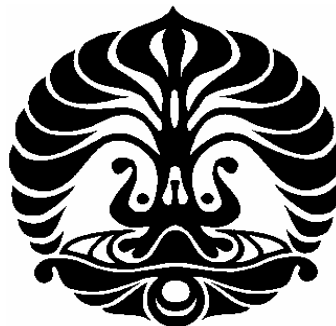


**OPTIMASI DAN IDENTIFIKASI GEN PENYANDI FRUKTANSUKRASE  
DARI KOLEKSI ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL  
EKSOPOLISAKARIDA DENGAN METODE  
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

**ADINDA HENING PRAMESWARI**

**0305050027**



**DEPARTEMEN FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS INDONESIA  
DEPOK  
2010**

**OPTIMASI DAN IDENTIFIKASI GEN PENYANDI FRUKTANSUKRASE  
DARI KOLEKSI ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL  
EKSOPOLISAKARIDA DENGAN METODE  
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**Oleh :**

**ADINDA HENING PRAMESWARI**

**0305050027**



**DEPOK**

**2010**

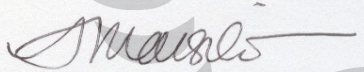
SKRIPSI : OPTIMASI DAN IDENTIFIKASI GEN PENYANDI  
FRUKTANSUKRASE DARI KOLEKSI ISOLAT BAKTERI  
ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA  
DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION

NAMA : ADINDA HENING P

NPM : 0305050027

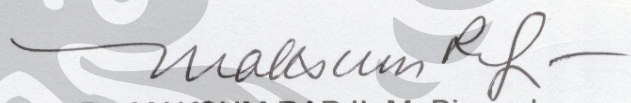
SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010



Dr. AMARILA MALIK, MSi

PEMBIMBING I



Dr. MAKSUM RADJI, M. Biomed

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sarjana: 11 Januari 2010

Penguji I : Dra. Juheini, MS

Penguji II : Dra. Azizahwati, MS

Penguji III : Dr. Herman S, MS

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus atas segala berkat dan penyertaan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si, selaku pembimbing I dan pembimbing akademis, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Bapak Dr. Maksun Radji, M.Biomed, selaku pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, ilmu, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga penulis dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.

4. Seluruh Staf pengajar, karyawan, laboran Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi.
5. Kedua orang tua dan kedua kakak penulis yang selalu memberikan dukungan baik moril maupun materiil.
6. Teman-teman Farmasi angkatan 2005 atas persahabatan, kekompakan, dan dukungan kepada penulis.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikannya skripsi ini.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis

2009

## ABSTRAK

Eksopolisakarida (EPS) telah banyak diteliti dapat diaplikasikan dalam bidang industri makanan, kesehatan, dan farmasi. Beberapa bakteri asam laktat (BAL) memiliki kemampuan menghasilkan EPS dengan adanya enzim sukrase, baik glukansukrase/ glukosiltransferase (*gtf*) maupun fruktansukrase/ fruktosiltransferase (*ftf*). Glukansukrase menghasilkan EPS berupa polimer glukana, sedangkan fruktansukrase menghasilkan polimer fruktan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi adanya gen *ftf* penyandi fruktansukrase dari beberapa galur BAL yang diduga memiliki aktivitas fruktansukrase berdasarkan penelitian menggunakan metode visual. Skrining gen tersebut secara molekuler dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer *degenerate* yang berasal dari dua sekuens *conserved region* gen *ftf* beberapa galur BAL. Galur BAL yang digunakan untuk konstruksi primer adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, dan *Lb. reuteri* 121. Amplikon berukuran sekitar 700 pb dihasilkan oleh 7 dari 21 DNA genomik dari galur yang digunakan, yaitu MBF PDG 3(1), MBF PDG 4, *Weissella cibaria* MBF WRS 3, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 4-2, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 7-5, *Weissella confusa* MBF PDG 10(1), dan *Leuconostoc mesenteroides* MBF WRS 6.

Kata kunci: bakteri asam laktat, eksopolisakarida, fruktansukrase, PCR

xi + 70 hlm.; gbr.; tab.

Bibliografi: 50 (1972-2009)



## ABSTRACT

Studies on exopolysaccharides (EPS) have been done widely for its application in food, health, and pharmaceutical industries. Several lactic acid bacteria (LAB) have abilities to produce EPS with the presence of sucrose enzyme, that is glucansucrase/glicosyltransferase (*gtf*) or fructansucrase/fructosyltransferase (*ftf*). Glucansucrase synthesizes glucan polymers, while fructansucrase synthesizes fructan polymers. This study aimed to identify *ftf* genes encoding fructansucrase enzymes from several LAB isolates considered having fructansucrase activity based on study using visual inspection method. The molecular screening was done performing Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using *degenerate* primers constructed from two of the conserved regions of *ftf* gene from several LAB strains. The strains used for the primers construction are *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, and *Lb. reuteri* 121. An approximately 700 bp amplicons were exhibited from 7 out of 21 genomic DNA, those are MBF PDG 3(1), MBF PDG 4, *Weissella cibaria* MBF WRS 3, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 4-2, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 7-5, *Weissella confusa* MBF PDG 10(1), dan *Leuconostoc mesenteroides* MBF WRS 6



Keywords : exopolysaccharide, fructansucrase, lactic acid bacteria, PCR

xi + 70 pages ; figures ; tables

bibliography : 50 (1972-2009)



## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN .....	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	
A. Bakteri Asam Laktat (BAL).....	4
B. Eksopolisakarida.....	5
C. Fruktansukrase.....	7
D. Ekstraksi DNA.....	9
E. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	10
F. Elektroforesis Gel Agarosa.....	16
BAB III. BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA .....	
A. Lokasi Penelitian.....	19

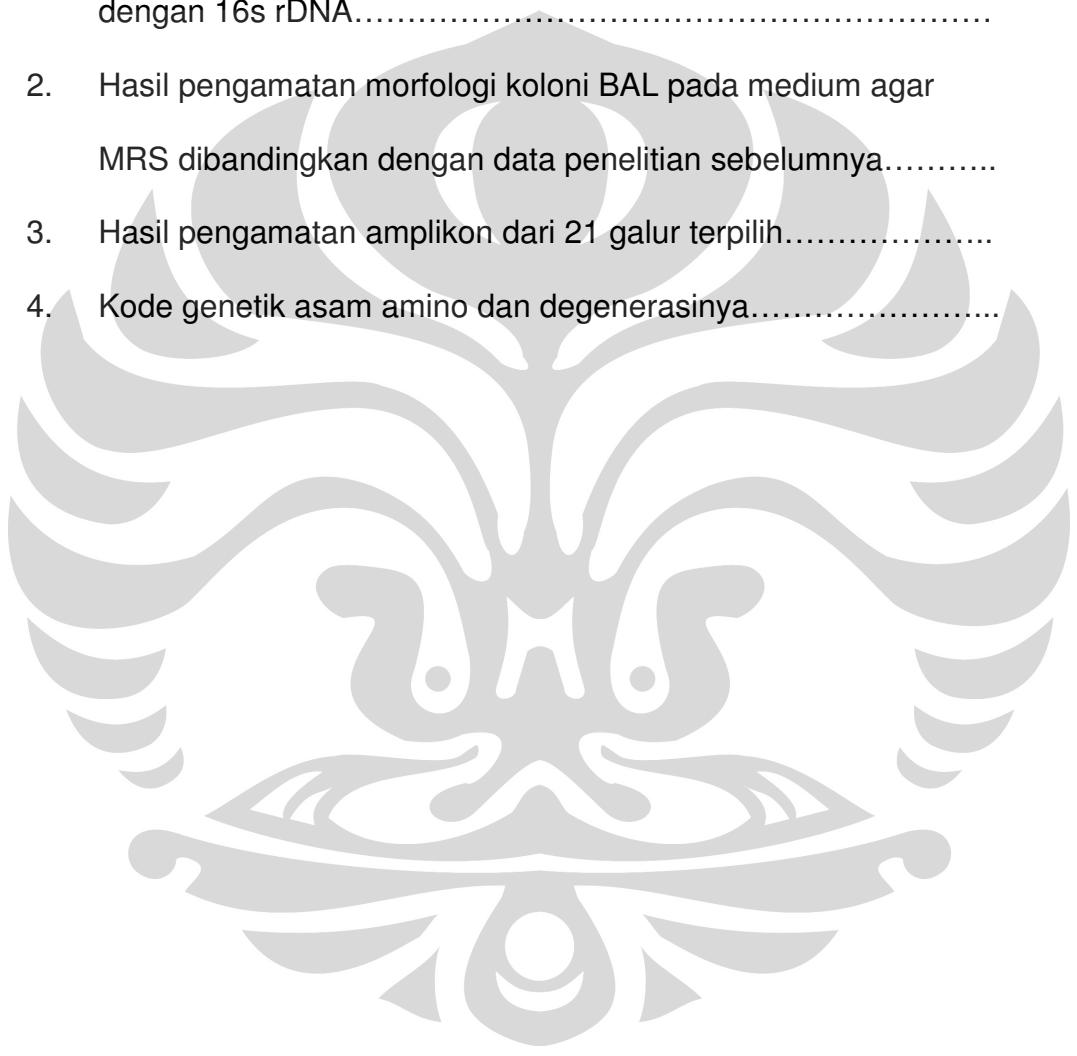
B. Bahan.....	19
C. Alat.....	20
D. Cara Kerja.....	21
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	
A. Hasil.....	29
B. Pembahasan .....	30
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	
A. Kesimpulan .....	40
B. Saran .....	40
<b>DAFTAR ACUAN</b> .....	41

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Koloni tunggal beberapa galur BAL.....	47
2. Mikrosentrifus berpendingin.....	48
3. Mikrosentrifus Mini Spin .....	48
4. <i>Thermal Cycler</i> .....	49
5. Alat elektroforesis gel mini.....	49
6. <i>UV transilluminator</i> yang terhubung dengan komputer.....	50
7. 1 Kb Plus DNA Ladder.....	51
8. Gene Ladder 100.....	51
9. Hasil ekstraksi DNA genomik galur BAL.....	52
10. Hasil optimasi PCR menggunakan galur BAL MBF 7-5.....	53
11. Hasil identifikasi gen <i>ftf</i> pada koleksi galur BAL penghasil EPS dengan menggunakan primer <i>degenerate</i> .....	54
12. Skema siklus amplifikasi PCR pada DNA gen target.....	55

