedalam sel <i>Escherichia coli</i>. Hasil amplifikasi dari desain primer FitAF/FitAR dan FitaseF/FitaseR pada DNA genom <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PK-S20 terbentuknya pita DNA ukuran <math>\pm 500</math> bp. Deteksi menggunakan primer <i>PhyR/F</i> yang sudah tervalidasi menghasilkan pita DNA <math>\pm 1171</math> bp. Fragmen parsial gen fitase (<math>\pm 500</math> bp) telah berhasil diligasikan kedalam vektor pGEM-T <i>Easy</i> dengan prinsip <i>TA-Cloning</i> dan telah berhasil di transformasikan ke dalam sel <i>E coli</i> DH5<math>\lambda</math> yang ditandai dengan koloni putih (<math>\pm 12</math> klon) dan biru (<math>\pm 150</math> klon). Hasil validasi PCR koloni dari klon rekombinan menggunakan primer FitAF/R menghasilkan pita DNA sesuai dengan ukuran gen target (<math>\pm 500</math> bp), akan tetapi verifikasi dengan menggunakan enzim restriksi tidak menghasilkan potongan fragmen DNA</p> <p>Kata Kunci : asam fitat, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>, gen fitase, kloning</p>
	<div style="background-color: #A9C9E0; padding: 5px;">  <b>HKI danPublikasi</b> </div>

 Latar Belakang	 Hasil dan Manfaat
<p>Probiotik merupakan mikroba baik yang dapat menstimulasi pertumbuhan microbiota dalam sistem gastrointestinal yang dapat menghasilkan enzim tertentu yang membantu dalam mencerna makanan. Berbagai macam penelitian telah membuktikan luasnya potensi probiotik dalam bidang farmakologi, pangan dan pakan. Pakan buatan merupakan salah satu faktor produksi yang penting untuk menunjang keberhasilan budidaya dalam usaha peternakan. Biaya yang harus dikeluarkan untuk pengadaan pakan buatan sangat besar bila dibandingkan dengan biaya produksi lainnya yaitu mencapai 60 – 70% dari total biaya produksi (Putri et al, 2018). Permasalahan yang dihadapi yaitu bahan nabati yang terkandung dalam pakan buatan mengandung zat antinutrisi yaitu asam fitat yang akan menurunkan pencernaan, penyerapan nutrisi serta efisiensi pemanfaatan pakan pada hewan ternak (Purnamasari and Miswar, 2018)</p> <p>Adanya asam fitat yang terkandung pada bahan baku makanan terutama pada biji – bijian dapat menjadi faktor antinutrisi yaitu nilai gizi menjadi rendah karena tidak terserap sempurna oleh usus. Kondisi ini dikarenakan rendahnya aktivitas enzim yang mampu mendegradasi fitat di saluran pencernaan. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan enzim fitase mampu mendegradasi asam fitat dengan baik. Pada beberapa tahun terakhir, enzim fitase sangat intensif diteliti dan menjadi enzim yang mempunyai nilai komersial tinggi. Hal ini disebabkan oleh kemampuan mereduksi senyawa fitat dalam rangsum makanan ternak. Fitase dapat dijumpai pada mikroorganisme seperti kapang, yeast dan</p>	<p><b>Hasil</b></p> <p>Desain primer diawali dengan pengunduhan sekuens gen fitase (<i>no. accession</i> XP_016274299.1) yang dihasilkan oleh <i>Rhodotorula toruloides</i> NP11 dari GenBank melalui <i>platform</i> NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>) <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>. Penelusuran sekuens gen fitase diperoleh dari kerabat terdekat <i>Rhodoturula Mucilaginosa</i>. Sekuens genom DNA <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> diunduh menggunakan situs <i>European Nucleotide Archive</i> (<a href="https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home">https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home</a> ) dengan kode nomor akses RZHN01000000. Sekuens gen fitase (<i>no. accession</i> TNY23137.1) dari <i>putative phytase</i> dan sekuens genom <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> dilakukan analisis komparatif antara kedua sekuens dengan menggunakan website dari <i>platform</i> Galaxy (<a href="https://usegalaxy.org/">https://usegalaxy.org/</a> ). Hasil <i>putative gene</i> antara gen fitase dengan <i>genomic DNA Rhodotorula mucilaginosa</i> digunakan sebagai kandidat model desain primer yang akan dibuat Hasil analisis komparatif menggunakan <i>platform</i> Galaxy yang telah dilakukan antara sekuens gen fitase dan sekuens <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> menunjukkan hasil dengan parameter yang baik. Desain primer dilakukan dengan menggunakan website <i>PrimerBLAST</i> (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi</a>) dengan memasukkan <i>putative gene</i> fitase yang telah dipilih dan dengan mengatur parameter yang diinginkan (Tabel 3). Hasil analisis <i>PrimerBLAST</i> didapatkan 5 pasang kandidat primer yang baik, akan tetapi dari 5 kandidat primer tersebut didapatkan dua kandidat utama yang sesuai dengan parameter</p>