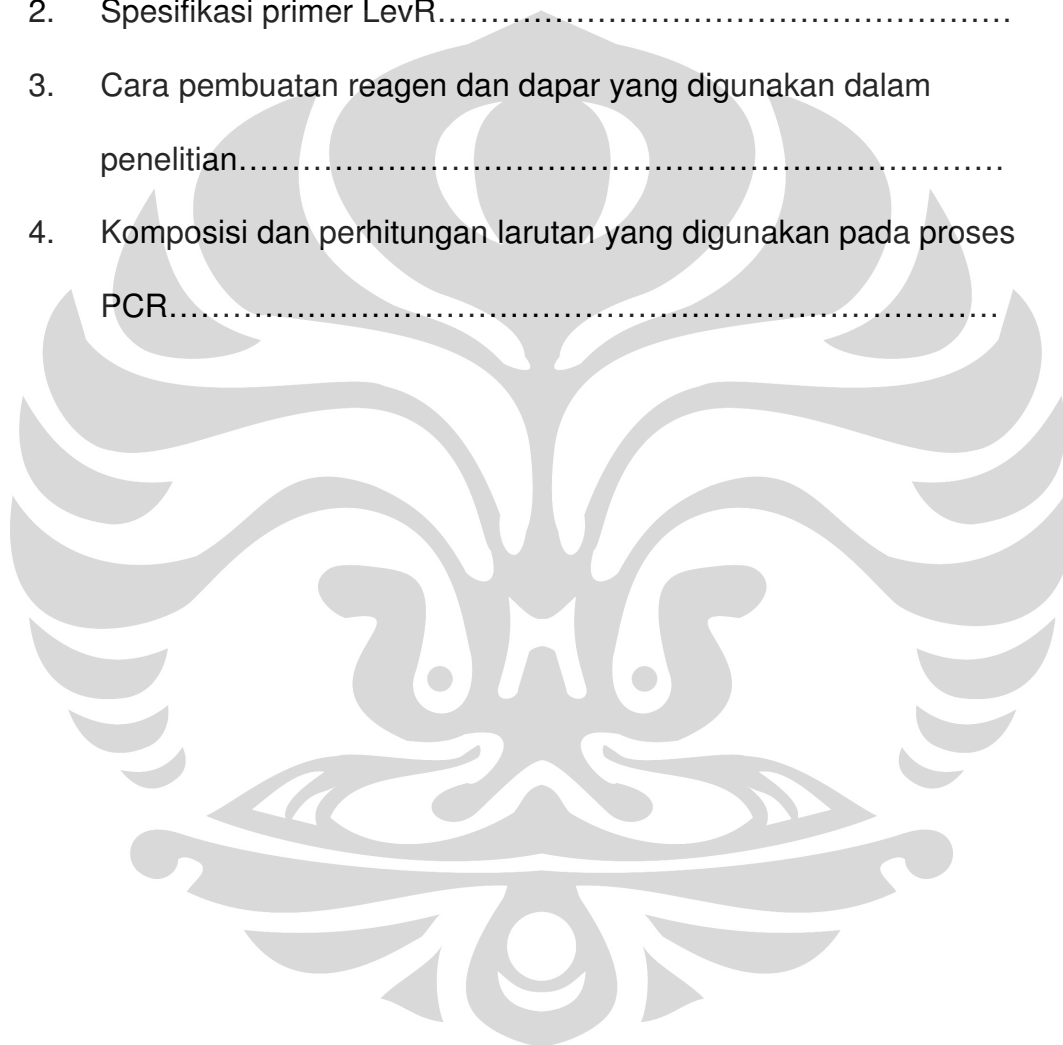
## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Daftar galur yang sudah teridentifikasi secara molekuler dengan 16s rDNA.....	57
2. Hasil pengamatan morfologi koloni BAL pada medium agar MRS dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya.....	59
3. Hasil pengamatan amplikon dari 21 galur terpilih.....	60
4. Kode genetik asam amino dan degenerasinya.....	61



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Spesifikasi primer LevV.....	63
2. Spesifikasi primer LevR.....	64
3. Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian.....	65
4. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses PCR.....	69



# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Eksopolisakarida (EPS) telah banyak diteliti dan dari hasil penelitian tersebut ditemukan bahwa EPS dapat digunakan dalam industri makanan dan kesehatan. Dalam industri makanan misalnya, EPS digunakan sebagai pengental, emulgator, surfaktan, stabilisator, pembentuk tekstur, dan juga sebagai pengganti lemak (1, 2, 3, 4).

Dalam industri kesehatan, EPS, dalam hal ini inulin, digunakan sebagai stabilisator protein terapeutik (5) dan juga sediaan nanopartikel bersalut polietilen glikol (PEG) (6). Protein terapeutik dalam produksinya dibutuhkan dalam keadaan kering yang dapat tercapai dengan *freeze drying*, *evaporative drying*, atau *spray drying*. Dalam proses pengeringan tersebut dapat terjadi penurunan aktivitas protein, sehingga untuk mencegah keadaan tersebut dibutuhkan zat pelindung protein. Dari literatur diketahui bahwa gula dapat melindungi protein selama proses pengeringan dan juga penyimpanan setelahnya (5).

Bakteri asam laktat (BAL), bakteri dengan status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), adalah bakteri yang berpotensi untuk memproduksi EPS. EPS yang dihasilkan dapat berupa homopolisakarida, contohnya glukukan dan fruktan, atau pun heteropolisakarida. Produksi glukukan dan fruktan pada BAL melibatkan enzim-enzim sukrase, yaitu glukosiltransferase (GTF) atau

glukansukrase dan fruktosiltransferase (FTF) atau fruktansukrase. Glukansukrase antara lain terdiri dari dekstransukrase yang mensintesis dekstran, mutansukrase yang mensintesis mutan, alternansukrase yang mensintesis alternan, dan reuteransukrase yang mensintesis reuteran (7,8). Fruktansukrase terdiri dari levansukrase yang mensintesis levan, dan inulosukrase yang mensintesis inulin.

Keuntungan produksi EPS dari BAL adalah karena BAL mudah diperoleh, contohnya dari kuah asinan campur, kuah es sekoteng, tanah yang mengandung limbah susu, susu kedelai, ampas tahu padat, ampas kecap (9), es cendol, cincau, bajigur, tape ketan, es podeng, puli, es buah, wedang ronde, dan gatot (10). Produksi EPS juga dapat direkayasa, contohnya dengan merekayasa substrat. Enzim membutuhkan substrat spesifik untuk dapat bekerja. Rekayasa substrat, misalnya dengan mengatur komposisi substrat, dapat memicu aktivitas katalisis enzim dalam sintesis produk reaksi yang diinginkan. (11).

Identifikasi gen *fff* pada BAL pada penelitian sebelumnya tidak berhasil memperoleh ampikon dikarenakan ukuran produk *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang diperoleh sangat kecil, yaitu 234 pasang basa (pb) (12), sehingga mudah terurai oleh nuklease selama proses selanjutnya (A. Malik; data belum diublikasikan). Primer yang digunakan pada penelitian tersebut adalah 5FTF (5'-GAYGTNTGGGAYWSNTGGGCC-3') dan 6FTFi (5'-GTNGCNSWCCNSWCCAYTSYTG-3'). Berdasarkan informasi tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan identifikasi gen *fff* dari koleksi BAL



dengan primer yang berbeda. Identifikasi dilakukan dengan metode molekuler menggunakan PCR dengan ukuran fragmen yang dihasilkan lebih besar dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu diperkirakan 800 pb (13).

Galur BAL yang diidentifikasi dalam penelitian ini adalah galur-galur yang telah diketahui kemungkinan membawa gen *fff* dari penelitian sebelumnya menggunakan metode pengamatan visual dengan substrat spesifik (data belum dipublikasikan). Identifikasi dengan metode molekuler menggunakan PCR lebih spesifik daripada menggunakan metode konvensional, karena pada proses PCR yang diidentifikasi adalah DNA genomik dimana primer yang digunakan adalah primer dengan sekuens spesifik (13).

## **B. TUJUAN PENELITIAN**

1. Memperoleh kondisi optimum PCR *degenerate* untuk pencarian gen *fff* pada BAL.
2. Mendapatkan galur-galur BAL yang membawa gen *fff* dari galur-galur BAL yang telah dilaporkan diduga mempunyai aktivitas fruktansukrase dari penelitian sebelumnya.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. BAKTERI ASAM LAKTAT**

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk golongan bakteri Gram positif yang umumnya non-motil, tidak bersporulasi, dan memproduksi asam laktat sebagai produk utama atau satu-satunya dari metabolisme fermentatif. BAL tumbuh pada keadaan anaerob tetapi tidak seperti bakteri anaerob pada umumnya. BAL disebut aerotoleran anaerob karena tidak sensitif terhadap oksigen dan dapat tumbuh dengan adanya atau tidak adanya oksigen (14).

Sebagian besar BAL hanya memperoleh energi dari metabolisme gula atau senyawa-senyawa yang dapat difermentasi, dengan demikian pertumbuhan BAL biasanya terbatas pada lingkungan dimana terdapat gula. BAL tidak memiliki kemampuan biosintesis sehingga harus memenuhi kebutuhan nutrisi dari lingkungannya (14).

Berdasarkan produk fermentasi yang dihasilkan, BAL dibedakan menjadi dua golongan, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. BAL golongan homofermentatif menghasilkan produk fermentasi tunggal yaitu asam laktat. Sedangkan BAL golongan heterofermentatif menghasilkan produk lain selain asam laktat, yaitu etanol, asam asetat, dan karbon dioksida (14, 15). Perbedaan produk hasil fermentasi tersebut ditentukan oleh adanya enzim-enzim yang berperan pada reaksi glikolisis. BAL golongan

homofermentatif memiliki aldolase, sedangkan golongan heterofermentatif memiliki fosfoketolase (14).

Beberapa genus BAL yang bersifat homofermentatif diantaranya adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, dan *Enterococcus*. Sedangkan genus yang bersifat heterofermentatif contohnya adalah *Leuconostoc*. Genus *Lactobacillus* ada yang bersifat homofermentatif maupun heterofermentatif (14).

BAL dapat berfungsi sebagai pengawet alami pada produk-produk fermentasi karena sifatnya yang menurunkan pH sebagai hasil dari produksi asam laktat, dan dalam beberapa kasus juga memproduksi antimikroba. BAL juga mempengaruhi rasa, tekstur, dan seringkali kelengkapan nutrisi dari produk (16).

## **B. EKSPOLISAKARIDA**

Eksopolisakarida (EPS) diproduksi secara umum oleh bakteri, mikroalga, dan lebih sedikit pada jamur dan khamir. EPS yang dihasilkan oleh mikroba adalah polisakarida ekstra sel yang menempel pada dinding sel membentuk kapsul atau disekresi ke lingkungan dalam bentuk lendir. Pada habitatnya, EPS melindungi sel mikroba dari kekeringan dan fagositosis (17). Berdasarkan komposisi dan mekanisme biosintesisnya, EPS bakteri dapat dibedakan menjadi dua, yaitu heteropolisakarida dan homopolisakarida (18).

Heteropolisakarida terdiri dari berbagai macam residu gula, terutama glukosa, fruktosa, galaktosa, dan ramnosa. Heteropolisakarida disintesis di

membran sitoplasma oleh glikosiltransferase. BAL adalah bakteri yang paling banyak memproduksi heteropolisakarida, di antaranya adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, dan *Lactococcus* (18).

Homopolisakarida hanya terdiri dari satu tipe residu glikopiranosil, yang dapat mengandung baik glukosa (polimer glukukan) maupun fruktosa (polimer fruktan) dengan berbagai macam tipe ikatan dan percabangan. Homopolisakarida disintesis di luar sel oleh sukrase yang jenisnya bergantung pada molekul donor, dan substrat yang menjadi akseptor (18).

EPS glukukan yang diproduksi oleh BAL dibedakan berdasarkan ikatan yang dimiliki. Dekstran adalah glukukan dengan ikatan  $\alpha$  (1→6) dengan beberapa percabangan pada posisi 2, 3, atau 4. Mutan adalah glukukan dengan ikatan  $\alpha$  (1→3). Alternan adalah glukukan yang memiliki ikatan  $\alpha$  (1→6) dan  $\alpha$  (1→3). Glukukan sangat bervariasi dalam hal tipe ikatan, percabangan, panjang rantai, dan berat molekul. Adanya perbedaan tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah media pertumbuhan, waktu inkubasi, konsentrasi sukrosa, dan adanya enzim yang mendegradasi polisakarida (16).

EPS fruktan dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan tipe ikatannya, yaitu levan dengan ikatan  $\beta$  (2→6), dan inulin dengan ikatan  $\beta$  (2→1). Levan digunakan secara luas dalam bidang industri kesehatan, farmasi, pertanian, dan makanan. Levan memiliki efek terhadap sel tumor yang berkaitan dengan modifikasi sel membran, termasuk perubahan permeabilitas sel, dan juga memiliki aktivitas antibakteri dan radioprotektif. Dilaporkan juga bahwa

levan dapat menghambat proliferasi sel otot (19). Dalam industri farmasi, levan dengan viskositas rendah dapat digunakan sebagai *binder* tablet. Dalam industri makanan, levan bertindak sebagai prebiotik untuk perubahan mikroflora usus, yang menguntungkan untuk diet (20).

Inulin digunakan sebagai stabilisator protein terapeutik (5) dan juga sediaan nanopartikel bersalut polietilen glikol (PEG) (6). Dari penelitian terhadap binatang, inulin diperkirakan bersifat antikarsinogenik (21). Inulin juga dikembangkan sebagai zat tambahan prebiotik dalam produk makanan. Inulin tidak dicerna oleh enzim pankreatik sehingga tersedia untuk metabolisme oleh mikroorganisme intestinal, terutama *Bifidobacteria* (13).

### **C. FRUKTANSUKRASE**

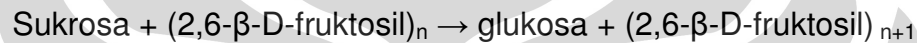
Sukrase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan sukrosa dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk membentuk polimer gula dari penggabungan unit gula. Sukrase terdiri dari glukansukrase (GTF) dan fruktansukrase (FTF) (18).

Glukansukrase dapat dibedakan menjadi beberapa enzim, yaitu (i) dekstransukrase yang mensintesis dekstran dengan ikatan glikosidik pada  $\alpha$ -(1→6); (ii) mutansukrase yang mensintesis mutan dengan ikatan glikosidik pada  $\alpha$ -(1→3); (iii) alternansukrase yang mensintesis alternan dengan ikatan glikosidik pada  $\alpha$ -(1→3) atau  $\alpha$ -(1→6); dan (iv) reuteransukrase yang mensintesis reuteran dengan ikatan glikosidik pada  $\alpha$ -(1→4),  $\alpha$ -(1→6) (8).

Fruktansukrase mengkatalisis transfer residu fruktosil dari sukrosa ke

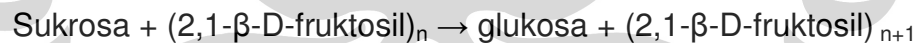
berbagai macam substrat sebagai akseptor. Reaksi yang dikatalisis dapat dibedakan menjadi dua reaksi berbeda, yaitu (i) transglukosilasi, bila substratnya adalah rantai fruktan, atau sukrosa, glukosa- dan fruktosakarida; dan (ii) hidrolisis sukrosa, bila substratnya adalah air. Berdasarkan tipe ikatan yang disintesis, fruktansukrase dibedakan menjadi levansukrase dan inulosukrase (22).

Levansukrase mengkatalisis sintesis levan dengan ikatan  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) dari sukrosa. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut (23),



Selain dari sukrosa, levan juga dapat disintesis dari trisakarida seperti raffinosa. Produk yang dihasilkan dari aktivitas katalisis levansukrase pada hidrolisis raffinosa adalah laktosa dan fruktosa bebas (24).

Inulosukrase mengkatalisis sintesis inulin dengan ikatan  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) dari sukrosa. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut,



Inulosukrase bekerja optimum pada pH 6,0-6,5 (23).

Fruktansukrase pada bakteri termasuk golongan glikosida hidrolase 68 (GH68), yang mengkatalisis reaksi transglukosilasi sukrosa, menghasilkan fruktooligosakarida atau polimer fruktan (25). Pada BAL terdapat kedua jenis fruktansukrase, yaitu levansukrase dan inulosukrase. Levansukrase pada BAL memiliki massa molekul yang lebih besar dari yang dimiliki oleh golongan bukan BAL, dan terdapat secara luas (8). Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, didapatkan bahwa inulosukrase terdapat pada

*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Streptococcus mutans*, dan *Leuconostoc citreum* (4, 26).

#### **D. EKSTRAKSI DNA**

DNA dapat diisolasi dari jaringan hidup, sel, partikel virus, atau pun sampel-sampel lain untuk tujuan analisis dan preparatif. Metode isolasi DNA bervariasi, namun pada prinsipnya adalah sama, yaitu diawali dengan pelisisan sel, dilanjutkan dengan ekstraksi, dan terakhir adalah pengendapan (27).

Sel dapat dilisis dengan menggunakan enzim, detergen, atau pun gaya mekanik. Setelah sel lisis, DNA baru dapat diekstraksi. Ekstraksi dapat dilakukan sekali atau berulang kali, tergantung dari tingkat kemurnian yang diperlukan. Fenol, kloroform, atau agen ekstraksi lain yang bersifat hidrofobik digunakan untuk memisahkan DNA dari protein dan komponen-komponen hidrofilik. Supernatan yang didapat kemudian ditambahkan alkohol dan garam dengan konsentrasi tinggi untuk mengendapkan DNA (27, 28).

Salah satu metode ekstraksi DNA adalah dengan menggunakan *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB), yaitu surfaktan kationik yang membentuk kompleks tidak larut dengan asam nukleat pada konsentrasi NaCl di bawah 0,5 M. Pada umumnya karbohidrat dan protein lain larut dalam kondisi tersebut, sehingga dengan demikian, DNA dapat diendapkan melalui proses sentrifugasi. Selanjutnya untuk melepas kompleks CTAB-DNA, dibuat kondisi dengan konsentrasi garam yang lebih tinggi, kemudian

ditambahkan etanol. CTAB lebih larut dalam etanol dibandingkan asam nukleat, sehingga kemudian dengan proses sentrifugasi CTAB akan berada pada supernatan, sedangkan DNA akan mengendap (29).

### **E. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

PCR adalah suatu metode enzimatik untuk mengamplifikasi atau melipatgandakan suatu fragmen DNA secara *in vitro*. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh seorang peneliti, yaitu Kary B. Mullis pada tahun 1985. Pada awalnya, metode ini hanya digunakan untuk mengamplifikasi molekul DNA. Namun karena sensitivitas PCR yang tinggi, metode ini juga dapat digunakan untuk identifikasi DNA (30).

Empat komponen utama yang diperlukan dalam proses PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan diamplifikasi; (2) dua primer oligonukleotida, yaitu suatu fragmen DNA berupa sekuens oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang berfungsi untuk menentukan daerah awal dan akhir dari DNA yang akan diamplifikasi; (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP, yang digunakan untuk membentuk DNA baru; dan (4) enzim DNA polymerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi sintesis DNA baru, biasanya digunakan *Taq polymerase* (30).

*Taq polymerase* adalah DNA polimerase yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*. Kelebihan enzim ini adalah bahwa enzim ini stabil pada



suhu tinggi yang diperlukan untuk memisahkan rantai DNA cetakan. *Taq polymerase* bekerja secara optimum pada temperatur 75-80°C (30).

Komponen-komponen lain yang juga penting dalam proses PCR adalah senyawa dapar dan ion magnesium. Dapar standar untuk PCR mengandung kalium klorida 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM, dan magnesium klorida 1,5 mM. Kalium klorida di atas konsentrasi 50 mM akan menghambat aktivitas *Taq polymerase* (28). Aktivitas *Taq polymerase* juga dipengaruhi oleh konsentrasi ion magnesium (30).

Proses amplifikasi pada PCR membutuhkan siklus berulang yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu (28, 30):

1. Denaturasi. Pada tahap ini DNA cetakan yang berutas ganda akan terpisah menjadi DNA utas tunggal. Proses denaturasi dilakukan dengan menaikkan temperatur reaksi sampai 95°C.
2. Pelekatan primer (*annealing*). Temperatur reaksi diturunkan hingga 37°C sampai 60°C. Pada tahap ini primer akan berlekatan dengan sekuens komplementernya pada DNA cetakan dengan membentuk jembatan hidrogen.
3. Polimerisasi. Temperatur reaksi dinaikkan hingga 72°C yang merupakan suhu optimum *Taq polymerase*. Pada tahap ini akan terjadi pemanjangan rantai DNA oleh enzim *Taq polymerase*.

## Optimasi PCR

Tidak ada satupun protokol PCR yang dapat diterapkan dalam segala kondisi. Setiap pengaplikasian PCR membutuhkan optimasi terlebih dahulu. Beberapa masalah yang sering terjadi adalah amplikon yang diharapkan tidak terdeteksi atau jumlahnya terlalu sedikit, adanya pita yang tidak spesifik akibat *mispriming* (kesalahan pemasukan primer) atau *misextension* (kesalahan pemanjangan primer) (31).