bakteri, baik fitase ekstraseluler maupun intraseluler (Sajidan, 2017)

Salah satu jenis mikroorganisme dari kelompok yeast yang telah dilaporkan potensial menghasilkan enzim fitase adalah *Rhodotorula mucilaginosa* (Rattada et al, 2021). Rattada dkk melaporkan *Rhodotorula mucilaginosa* optimum menghasilkan enzim fitase pada kondisi pH 4 dengan suhu inkubasi 40 °C. Bahkan (Yu et al, 2015) melaporkan *Rhodotorula mucilaginosa* strain JMUY14 berhasil diisolasi dari sedimen laut dalam antartika menghasilkan enzim fitase yang mampu beradaptasi pada suhu dingin (cold-adapted phytase).

Produksi enzim fitase dari strain liar mempunyai beberapa kelemahan yaitu selain produk yang dihasilkan sedikit, protein yang dihasilkan juga bercampur dengan protein non-target. Pendekatan rekayasa genetika memberikan kelebihan pada produksi skala industri yaitu diantaranya dapat dilakukan overekspresi dengan menginduksi dengan induser, menambahkan fusi protein untuk proses pemurnian dan dapat menghindari bakteri patogen sebagai sumber enzim dengan mengkloning gen penyandi protein target ke sel inang. Untuk itu, peneliti tertarik melakukan penelitian tentang deteksi dan pengklonan gen penyandi fitase dari *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 sehingga menghasilkan fitase rekombinan yang dapat diproduksi dalam skala pabrik percobaan (*pilot plant*).



#### Metode

yang diinginkan dalam desain primer yaitu terdapat pada *pair* 1 dan *pair* 5.

Pasangan primer 1 dan primer 5 dipilih sebagai primer yang akan digunakan untuk deteksi gen fitase pada yeast *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 dengan masing – masing primer 1 (kode primer FitAF sekuens 5’-TTTCCCCTGACCGAATGAAC-3’ dan FitAR sekuens 5’-CCATACTTTGCCCTGAACGA-3’) dengan ukuran 502 bp dan primer 5 (kode primer FitaseF sekuens 5’-CCCTGACCGAATGAACCTCT – 3’ dan FitaseR sekuens 5’-GGTCGTTGCCCTTCTTCA-3’) dengan ukuran 525 bp dengan rata – rata panjang sekuens 20 bp (Gambar 3). Dalam mendesain primer yang baik suhu  $T_m$  yang baik berkisar antara 40 – 60 °C.

Validasi dan optimasi difokuskan pada primer primer 1 dan primer 5 dengan hasil validasi primer 1 menunjukkan sekuens forward terdapat potensi *self dimer* dengan  $\Delta G$  sebesar -4,52 namun tidak terbentuk hairpin. Sedangkan sekuens reverse tidak ada potensi terbentuknya *self dimer* dan *hairpin*, namun primer ini berpotensi terjadi *cross dimer* dengan  $\Delta G$  sebesar -4,52. Hasil analisis didapatkan primer 1 layak digunakan dalam deteksi gen fitase. Sedangkan primer 5 berdasarkan analisis parameter menunjukkan sekuens forward dan reverse tidak terdapat *self dimer* dan *hairpin*, akan tetapi berpotensi terjadi *cross dimer* dengan  $\Delta G$  sebesar -6,47.