Beberapa parameter yang harus diperhatikan dalam optimasi PCR adalah konsentrasi enzim, konsentrasi magnesium, dNTP, komponen reaksi lain, pelekatan primer (primer *annealing*), pemanjangan primer (primer *extension*), waktu dan temperatur denaturasi, jumlah siklus, dan primer (31).

### 1. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim *Taq polymerase* yang direkomendasikan adalah antara 1-2,5 unit untuk 100  $\mu$ l reaksi ketika parameter-parameter lainnya sudah optimum. Konsentrasi yang lebih besar dari 4 unit dapat menyebabkan akumulasi amplikon non-spesifik, sedangkan konsentrasi kurang dari 1 unit dapat menyebabkan jumlah amplikon yang sedikit (32). Namun demikian konsentrasi enzim yang dibutuhkan dapat bervariasi tergantung dari target DNA atau primer yang digunakan. Optimasi dapat dilakukan dengan melihat hasil pemisahan amplikon pada gel elektroforesis. Jika konsentrasi enzim terlalu tinggi akan menghasilkan amplikon nonspesifik. Sedangkan jika

konsentrasi enzim terlalu sedikit akan menghasilkan jumlah ampikon yang sedikit pula (31).

## **2. dNTP**

Konsentrasi deoksiribonukleotida masing-masing antara 20-200  $\mu$ M menghasilkan keseimbangan optimum antara jumlah, spesifisitas, dan ketepatan. Keempat komponen dNTP harus memiliki konsentrasi yang ekuivalen untuk mengurangi terjadinya kesalahan penggabungan nukleotida. Konsentrasi dNTP kurang dari 1,5 mM meningkatkan spesifisitas dan ketepatan dalam proses PCR. Konsentrasi dNTP yang rendah dapat mengurangi terjadinya *mispriming* dan *misextension* (31).

## **3. Konsentrasi Magnesium**

Konsentrasi magnesium mempengaruhi pelekatan primer, temperatur pemisahan rantai baik pada DNA cetakan maupun pada ampikon, spesifisitas ampikon, pembentukan primer-dimer, serta aktivitas dan ketepatan enzim. *Taq polymerase* membutuhkan magnesium bebas untuk dapat berikatan dengan DNA cetakan, primer, dan dNTP. Sebaiknya pada proses PCR mengandung konsentrasi magnesium antara 0,5-2,5 mM di atas konsentrasi total dNTP. Selain konsentrasi, hal yang harus diperhatikan juga adalah adanya etilen diamin tetra asetat (EDTA) atau agen pengkhelat lain dalam larutan stok primer atau DNA cetakan karena dapat mengganggu konsentrasi optimum magnesium (31).

#### 4. Komponen Reaksi Lain

Dapar yang direkomendasikan untuk proses PCR adalah Tris-HCl 10-50 mM dengan pH antara 8,3-8,8. Campuran reaksi dapat mengandung kalium klorida hingga konsentrasi 50 mM untuk memfasilitasi pelekatan primer (31). Konsentrasi natrium klorida sebesar 50 mM atau kalium klorida di atas 50 mM dapat menghambat aktivitas *Taq polymerase* (30).

#### 5. Pelekatan Primer (*Primer Annealing*)

Temperatur dan waktu yang dibutuhkan untuk pelekatan primer bergantung pada komposisi basa, panjang, dan konsentrasi primer. Temperatur yang digunakan untuk pelekatan primer adalah 5°C di bawah titik lebur primer (31).

Temperatur pelekatan antara 55-72°C umumnya memberikan hasil terbaik. Pada konsentrasi primer sebesar 0,2 µM, pelekatan hanya membutuhkan waktu beberapa detik. Peningkatan temperatur pelekatan dapat menurunkan kemungkinan terjadinya *mispriming* dan *misextension* pada ujung 3' dari primer. Oleh karena itu, peningkatan temperatur pelekatan, terutama pada beberapa siklus awal, akan meningkatkan spesifisitas (31).

#### 6. Pemanjangan Primer (*Primer Extension*)

Waktu yang dibutuhkan untuk pemanjangan primer bergantung pada panjang dan konsentrasi dari sekuens target dan juga temperatur yang digunakan. Waktu pemanjangan selama 1 menit pada suhu 72°C dianggap

cukup untuk menghasilkan amplicon dengan panjang hingga 2kb. Namun demikian, waktu pemanjangan yang lebih lama pada siklus awal dapat berguna jika konsentrasi substrat sangat rendah serta pada siklus akhir ketika konsentrasi amplicon melebihi konsentrasi enzim (31).

## **7. Waktu dan Temperatur Denaturasi**

Kebanyakan penyebab gagalnya PCR adalah akibat tidak selesainya proses denaturasi dari DNA cetakan atau amplicon. Kondisi denaturasi yang biasa digunakan adalah pada temperatur 95°C selama 30 detik, atau 97°C selama 15 detik. Namun, temperatur yang lebih tinggi mungkin digunakan jika target mengandung banyak pasangan basa G-C (31).

Proses denaturasi yang tidak selesai memungkinkan DNA untuk berikatan kembali dan dengan demikian akan mengurangi jumlah amplicon. Sedangkan, tahap denaturasi yang terlalu lama dan/atau menggunakan temperatur yang terlalu tinggi dapat menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Waktu paruh aktivitas *Taq polymerase* adalah lebih dari dua jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada suhu 95°C, dan lima menit pada suhu 97,5°C (31).

## **8. Jumlah Siklus**

Jumlah siklus yang optimum terutama bergantung pada konsentrasi DNA cetakan ketika parameter-parameter lainnya sudah optimum. Kesalahan yang biasa terjadi adalah melakukan PCR dengan jumlah siklus yang terlalu banyak. Jumlah siklus yang terlalu banyak dapat meningkatkan jumlah dan

kompleksitas dari amplicon yang tidak spesifik. Namun, jumlah siklus yang terlalu sedikit juga dapat menyebabkan jumlah amplicon yang sedikit. Pada umumnya jumlah siklus pada PCR adalah sebanyak 20-30 siklus (30, 31). Pada tahap terakhir proses PCR, yaitu setelah siklus terakhir selesai, temperatur diturunkan menjadi 4°C sehingga enzim diasumsikan inaktif dan proses amplifikasi selesai.

### **9. Primer**

Pada umumnya kondisi yang optimum tercapai pada konsentrasi primer sebesar 0,1-0,5 µM. Konsentrasi primer yang lebih tinggi dapat menyebabkan *mispriming* dan akumulasi amplicon yang tidak spesifik serta pembentukan primer-dimer. Amplicon yang tidak spesifik dan primer-dimer dapat menjadi substrat untuk PCR dan berkompetisi dengan substrat yang sebenarnya sehingga menyebabkan jumlah amplicon sedikit (31).

Primer yang digunakan umumnya memiliki panjang 18-28 nukleotida dengan kandungan G-C sebesar 50-60%. Penggunaan rancangan primer yang memiliki nukleotida G atau C secara berurutan tiga atau lebih pada ujung 3' sebaiknya dihindari. Rancangan primer demikian dapat menyebabkan *mispriming* terutama pada daerah-daerah yang kaya akan sekuens G-C (30, 31).

## **F. ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA**

Elektroforesis adalah teknik pemisahan dimana komponen-komponen

terpisah berdasarkan perbedaan ukuran dan muatan molekulnya. Selain itu, proses pemidahan juga tergantung dari tegangan dan jenis medium yang digunakan. Persyaratan medium yang digunakan untuk elektroforesis adalah inert, seragam, dapat digunakan kembali, stabil, tidak berinteraksi dengan analit, dapat dimanipulasi secara mekanis dan dalam penanganan, dan tidak mengganggu visualisasi atau kuantitasi analit. Medium yang digunakan biasanya berbentuk padat, seperti gel, kertas, dan membran mikropori. Jenis gel yang paling sering digunakan adalah gel agarosa, dan gel poliakrilamid (33).

Agarosa adalah polisakarida hasil pemurnian dari rumput laut. Gel agarosa memiliki daya pemisahan yang lebih rendah jika dibandingkan dengan gel poliakrilamid, tetapi rentang pemisahannya lebih besar. Gel agarosa dalam berbagai konsentrasi dapat memisahkan DNA dari ukuran 200 basa sampai 50kb (28).

Gel agarosa dibuat dengan melarutkan bubuk agarosa kering dalam larutan dapar, lalu dididihkan sampai larutan jernih, kemudian dituang ke wadah dan dibiarkan membeku hingga terbentuk lempeng seperti gelatin. Gel agarosa tersebut kemudian direndam dalam chamber yang mengandung larutan dapar dan elektroda positif dan negatif, lalu dialiri arus listrik. DNA bermuatan negatif, sehingga DNA akan bergerak menembus pori gel dari elektroda negatif menuju elektroda positif. Pergerakan tersebut dipengaruhi oleh tegangan yang digunakan, konsentrasi agarosa, dan ukuran DNA. Molekul DNA yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada molekul yang

lebih besar (34).

Untuk mengamati pemisahan yang terjadi digunakan senyawa berfluoresensi, contohnya etidium bromida. Senyawa ini akan berinterkalasi dengan DNA dan akan muncul sebagai pita-pita berwarna pink di bawah sinar UV pada panjang gelombang 590 nm (27, 28).





## BAB III

### BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

#### A. LOKASI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan dari bulan Februari sampai Juli 2009.

#### B. BAHAN

##### 1. Sampel

Sampel yang digunakan adalah 21 galur BAL dari kultur stok beku koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI dari penelitian sebelumnya.

##### 2. Bahan Kimia

SDS (Sodium Dodesil Sulfat) [Sigma, USA], tris base [Merck, Jerman], natrium hidroksida [Merck, Jerman], asam klorida [Merck, Jerman], sukrosa [Difco, Perancis], EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) [Merck, Jerman], triton x-100 [Sigma, USA], CTAB (*Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide*) [Sigma, USA], asam asetat glasial [Merck, Jerman], isoamil alkohol [Sigma, USA], isopropanol [Aldrich], etanol 96% [Merck, Jerman], kloroform [Mallinckrodt], lisozim [Sigma, USA], proteinase-K [USB

USA], agarosa [GE Healthcare, Inggris], etidium bromida [SentraBD], ficol [Sigma, USA], gliserol [Merck, Jerman], akuabides [Otsuka, Jepang], primer LevV 5'-GAYGTITGGGAYWSITGGC-3' dan LevR 5'-TCITYYTCRTCISWIRMCAT-3' (Y=C atau T, W=A atau T, S=G atau C, R=A atau G, M=A atau C), RTG (*Ready-To-Go*) PCR beads [Amersham Biosciences, Inggris], magnesium klorida 25 mM [Fermentas, USA], 1 kb plus DNA ladder [Invitrogen, USA], gene ladder 100 [Wako, Jepang].

### **3. Medium**

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium de Man Rogosa Sharpe (MRS) dengan komposisi per liter: pepton [Difco, Perancis] 10 g, LAB-Lemco [Oxoid, Inggris] 8 g, ekstrak khamir [Difco, Perancis] 4 g, dikalium hidrogen fosfat [Merck, Jerman] 2 g, natrium asetat [Merck, Jerman] 5 g, ammonium sitrat [Merck, Jerman] 2 g, magnesium sulfat [Merck, Jerman] 0,2 g, mangan sulfat [Merck, Jerman] 0,05 g, agar Bacto [Pronadisa, Spanyol] 15 g, Tween 80 [Merck, Jerman] 0,5 mL dan dekstrosa [Sigma, USA] 20 g.

### **B. ALAT**

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah autoklaf [Hirayama, Jepang], oven [Lab-line, USA], timbangan analitik [Scout dan Acculab, USA], Laminar Air Flow Cabinet [Esco, Cina], inkubator [Orbital Shaker Incubator dan Memmert, Jerman], vortex mixer [Barnstead

International], kamera digital, mikrosentrifus berpendingin [Sorvall-fresco], mikrosentrifus minispin [Eppendorf, Jerman], ultra low freezer -70°C [New Brunswick Scientific, Inggris], freezer -20°C [Gea, USA], PCR *thermal cyclers* [MJ Mini Biorad], alat elektroforesis gel mini [Mupid-eX], UV transilluminator dengan pelindung dan kamera digital yang terhubung dengan komputer [BDA Biometra TI 1, Jerman].

## **C. CARA KERJA**

### **1. Pembuatan Medium (35)**

#### **a. Medium Agar MRS**

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: pepton 5 g, LAB-Lemco 4 g, ekstrak khamir 2 g, dikalium hidrogen fosfat 1 g, natrium asetat 2,5 g, amonium sitrat 1 g, magnesium sulfat 0,1 g, mangan sulfat 0,025 g, dan agar Bacto 6 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades secukupnya, dan dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 0,25 ml Tween 80. Selanjutnya medium dipanaskan kembali hingga mendidih. Larutan medium ini diatur pH-nya dengan menggunakan pH meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N, kemudian didinginkan, setelah itu volume dicukupkan dengan akuades hingga 250 ml. Sementara itu, dekstrosa ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades dan

dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk dengan magnetik stirrer hingga mendidih. Kemudian volume dicukupkan hingga 250 ml. Kedua medium ini disterilisasi dengan autoklaf masing-masing selama 15 menit pada suhu 121 °C. Larutan dekstrosa tersebut dicampurkan ke dalam medium MRS dan dihomogenkan secara aseptis di dalam LAF Cabinet yang telah disiapkan. Setelah medium hangat, medium tersebut dituang secara aseptis ke cawan Petri. Setelah membeku, cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4 °C.

#### **b. Medium MRS untuk Agar Miring**

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: pepton 1 g, LAB-Lemco 0,8 g, ekstrak khamir 0,4 g, dikalium hidrogen fosfat 0,2 g, natrium asetat 0,5 g, amonium sitrat 0,2 g, magnesium sulfat 0,02 g, mangan sulfat 0,005 g, dekstrosa 2 g, agar Bacto 1,5 g, dan kalsium karbonat 0,5 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat, ditambahkan dengan akuades secukupnya, dan dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Setelah itu, pH diatur menggunakan pH meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$  dengan menggunakan larutan asam klorida 1 N. Kemudian volume dicukupkan hingga 100 mL dengan akuades. Dalam keadaan panas dan tetap sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, medium tersebut dipipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi.

Kemudian seluruh tabung reaksi disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Tabung reaksi dimiringkan hingga membeku dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C untuk digunakan keesokan harinya.

### **c. Medium Cair MRS**

Masing-masing bahan ditimbang dengan ukuran sebagai berikut: pepton 1 g, LAB-Lemco 0,8 g, ekstrak khamir 0,4 g, dikalium hidrogen fosfat 0,2 g, natrium asetat 0,5 g, amonium sitrat 0,2 g, magnesium sulfat 0,02 g, mangan sulfat 0,005 g, dan dekstrosa 2 g. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu bulat. Setelah itu, ditambahkan dengan akuades secukupnya dan dipanaskan di atas hotplate sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Setelah dingin, pH diatur menggunakan pH meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$  dengan larutan asam klorida 1 N. Kemudian volume dicukupkan hingga 100 ml dengan akuades. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Seluruh tabung reaksi disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah dingin, dapat langsung digunakan atau dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C untuk digunakan keesokan harinya.

## **2. Peremajaan Galur dan Pembuatan Kultur Kerja (35)**

Galur BAL dari kultur stok beku koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan

Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI diremajakan kembali. Galur digoreskan pada medium agar MRS dengan menggunakan ose, kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Koloni tunggal yang tumbuh kemudian diambil dengan ose dan digoreskan ke medium agar miring MRS. Agar miring tersebut lalu diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam untuk selanjutnya dapat digunakan sebagai kultur kerja.

Peremajaan galur dilakukan setiap 2-3 minggu sekali, yaitu dengan memindahkan kembali kultur dari medium agar miring MRS ke medium agar MRS di cawan petri. Koloni tunggal yang didapat kemudian dipindahkan kembali ke medium agar miring MRS.

### **3. Ekstraksi DNA Genomik BAL (36)**

Ekstraksi DNA genomik dilakukan menggunakan metode modifikasi Murray dan Thompson [1980] menggunakan Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). Galur BAL yang akan diekstraksi DNA-nya, sebelumnya dikultur dalam 10 mL medium cair MRS, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 32°C. Setelah itu sel bakteri tadi dimasukkan ke dalam tabung mikrotube 1,5 ml steril dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada suhu 20°C selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Kemudian supernatan dibuang. Lakukan beberapa kali hingga total sel bakteri yang diambil berjumlah 10 ml. Pelet sel yang didapat disuspensikan kembali ke dalam 557 µl dapar sukrosa-tris base-EDTA-triton x-100 (STET) dan divortex. Setelah itu sebanyak 10 µl larutan lisozim 10 mg/mL, 30 µl sodium dodesil

sulfat (SDS) 10%, dan 4 µl proteinase-K 25 mg/ml ditambahkan ke dalam suspensi tersebut. Suspensi dihomogenkan dengan cara membalikkan mikrotube selama beberapa kali. Kemudian suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Selanjutnya sebanyak 65 µl natrium klorida 4 M dan 80 µl CTAB ditambahkan ke dalam suspensi, divortex, dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30-60 menit.

Langkah selanjutnya adalah melakukan ekstraksi dengan kloroform dan isoamilalkohol (24:1, v/v) sebanyak 650 µl (624 µl kloroform dan 26 µl isoamil alkohol). Campuran tersebut divortex dan disentrifus dengan mikrosentrifus pada suhu 20°C, selama 20 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Kemudian ambil supernatan dan masukkan ke dalam mikrotube yang baru dan steril dengan menggunakan mikropipet. Setelah itu supernatan tadi ditambahkan dengan isopropanol suhu 4°C sebanyak 400 µl dan larutan dibolak-balik secara perlahan sampai terlihat benang-benang putih halus (benang DNA). Larutan yang mengandung DNA tersebut disentrifus pada suhu 20°C, selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Pelet DNA yang diperoleh ditambahkan dengan etanol 70% suhu 4°C sebanyak 1 mL dan dibolak-balik beberapa kali secara perlahan-lahan. Larutan tersebut selanjutnya disentrifus pada suhu 20°C, selama 2 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Lalu supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringkan di udara (kira-kira 2 jam). Setelah kering, pelet DNA kemudian dilarutkan dalam 25 µl air *MilliQ* (ddH<sub>2</sub>O) dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit. DNA

kemudian disimpan di dalam freezer dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pelet DNA ini nantinya akan digunakan sebagai DNA cetakan pada proses PCR.

#### **4. Analisis DNA Genomik BAL dengan Elektroforesis Gel Agarosa (28, 34, 37, 38)**

Agarosa dibuat dengan konsentrasi 1,5%, yaitu sebanyak 0,3 g bubuk agarosa ultrapure dilarutkan dalam 40 ml dapar tris asetat EDTA (TAE) 1 x steril, kemudian dididihkan. Setelah agak dingin, larutan tersebut dituang pada cetakan gel, ditambahkan sedikit etidium bromida, dihomogenkan, sisir dipasang, lalu didiamkan hingga membeku. Setelah membeku, sisir diangkat dan nampan dipindahkan ke wadah elektroforesis. Wadah tersebut lalu diberi dapar TAE 1x hingga menggenangi permukaan gel agarosa.

Sebanyak 3  $\mu\text{l}$  ekstrak DNA disuspensikan dengan 3  $\mu\text{l}$  loading buffer dalam *microtube*. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel yang tersedia dengan hati-hati. Elektroforesis dinyalakan dan tegangan diatur sebesar 50 volt. Kemudian alat dijalankan hingga xylene cyanol mencapai 1 cm dari tepi bawah gel.

Setelah selesai dijalankan, gel agarosa diambil dan pita-pita DNA diamati melalui UV transilluminator pada panjang gelombang 590 nm dengan pelindung (hood) dan hasilnya difoto. Foto gel dilakukan dengan kamera digital yang dihubungkan dengan komputer sehingga dapat diedit dan dicetak.



Jika intensitas warna etidium bromida terlalu tinggi, dapat dilakukan pemucatan warna dengan cara mencelupkan gel hasil elektroforesis ke dalam wadah yang sudah diisi dengan akuades selama 5 menit sambil digoyang-goyang. Proses ini dapat dilakukan berulang-ulang sampai didapatkan foto yang bagus. Akuades yang digunakan harus diganti beberapa kali.

### **5. Persiapan PCR (13, 39)**

Primer yang digunakan, yaitu LevV (5'-GAYGTITGGGAYWSITGGC-3') dan LevR (5'-TCITYYTCRTCISWIRMCAT-3') masing-masing dilarutkan dengan air *MilliQ* hingga tercapai konsentrasi 100 pmol. Primer LevV dilarutkan dalam 744  $\mu$ l air *MilliQ*. Primer LevR dilarutkan dalam 266  $\mu$ l air *MilliQ*. Air *MilliQ* diambil dengan menggunakan mikropipet.