Hasil isolasi DNA selanjutnya dilakukan pengukuran kemurnian dan

### Prekultur dan Isolasi DNA *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20

Isolat aktif *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 dibuat prekultur dalam erlenmeyer 300 mL yang mengandung 100 mL medium cair PDY (*Potato Dextrose Yeast*) dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 3 hari dalam *shaking waterbath* dengan kecepatan 120 rpm. Pelet yeast diambil untuk diisolasi DNANYa. Isolasi DNA selanjutnya mengikuti prosedur standar *Presto mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid).

### Desain Primer Spesifik Gen Fitase

Selain menggunakan primer yang sudah dipublikasikan (Tabel 2), primer spesifik gen fitase didesain berdasarkan dari hasil penelusuran sekuens gen fitase yang ada di GenBank melalui situs online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Analisis sekuens komperatif menggunakan (<https://usegalaxy.org/>). Desain primer menggunakan *PrimerBLAST*, pengecekan parameter primer menggunakan *Netprimer*, dilakukan PCR in silico menggunakan SnapGene 6.1.1 untuk memastikan hasil produk PCR yang diharapkan melalui situs (<https://www.snapgene.com>)

### Optimasi Primer untuk Deteksi Gen Fitase dengan Metode PCR

Deteksi gen fitase dari DNA genom yeast *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 diamplifikasi menggunakan primer spesifik gen (Tabel 2) dengan 25 µL total reaksi PCR yang mengandung 1 µL DNA genom 30 µg/mL, 12.5 µL PCR Master Mix 2x (*Thermo Scientific*), 1 µL masing-masing primer 10 µM, 9.5 µL ddH<sub>2</sub>O. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 32 siklus menggunakan Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem). Kondisi PCR

kosentrasi masing – masing DNA menggunakan Nanoquant (*TECAN Multimode Reader*). Tujuan pengukuran ini untuk membandingkan ekstrak DNA dalam satuan nano gram per satu mikroliter pada panjang gelombang A260/280 (ng/µL) berdasarkan nilai absorbansi. Nilai absorbansi berguna untuk mendeteksi kontaminan seperti protein, garam dan polisakarida yang dapat menghambat amplifikasi DNA (Kurniawati dan Hartati, 2018). Rasio pada pembacaan panjang gelombang 260/280 nm sebesar 1,8 menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi dengan tidak adanya protein dan fenol (Latif dan Osman, 2017). Hasil pengukuran kemurnian DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* Galur PK-S20 menunjukkan kemurnian yang baik dengan rasio A260/280 dengan 3 kali ulangan sampel sebesar (1,82), (1,84) dan (2,04) dengan kosentrasi berturut (3,1 ng/ µl), (8,1 ng/ µl) dan (5,5 ng/ µl) (Tabel 4). Rasio  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  dengan rentang mulai dari 1,8 hingga 2,0 tidak menunjukkan adanya kontaminasi yang signifikan. Jika nilainya kecil dari 1,8 kemungkinan adanya kontaminasi protein. Kemungkinan kontaminasi protein disebabkan RNA kecil, karena sampel umumnya telah diperlakukan dengan RNAase yang akan menghancurkan RNANYa (Pervaiz et al., 2015).

### Optimasi primer Spesifik Gen Fitase dengan PCR Gradien

Optimasi primer spesifik gen fitase dengan perlakuan suhu *annealing* (Ta) yang berbeda -beda agar primer dapat menempel dengan baik pada template DNA (gen fitase) pada genom *Rhodotorula mucilaginosa* PK-S20. Suhu *annealing* (Ta) yang digunakan dalam optimasi ini dengan range 52, 54, 56, 58 dan 60 (°C). Amplifikasi gen menggunakan 2

adalah pra-denaturasi dilakukan selama 5 menit pada suhu 95°C sebanyak satu kali, denaturasi 95°C selama 60 detik, penempelan primer pada suhu 61°C selama 60 detik, dan pemanjangan pada 72°C selama 60 detik sebanyak 30 siklus. Pada siklus pasca-PCR dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit

### **Kloning Gen Fitase dalam Plasmid pGEM-T Easy**



Produk PCR gen fitase dalam gel agarose yang mengandung fragmen DNA dipotong dari gel dan dipindahkan ke tabung mikro, DNA dipurifikasi dari gel dengan *Quick Gel Purification Kit (Geneaid)*. Fragmen DNA diligasikan ke dalam vektor pGEM-T Easy (Promega) dengan total volume reaksi 10 µL dengan mencampurkan 5 µL 10x *Fast-Link Ligation Buffer*, 1 µL pGEM-T Easy 0.5 µg/µL, 3 µL PCR produk gen fitase dan 1 µL *Fast-Link DNA Ligase 2 U/µL*, pada suhu ruang selama 1 jam. Untuk hasil yang lebih baik, tambah inkubasi selama 1 malam pada suhu 4 °C (suhu kulkas). Hasil ligasi dimasukkan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5α dengan metode *Heat Shock*

Plasmid pGEM-T Easy rekombinan (pGEM-TFitA) dijadikan sebagai template DNA untuk deteksi gen fitase menggunakan primer FitAF/FitAR. Hasil PCR menunjukkan pita DNA dengan ukuran ± 500 bp berhasil teramplifikasi (Gambar 11). Ukuran ini sesuai dengan gen fitase pada genom *Rhodotorula mucilaginosa* PK-S20 dengan primer FitAF/FitAR. Namun tidak semua plasmid rekombinan koloni yang membawa gen sisipan, dari 10 koloni transforman yang diujikan (K1- K8: Koloni putih, K9-K10: Koloni biru) dimana 8 koloni putih dan 2 koloni biru. Akan tetapi hanya 4

pasang primer spesifik FitAF/FitAR dan FitaseF/FitaseR yang telah di desain dengan nilai  $T_m$  (*temperature melting*) antara 58 – 59 °C. Kedua pasang primer yang digunakan mampu mendeteksi gen fitase dengan terbentuknya pita DNA yang berhasil teramplifikasi dengan jelas dan tebal pada ukuran ± 500 bp pada semua suhu *annealing* yang gunakan. Namun primer FitaseF/R pada suhu *annealing* ( $T_a$  58 °C) menghasilkan pita DNA yang tipis, sedangkan pada suhu *annealing* ( $T_a$  60 °C) tidak ada pita yang dihasilkan. Optimasi juga dilakukan pada 2 pasang primer *PhyF/PhyR* dan *FiF/FiR* yang sudah dipublikasikan sebelumnya (Tabel 2) untuk melihat kemampuan optimum dari suhu *annealing* ( $T_a$ ). menggunakan desain primer dengan ketentuan suhu *annealing* yang disesuaikan dengan kebutuhan masing-masing penelitian dapat mengurangi bias pada hasil penelitian. Suhu *annealing* ( $T_a$ ) dan jumlah siklus PCR yang digunakan sama dengan reaksi sebelumnya (Primer FitA/Fitase) yaitu 52, 54, 56, 58 dan 60 (°C) dengan 35 siklus PCR. Hasil amplifikasi menunjukkan pasangan primer *FiF/FiR* tidak spesifik pada gen target, dengan terbentuknya banyak pita DNA dengan berbagai ukuran dan tidak spesifik pada ukuran gen target yaitu ± 500 bp pada semua kondisi suhu *annealing* kecuali pada  $T_a$  52 °C tidak ada pita DNA yang dihasilkan.