Ke dalam *microtube* 0,5 ml yang baru dan steril yang sudah berisi RTG PCR *bead* ditambahkan primer LevV 100 pmol/  $\mu$ l dan primer LevR 100 pmol/  $\mu$ l masing-masing sebanyak 2  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 25 mM sebanyak 6  $\mu$ l, dan air *MilliQ* sebanyak 34  $\mu$ l. Larutan dihomogenkan lalu dibagi dua dengan pipet ke *microtube* baru dan steril yang lain sehingga volume masing-masing menjadi 22  $\mu$ l. Kemudian pada masing-masing *microtube* ditambahkan DNA cetakan sebanyak 3  $\mu$ l untuk memperoleh volume akhir larutan sebanyak 25  $\mu$ l. Larutan tersebut disentrifus selama 8 detik sebelum kemudian digunakan untuk proses PCR.

## 6. Proses PCR

Alat yang digunakan untuk menjalankan proses PCR adalah PCR *thermal cycler* MJ Mini Biorad yang prinsip kerjanya berdasarkan pengaturan temperatur. Data temperatur dan waktu yang diinginkan diprogram pada alat, dan selanjutnya proses PCR berjalan secara otomatis.

Kondisi PCR pada alat diatur sebagai berikut:

- a. Pra-siklus : 95 °C ; 5 menit
- b. Siklus 30 kali : Tahap denaturasi : 95 °C ; 30 detik  
Tahap pelekatan : 53 °C ; 30 detik  
Tahap perpanjangan : 72 °C ; 1 menit
- c. Pasca-siklus : Pasca perpanjangan : 72 °C ; 3 menit  
Penyimpanan : 4 °C ; selamanya

## 7. Analisis Amplikon dengan Elektroforesis Gel Agarosa (28, 34)

Prosedur pelaksanaan analisis amplikon hasil PCR sama dengan prosedur analisis DNA genomik BAL hasil ekstraksi yang telah tertulis sebelumnya. Perbedaannya terletak pada konsentrasi gel agarosa yang digunakan, yaitu 2 % serta penambahan marker Gene Ladder 100 sebanyak 3 µl yang disuspensikan dalam 3 µl loading buffer.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL

Pada uji pendahuluan PCR, digunakan temperatur 50°C untuk tahap pelekatan. Galur BAL yang digunakan adalah MBF 4-2, MBF 7-5, MBF CNC 2(1), dan MBF CNC 6. Hasil pengamatan amplicon pada elektroforesis gel agarosa menunjukkan banyak pita pada masing-masing galur, tetapi tidak terdapat satu pita spesifik. Selanjutnya dilakukan percobaan optimasi temperatur pelekatan, yaitu pada temperatur 52,2°C dan 54°C dengan menggunakan DNA genomik dari galur BAL MBF 7-5. Hasil pengamatan amplicon pada elektroforesis gel agarosa menunjukkan tiga pita, namun terdapat satu pita spesifik pada ukuran sekitar 700 pb.

Proses PCR selanjutnya dilakukan dengan menggunakan temperatur pelekatan 53°C. Kontrol positif yang digunakan, MBF 8-2, menunjukkan amplicon berukuran sekitar 700 pb. Kontrol negatif, TISTR, menunjukkan hasil negatif. Hasil yang diperoleh dari 21 galur yang digunakan adalah sebagai berikut: tujuh galur menunjukkan amplicon berukuran sekitar 700 pb, yaitu MBF PDG 3(1), MBF PDG 4, *Weissella cibaria* MBF WRS 3, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 4-2, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 7-5, *Weissella confusa* MBF PDG 10(1), dan *Leuconostoc mesenteroides* MBF WRS 6; satu galur menunjukkan amplicon berukuran sekitar 800 pb, yaitu *Weissella cibaria* MBF CNC 11; lima galur menunjukkan amplicon berukuran

sekitar 900 pb, yaitu MBF 9-1, *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2, MBF 5-14, MBF 7-15, dan MBF CNC 7(1); delapan galur menunjukkan hasil negatif, yaitu *Leuconostoc mesenteroides* MBF 5-4, MBF CNC 3(2), MBF CNC 6, *Leuconostoc mesenteroides* MBF WRS 5, MBF 6-13, MBF 4-9, *Leuconostoc citreum* MBF BJG 1, dan *Weissella confusa* MBF CNC 2(1).

## **B. PEMBAHASAN**

Pada awal penelitian, dilakukan peremajaan galur BAL dari stok beku yang ditumbuhkan kembali pada medium agar MRS. Galur yang digunakan adalah sebanyak 21 galur yang berdasarkan penelitian sebelumnya diduga memiliki gen *fff* menggunakan metode pengamatan visual dengan substrat spesifik (40, 41).

Bakteri yang tumbuh kemudian dipurifikasi untuk mendapatkan koloni tunggal yang akan digunakan sebagai kultur stok dan kultur kerja. Purifikasi dimaksudkan untuk mencegah terjadinya kontaminasi oleh bakteri lain. Koloni tunggal tersebut kemudian ditumbuhkan pada medium agar miring MRS sebagai kultur stok. Medium agar miring MRS mengandung kalsium karbonat yang berfungsi untuk menjaga pH medium agar tidak terlalu asam akibat asam laktat yang dihasilkan oleh BAL, karena pH yang terlalu asam dapat membunuh BAL.

Proses peremajaan kemudian dilakukan setiap 2-3 minggu sekali. Hal ini dimaksudkan untuk mempertahankan sifat fisiologi dan genetik yang dimiliki bakteri agar bakteri tetap dapat tumbuh secara maksimal.

Tahap berikutnya adalah ekstraksi DNA genomik BAL. Galur BAL ditumbuhkan pada medium cair dengan inkubasi 18-24 jam pada suhu 32°C. Kultur cair kemudian disentrifus untuk mendapatkan pelet sel. Ekstraksi dilakukan dengan metode modifikasi Murray dan Thompson [1980] menggunakan CTAB, yang berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya didapatkan hasil ekstrak DNA yang cukup bersih (36).

Pelet sel yang diperoleh diresuspensi dalam dapar STET untuk tahap awal pelisisan sel. Dapar STET mengandung EDTA yang akan mengikat ion magnesium yang menjaga struktur dinding sel, dan juga menghambat kerja enzim DNase yang dapat menghidrolisis DNA (42). Triton X-100 yang terkandung dalam dapar STET juga membantu pelisisan sel dengan mekanisme kimiawi (43).

Proses pelisisan sel selanjutnya dilakukan dengan penambahan lisozim, SDS, dan proteinase-K. Lisozim bekerja mendegradasi peptidoglikan yang merupakan komponen utama dari dinding sel bakteri gram positif. Mekanisme kerjanya adalah dengan memutus ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 pada peptidoglikan (43).

Selanjutnya SDS membantu disosiasi kompleks DNA-protein sehingga DNA terlepas dari protein. Protein yang lepas selanjutnya akan dilisis oleh enzim proteolitik, yaitu proteinase-K. Proteinase-K mendegradasi protein melalui hidrolisis ikatan peptida yang berdekatan dengan gugus asam karboksilat dari asam amino aromatis maupun alifatis. Enzim ini tidak

terdenaturasi oleh SDS, melainkan bekerja lebih efektif dengan adanya SDS (28, 42).

Tahap ekstraksi selanjutnya adalah penambahan CTAB yang akan membentuk kompleks dengan DNA. Kompleks yang terbentuk tidak larut pada konsentrasi natrium klorida di bawah 0,5 M, sehingga ditambahkan natrium klorida 4 M untuk melarutkannya. Pada keadaan tersebut, kebanyakan karbohidrat dan protein tidak larut (29).

Selanjutnya ditambahkan kloroform dan isoamilalkohol (24:1 v/v) untuk memisahkan protein. Kloroform bekerja mengendapkan protein dan memfasilitasi pemisahan antara fase air dengan fase organik. Isoamilalkohol berfungsi mencegah terjadinya emulsi. Setelah dilakukan sentrifugasi akan terlihat tiga lapisan, yaitu lapisan kloroform di bagian bawah; endapan protein di bagian tengah; dan lapisan air di bagian atas yang merupakan tempat terlarutnya DNA (28).

Lapisan atas yang mengandung DNA tersebut kemudian dipipet secara seksama dan dipindahkan ke dalam mikrotube yang baru dan steril. Supernatan yang telah dipindahkan kemudian ditambahkan isopropanol dan disentrifus untuk mengendapkan DNA. Pelet DNA yang didapat kemudian dicuci dengan etanol 70% untuk menghilangkan isopropanol yang mungkin masih tersisa.

DNA genomik hasil ekstraksi selanjutnya dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa. Sebelum dipipet ke dalam sumuran pada gel, DNA yang akan dianalisis dicampur dengan *loading buffer* terlebih

dahulu. *Loading buffer* ini terdiri dari xylene cyanol dan ficoll 25%, atau dapat pula digunakan gliserol 75%. Xylene cyanol berfungsi sebagai zat warna untuk mempermudah pengamatan jalannya elektroforesis. Ficoll dan gliserol berfungsi sebagai pemberat agar molekul DNA tetap berada dalam sumuran (44).

Adanya DNA genomik diamati dengan bantuan pewarnaan zat berfluoresensi etidium bromida. Etidium bromida berinterkalasi di antara untai sepanjang molekul DNA dan memberikan serapan pada 590 nm pada radiasi sinar UV (28).

Proses selanjutnya adalah PCR untuk mengamplifikasi gen *fff* dengan menggunakan primer *degenerate* LevV dan LevR seperti yang digunakan oleh Tiekling, *et al.*, 2003 (13). Primer *degenerate* ini dirancang berdasarkan *conserved region* dari sekuens asam amino levansukrase BAL yang didapat dari *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*; dan dari levansukrase dan fruktansukrase *Lb. reuteri* 121. *Conserved region* adalah daerah pada gen yang memiliki susunan asam amino yang sama atau mirip yang dimiliki oleh jenis gen yang sama pada spesies yang berbeda-beda. Amplikon yang dihasilkan adalah berukuran sekitar 800 pb (13).

Primer LevV adalah primer *forward* yang akan melekat pada ujung 5' rantai tunggal DNA cetakan yang akan menjadi sekuens awal amplikon. Primer LevR adalah primer *reverse* yang akan melekat pada ujung 5' rantai

tunggal yang lain yang akan menjadi sekuens akhir amplikon. Skema siklus PCR dapat dilihat pada gambar 12.

Identifikasi dengan metode molekuler menggunakan PCR lebih spesifik daripada metode konvensional dengan pengamatan visual. Hal tersebut karena yang diidentifikasi pada proses PCR adalah DNA dimana sekuens asam amino pada DNA menentukan protein yang dimiliki oleh suatu organisme (45).

Kondisi PCR yang digunakan pada penelitian ini harus dioptimasi terlebih dahulu, karena tidak disebutkan di sumber pustaka. Pada uji pendahuluan PCR, temperatur pelekatan primer diatur pada 50°C. Sebagai percobaan awal dipilih empat DNA genomik, yaitu dari galur BAL MBF 4-2, MBF 7-5, MBF CNC 2(1), dan MBF CNC 6. Keempat galur tersebut dipilih berdasarkan banyaknya EPS yang dihasilkan berdasarkan penelitian sebelumnya (40,41). Hasil analisis amplikon dengan elektroforesis gel agarosa belum menunjukkan adanya pita spesifik yang diharapkan, dimana terdapat beberapa pita dengan intensitas yang kurang lebih sama.

Selanjutnya dilakukan optimasi dengan mengatur temperatur pelekatan primer pada 52,2°C dan 54°C. DNA genomik yang digunakan adalah dari galur MBF 7-5. Hasil analisis amplikon dengan elektroforesis gel agarosa menunjukkan pita spesifik yang berukuran sekitar 700 pb (Gambar 10).

Proses PCR selanjutnya dilakukan dengan menggunakan kondisi pelekatan primer pada temperatur 53°C. Selain kedua puluh satu galur



terpilih, dilakukan juga PCR terhadap kontrol positif dan negatif. Kontrol positif yang digunakan adalah galur BAL *Weissella confusa* MBF 8-2 yang telah diketahui memiliki gen *fff* berdasarkan penelitian oleh Malik, *et al.*, 2009 (39). Kontrol negatif yang digunakan adalah galur BAL TISTR yang diketahui tidak memiliki gen *fff*.

Analisis ampikon hasil PCR kemudian dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. DNA akan terpisah dalam fragmen-fragmen yang berbeda tergantung dari ukurannya. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 2%. Konsentrasi gel agarosa yang semakin besar akan menyebabkan mobilitas fragmen DNA menurun. Dengan demikian, pemisahan yang dihasilkan akan lebih baik dari konsentrasi yang lebih kecil (28).

Besar ukuran dari fragmen DNA yang diperoleh dapat diketahui dengan menggunakan penanda. Penanda yang digunakan adalah DNA *marker* yang mengandung fragmen DNA dalam berbagai ukuran tertentu. Penanda yang digunakan pada penelitian ini adalah 1Kb Plus DNA Ladder dan Gene Ladder 100. Ukuran dari kedua penanda tersebut dapat dilihat masing-masing pada gambar 7 dan 8.

Hasil elektroforesis gel agarosa ampikon menunjukkan tujuh galur yang diperkirakan positif memiliki gen *fff*. Ampikon yang dihasilkan berukuran sama dengan ampikon dari kontrol positif *Weissella confusa* MBF 8-2, yaitu sekitar 700 pb. Ketujuh galur tersebut adalah MBF PDG 3(1), MBF PDG 4, *Weissella cibaria* MBF WRS 3, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 4-2,

*Leuconostoc mesenteroides* MBF 7-5, *Weissella confusa* MBF PDG 10(1), dan *Leuconostoc mesenteroides* MBF WRS 6. Dua galur, yaitu MBF 4-9 dan *Weissella confusa* MBF CNC 2(1) tidak menghasilkan ampikon. Dua belas galur lainnya menunjukkan ampikon pada ukuran yang bervariasi, namun tidak pada 700 pb. Hasil pengamatan ampikon dan gambar hasil elektroforesis ampikon dari 21 galur BAL beserta kontrol positif dan negatifnya dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 11.

Pita DNA yang didapat pada daerah sekitar 700 pb dari semua galur tidak menunjukkan intensitas yang kuat. Hal ini kemungkinan dikarenakan beberapa hal. Pertama, kemungkinan pekerjaan yang kurang steril. Kontaminasi dapat berasal dari tip mikropipet yang digunakan. Kontaminasi tersebut dapat menyebabkan degradasi DNA pada proses preparasi, analisa, dan penyimpanan (30). Kedua, konsentrasi produk PCR yang dihasilkan rendah.

Rendahnya konsentrasi produk PCR dapat disebabkan oleh jumlah siklus yang digunakan, konsentrasi primer, DNA cetakan, dan dNTP yang terlalu kecil, dan juga spesifisitas primer *degenerate*. Siklus yang digunakan pada penelitian ini adalah sebanyak 35 siklus yang sudah optimum untuk penelitian pada umumnya. Dengan perlakuan yang sama, hasil optimasi pada MBF 7-5 menunjukkan ampikon dengan intensitas yang kuat. Dengan demikian, konsentrasi produk PCR yang rendah pada galur lainnya mungkin disebabkan oleh konsentrasi DNA cetakan yang rendah.

Ukuran amplicon positif berbeda dengan hasil dari penelitian referensi oleh Tiekling, *et al.*, 2003 (13), yaitu 800 pb. Namun dikatakan juga bahwa sekuens levansukrase bakteri yang telah diketahui berukuran antara 700-900 pb (13). Keragaman ukuran tersebut mungkin disebabkan karena adanya pengaruh lingkungan. Perbedaan asal, *strain*, dan substrat yang digunakan dapat memungkinkan variasi keragaman struktur genomik bakteri.

Dua galur, yaitu MBF 4-9 dan *Weissella confusa* MBF CNC 2(1), tidak menghasilkan amplicon walaupun dari hasil penelitian menggunakan metode pengamatan visual dengan substrat spesifik memberikan hasil positif memiliki gen *fff*. Kemungkinan kedua galur tersebut tidak memiliki gen *fff* yang dapat diidentifikasi oleh pasangan primer yang digunakan. Sekuens asam amino pada *conserved region* dari gen *fff* dua galur tersebut mungkin berbeda dari sekuens yang dimiliki oleh bakteri yang digunakan sebagai referensi dalam perancangan primer sehingga primer tidak dapat melekat pada daerah target yang komplemen.

Hasil amplicon dengan ukuran yang bervariasi, bahkan yang berasal dari satu galur, dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor yang pertama adalah primer *degenerate* yang digunakan. Primer *degenerate* adalah campuran oligonukleotida yang memiliki urutan nukleotida yang bervariasi. Primer semacam ini dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen yang susunan basa nukleotidanya belum diketahui namun termasuk dalam famili yang sama. Pada asam-asam amino dapat terjadi degenerasi primer, dimana asam amino dapat memiliki kode genetik lebih dari satu (30).

Dengan menggunakan primer *degenerate*, kode-kode genetik berbeda yang menyandikan asam amino yang sama tersebut dapat diidentifikasi dan diamplifikasi. Namun jika variasi basa nukleotida pada primer terlalu banyak dapat menyebabkan menurunnya spesifisitas primer. Primer *degenerate* bersifat sensitif, sehingga jika tidak spesifik dapat mengakibatkan amplifikasi sekuens yang bukan sekuens target. Hasil amplifikasi sekuens yang tidak spesifik akan menjadi DNA cetakan untuk siklus berikutnya dan terakumulasi (30).

Faktor kedua adalah kondisi reaksi dimana komposisi PCR yang digunakan berbeda dengan komposisi pada penelitian referensi (13). Pada jurnal referensi hanya disebutkan konsentrasi *Taq polymerase*, yaitu 7,25 U, dan volume DNA cetakan yang digunakan, yaitu 0,5  $\mu$ l. pada penelitian ini, *Taq polymerase* yang digunakan adalah 1,25 U. perbedaan tersebut adalah karena pada penelitian ini digunakan RTG PCR *beads*, yaitu PCR kit siap pakai yang telah mengandung komponen-komponen reaksi PCR dalam jumlah tertentu.

Konsentrasi magnesium klorida yang digunakan pada penelitian ini adalah 3,75 mM. Magnesium klorida berperan sebagai kofaktor *Taq polymerase* yang mempengaruhi produktivitas dan ketelitian enzim tersebut dalam proses polimerasi. Konsentrasi magnesium klorida yang terlalu besar dapat menurunkan ketelitian enzim, namun jika terlalu sedikit dapat menyebabkan inaktivasi enzim (46,47). Magnesium klorida juga berfungsi menetralkan gaya tolak-menolak antara tulang punggung primer dengan

tulang punggung DNA cetakan sehingga membantu proses pelekatan primer pada DNA cetakan (47).

Pada proses PCR yang menggunakan primer *degenerate*, konsentrasi magnesium klorida yang dibutuhkan lebih besar daripada jika menggunakan primer spesifik yang memiliki urutan nukleotida yang sudah pasti. Hal ini disebabkan karena bervariasinya urutan nukleotida pada primer *degenerate* sehingga dibutuhkan ketelitian yang sangat tinggi dari *Taq polymerase* untuk memfasilitasi pelekatan primer yang paling spesifik dan sesuai dari campuran primer yang ada sehingga menghasilkan identifikasi yang efisien dan tepat dari gen target.

Konsentrasi dari DNA cetakan yang digunakan juga berpengaruh terhadap hasil reaksi. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara  $10^5$ - $10^6$  molekul, atau biasa juga dinyatakan dalam  $\mu\text{g}$  atau  $\text{ng}$ . Kuantifikasi DNA sebaiknya dilakukan agar dapat dilakukan perhitungan yang lebih akurat untuk mengetahui berapa banyak DNA cetakan yang dibutuhkan untuk PCR. Kuantifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer *GeneQuant*<sup>®</sup>. Dengan alat tersebut juga dapat diketahui kemurnian DNA. Namun, pada penelitian ini kuantifikasi DNA tidak dapat dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI karena konsentrasi DNA yang terlalu rendah sehingga tidak dapat terukur.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Temperatur optimum pada proses pelekatan untuk primer LevV dan LevR pada penelitian ini adalah 53°C.
2. Amplikon berukuran sekitar 700 pb dihasilkan oleh 7 dari 21 DNA genomik galur BAL penghasil EPS, yaitu MBF PDG 3(1), MBF PDG 4, *Weissella cibaria* MBF WRS 3, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 4-2, *Leuconostoc mesenteroides* MBF 7-5, *Weissella confusa* MBF PDG 10(1), dan *Leuconostoc mesenteroides* MBF WRS 6, menunjukkan telah teridentifikasinya gen *fff* pada galur-galur tersebut.

#### B. SARAN

1. Perlu dilakukan kuantifikasi DNA genomik untuk menghindari kelebihan atau kekurangan jumlah DNA cetakan.
2. Perlu dilakukan sekuensing DNA gen *fff* untuk mengetahui profil gen *fff* dari 7 isolat yang diteliti.