### **Kloning Gen Fitase**

Pita DNA tunggal dengan ukuran ± 500 bp. Fragmen DNA gen fitase tersebut di ligasikan ke dalam vektor pGEM-T Easy dengan pendekatan *TA-Cloning*. Ada tiga metode yang bergantung pada ligase yang digunakan untuk ligasi kovalen sisipan DNA ke vektor plasmid yaitu ligasi ujung tumpul, ligasi ujung kohesif, dan *TA-cloning*. *TA-*

<p>koloni yang membawa gen fitase yaitu K1, K2, K4 dan K5, namun pada K4 dan K5 pita DNA tidak spesifik karena muncul pada ukuran selain target.</p>	<p><i>Cloning</i> berbasis vektor-<i>Toverhang</i> telah banyak digunakan untuk kloning gen tunggal dan konstruksi perpustakaan DNA</p> <p>Hasil ligasi ditransformasikan kedalam sel <i>Escherichia coli</i> DH5<math>\lambda</math> yang sebelumnya sudah dibuat kompeten selnya. Pembuatan sel <i>E. coli</i> DH5<math>\lambda</math> menggunakan gliserol 10% dengan kondisi OD (<i>optical density</i>) mencapai 0,8 dengan tujuan sel lebih permeable dan mampu menerima DNA asing. Transformasi dilakukan secara metode <i>heat shock</i> berdasarkan Sambrook et al, (2001). Hasil transformasi disebar pada media LB+<i>Xgal</i>+<i>IPTG</i> +<i>Amp</i> (100<math>\mu</math>g/mL), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil transformasi menunjukkan koloni dapat tumbuh baik pada media LB +<i>Xgal</i>+<i>IPTG</i> <i>ampicillin</i> (100<math>\mu</math>g/mL), yang di tandai dengan koloni biru dan putih namun efisiensinya masih rendah karena hanya beberapa klon rekombinan yang muncul. Hal ini dapat dilihat pada klon rekombinan hasil tranformasi gen fitase <math>\pm</math> 150 koloni yang didominasi koloni berwarna biru dan hanya <math>\pm</math> 12 koloni bewarna putih.</p>
<p> <b>Kesimpulan</b></p> <p>Deteksi gen fitase pada yeast <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Galur PK-S20 secara molekuler telah berhasil dilakukan dengan mendesain 2 pasang primer spesifik yaitu FitAF/R dan FitaseF/R yang mampu mengampifikasi gen parsial fitase dengan ukuran <math>\pm</math> 500 bp. Fragmen ini telah diligasikan kedalam pGEM-T <i>Easy</i> dan telah berhasil di transformasikan ke dalam sel <i>E. coli</i> DH5<math>\lambda</math> yang ditandai dengan koloni putih dan biru. Hasil validasi PCR koloni dari klon rekombinan menggunakan primer FitAF/R menghasilkan pita DNA sesuai dengan ukuran gen target, akan tetapi verifikasi</p>	<p> <b>Ucapan terimakasih</b></p> <p>Terima Kasih kepada LPPM Universitas Esa Unggul yang telah mendanai penelitian ini, Dalam Hibah Internal 2022. Laboratorium Terpadu Fikes dalam yang telah memfasilitas agar penelitian berjalan lancar. Serta mahasiswa Bioteknologi yang turut membantu dalam penelitian ini.</p>

dengan menggunakan enzim restriksi tidak menghasilkan potongan fragmen DNA	
--	--

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agus, R. and Fahrudin, F., 2017. Ligasi Gen Rv 1980c Pengkode Protein MPT 64 KE pGEM-T Mycobacterium tuberculosis Sebagai Antigen untuk Immunodiagnostik Tuberkulosis Laten. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 8(1).
- Budiani, A., 2014. Ekspresi gen penyandi ACCase subunit biotin karboksilase dari mesokarp buah kelapa sawit pada *Escherichia coli* Expression of gene encoding ACCase subunit biotin carboxylase from oil palm fruit mesocarp in *Escherichia coli*. *Menara Perkebunan*, 82(1).
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). Biomolecular Detection and Quantification qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14(March), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Casali, N. and Preston, A. eds., 2003. *E. coli* plasmid vectors: methods and applications (Vol. 235). Springer Science & Business Media
- El-Ziney, M. G., Zaid, E. A. A. and El-Naggar, M. Y. (2018) ‘Characterization of carotenogenic rhodotorula strains isolated from delta region, Egypt and their potential for carotenoids production’, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), pp. 587–599. doi: 10.22207/JPAM.12.2.17.
- Fernanda, S., Abinawanto, A. and Helianti, I. (2020) ‘Cloning gene encoding lysophospholipase from *Bacillus halodurans* CM1 to *Escherichia coli* DH5α’, *Journal of Physics: Conference Series*, 1442(1), pp. 6–11. doi:10.1088/1742-6596/1442/1/012067.
- Gadanho, M. and Sampaio, J. P. (2002) ‘Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov.’, *FEMS Yeast Research*, 2(1), pp. 47–58. doi: 10.1016/S1567-1356(01)00062-9.
- Gessler, N. N. *et al.* (2018) ‘Phytases and the Prospects for Their Application (Review)’, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(4), pp. 352–360. doi: 10.1134/S0003683818040087.
- Hidayatullah, M. E. *et al.* (2020) ‘Biochemical Characterization Of Recombinant Phytase Enzyme (Phyk) From *Klebsiella* Sp. Asr1 Encapsulated With Alginate’, *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 7(1), pp. 105–113. doi: 10.29122/jbbi.v7i1.2997.
- Irazusta, V. *et al.* (2012) ‘Proteomic study of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 under copper stress’, *BioMetals*, 25(3), pp. 517–527. doi: 10.1007/s10534-012-9531-0.
- Mardalisa., Suhandono, S., Yanti, N., Rozi, F. and Nova, F., 2021. Bioinformatic analysis in designing mega-primer in overlap extension PCR cloning (OEPC) technique. *JOIV: International Journal on Informatics Visualization*, 5(2), pp.139-143.
- Megléc, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R. and Martin, J.F., 2014. QDD version 3.1: A user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: Experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), pp.1302-1313.
- Moelhard C. 2007. *Molecular Biology and Genomics, The Experimenter Series*. California (US): Elsevier Academic Press.

- Mullaney, E.J. and Ullah, A.H., (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and biophysical research communications*, 312(1), pp.179-184.
- Nagahama, T. (2006) 'Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments', *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, pp. 241–262. doi: 10.1007/3-540-30985-3\_12.
- Nair, R. R. *et al.* (2021) 'Sizing, stabilising, and cloning repeat-expansions for gene targeting constructs', *Methods*, 191(July 2020), pp. 15–22. doi: 10.1016/j.ymeth.2020.07.007.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. New York (US): Cold Spring Harbor.
- Santoso, T. J., Hidayat, S. H., Herman, M., & Sudarsono (2015). Aplikasi Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) Menggunakan Primer Degenerate dan Spesifik Gen AV1 Untuk Mendeteksi Begomovirus Pada Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 4(3), 140.
- Seprianto. *et al.* (2016) 'Cloning Of A Transglutaminase Gene From *Streptomyces thioluteus* TTA 02 SDS 14', *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 11(1), pp. 31–36.
- Seprianto, S. and Wahyuni, F.D., 2018. Analisis Bioinformatika Gen Potensial Penyandi HalichondrinB Dari Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(2), pp.57-66.
- Seprianto, F. D. W., Saraswati, H., & Praptiwi, R. A. (2020). In Silico Analysis for Detection of CryII Gene from Local Isolates of *Bacillus thuringiensis*. In *Proceedings of the 1st International Conference on Health (ICOH 2019)*, 127-132
- Sharma, N. *et al.* (2020) 'Phytase producing lactic acid bacteria: Cell factories for enhancing micronutrient bioavailability of phytate rich foods', *Trends in Food Science and Technology*, 96, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.tifs.2019.12.001.
- Singh, B. *et al.* (2020) 'Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition: A review', *Pedosphere*, 30(3), pp. 295–313. doi: 10.1016/S1002-0160(20)60010-8.
- Sriram P, Sampali B, Naganath M. 2011. *Screening of bacterial recombinants: Strategies and preventing false positives, molecular cloning-selected applications on Medicine and biology*. Shanghai (CN): Gregory Brown (Ed.):InTech. hlm:8.