## DAFTAR ACUAN

1. Whitfield C. Bacterial Exopolysaccharides. *Can. J. Microbiol*, 1988. **34**: 415-420.
2. Roller S, Dea ICM. Biotechnology in the Production and Modification of Biopolymers for Food. *Crit. Rev. Biotechnol*, 1992. **12**: 261-277.
3. Sutherland IW. Bacterial polysaccharides. *Adv. Microb. Physiol*, 1972. **8**: 143-212.
4. Anwar AM, Kralj S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. The Probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 Produces High-Molecular-Mass Inulin from Sucrose by Using an Inulosucrase Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008. 3426-3433.
5. Hinrichs WLJ, Prinsen MG, Frijlink HW. Inulin Glasses for the Stabilization of Therapeutic Proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. **215**: 163-174.
6. Hinrichs WLJ, Mancenido FA, Sanders NN, Braeckmans K, de Smedt SC, Demeester J, Frijlink HW. The Choice of a Suitable Oligosaccharide to Prevent Aggregation of PEGylated Nanoparticles During Freeze Thawing and Freeze Drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006. **311**: 237-244.
7. Iliev I, Ivanova I, Ignatova C. Glucansucrases from Lactic Acid Bacteria (LAB). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq*, 2006. **20**: 15-20.
8. van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IGH. Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006. **70** (1): 157-176.
9. Felicia. *Skrining, Isolasi, dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Ekspolisakarida Menggunakan Gen Penyandi 16S Ribosomal RNA*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI, 2006.
10. Malik A, Hermawati AK, Hestingtyas M, Soemiati A, Radji M. Isolasi dan Skrining Molekuler Bakteri Asam Laktat Pembawa Gen Glukansukrase. *Makara (Sains)*, *accepted*.

11. Zuccaro A, Gotze S, Kneip S, Dersch P, Seibel J. Tailor-Made Fructooligosaccharides by a Combination of Substrate and Genetic Engineering. *ChemBioChem*, 2008. **9**: 143-149.
12. van Hijum SAFT, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68** (9): 4390-4398.
13. Tieking M, Korakli M, Ehrmann MA, Ganzle MG, Vogel RF. In Situ Production of Exopolysaccharides during Sourdough Fermentation by Cereal and Intestinal Isolates of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. **69** (2): 945-952.
14. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms Eighth Edition*. New Jersey : Prentice Hall, 1996: 718-722.
15. Anonim. <http://www.lactospore.com/back.htm>. 4 November 2008, pk. 14:49.
16. van Geel-Schutten GH. General Introduction Lactic Acid Bacteria and Exopolysaccharide Synthesis. *Dalam: van Geel-Scutten GH. Exopolysaccharide Synthesis by Lactobacillus reuteri: Molecular Characterization of a Fructosyltransferase and a Glucansucrase*. 2003: 1- 15.
17. di Cagno R, de Angelis M, Limitone A, Minervini F, Carnevali P, Corsetti A, Gaenzle M, Ciati R, Gobbetti M. Glucan and Fructan Production by Sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Agric. Food Chem*, 2006. **54**: 9873-9881.
18. van Hijum SAFT. General Introduction. *Dalam: van Hijum SAFT. Fructosyltransferase of Lactobacillus reuteri: Characterization of Genes, Enzymes, and Fructan Polymers*. Enschede: Printpartners Ipskamp, 2004:10-33.
19. Steinbüchel A, Rhee SK. <http://books.google.com/books?id=WYdkTMqlw5wC&printsec=frontcover#PPA340,M1>. 22 Januari 2009, pk. 02:28.
20. Steinbüchel A, Rhee SK. <http://books.google.com/books?id=WYdkTMqlw5wC&printsec=frontcover#PPA341,M1>. 22 Januari 2009, pk. 02:28.

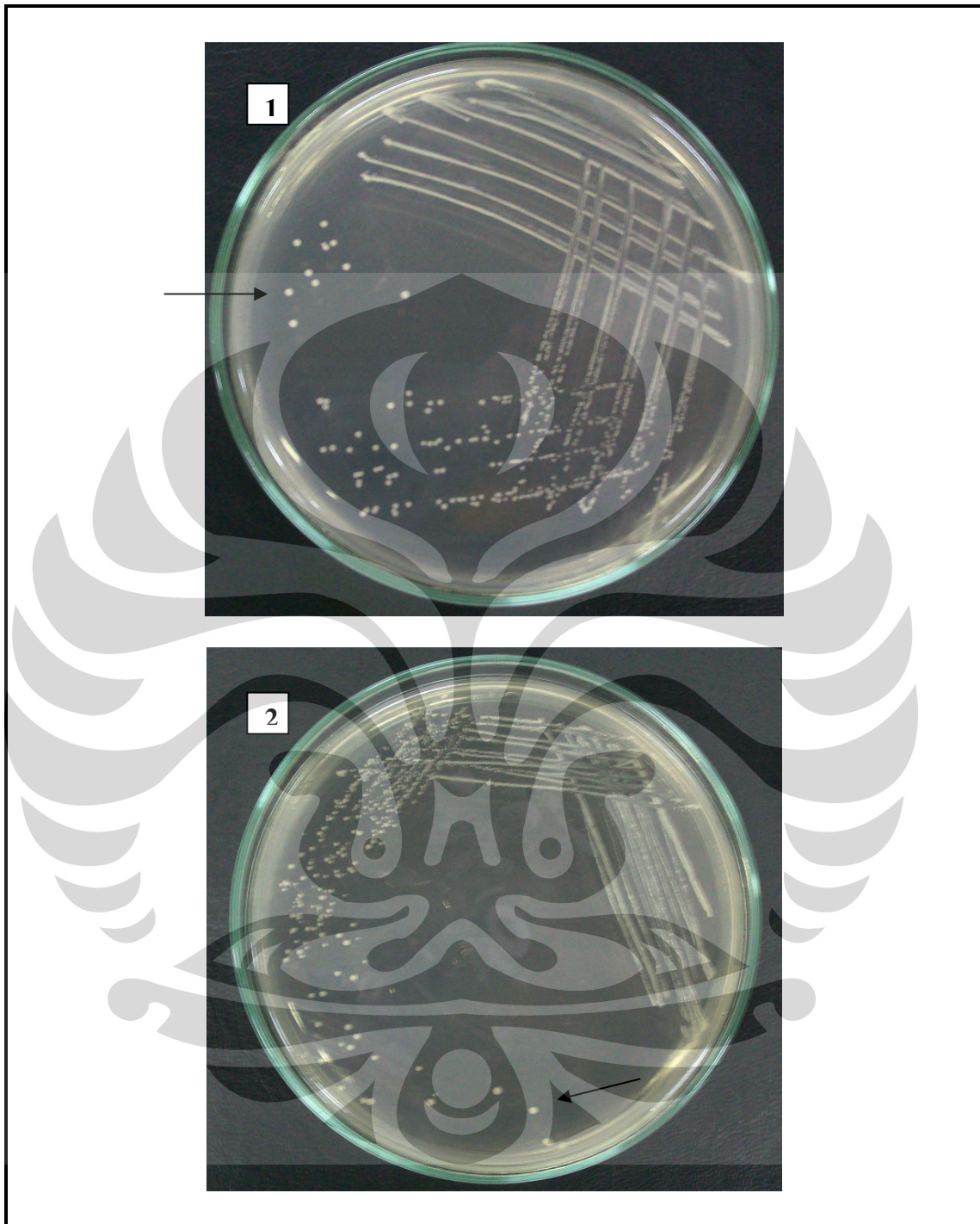


21. Pool-Zobel BL. Inulin-type Fructans and Reduction in Colon Cancer Risk: Review of Experimental and Human Data. *British Journal of Nutrition*, 2005. **93** (1): S73-S90.
22. Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. The Levansucrase and Inulosucrase Enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 Catalyze Processive Transglycosylation Reactions. *Microbiology*, 2006. **152**: 1-10.
23. Schomburg D, Salzman M, Dorte S, (ed). *Enzyme Handbook: Volume 12*. New York: Springer Publishing, 1996: 2.4.1.9, 2.4.1.10
24. Meng G, Futterer K. Donor Substrate Recognition in the Raffinose-bound E342A Mutant of Fructosyltransferase *Bacillus subtilis* Levansucrase. *BMC Struct Biol.*, 2008. **8**: 1-12.
25. Ozimek LK, Kralj S, Kaper T, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Single Amino Acid Residue Changes in Subsite – 1 of Inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 Strongly Influence the Size of Products Synthesized. *FEBS Journal*, 2006. **273**: 4104-4113.
26. van Hijum SAFT, Szalowska E, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Biochemical and Molecular Characterization of a Levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 2004. **150**: 621-630.
27. Wink M, (ed). *An Introduction to Molecular Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006: 165-169, 172-174.
28. Sudjadi. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius. 2008: 91-99, 131-142.
29. Anonim. <http://madsci.org/posts/archives/2003-07/1058886885.Mb.r.html>. 21 Januari 2009, pk. 14:10.
30. Yuwono T. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Penerbit ANDI, 2006: 1-23, 89-93.
31. Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. *Dalam: Innis MA. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press Inc, 1990: 3-11.
32. Saiki RK. Amplification of Genomic DNA. *Dalam: Innis MA. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press Inc, 1990: 13-19.

33. Franks F, (ed). *Protein Biotechnology Isolation, Characterization, and Stabilization*. New Jersey: The Humana Press Inc, 1993: 313-322.
34. Anonim. <http://troi.cc.rochester.edu/~wolb/FIBR/Lab3.GelElectrophoresis.doc>. 4 November 2008, pk. 15:13.
35. Indriani. *Pemeriksaan Kandungan Bakteri Asam Laktat pada Beberapa Minuman Susu Fermentasi yang Beredar di Pasaran dengan Teknik PCR Menggunakan Gen Penyandi RNA Ribosomal 16S*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007.
36. Malik A, Ariestanti DM, Nurfachtiyani A, Yanuar A. Skrining Gen Glukosiltransferase (*Gtf*) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Makara (Sains)*, 2008. **12**(1): 1-6.
37. Ariestanti DM. *Ekstraksi DNA Genomik dan Identifikasi Gen Glukansukrase Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Eksopolisakarida (EPS) dengan Metode PCR*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2007.
38. Malik A. *Penuntun Praktikum Bioteknologi: Teknologi DNA dan Teknik PCR*. Depok: Laboratorium Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI, 2006.
39. Anonim. *pureTaq Ready-To-Go-PCR beads*. UK: Amersham Bioscience Group, 2004: 3, 6-9.
40. Handayani T. *Pencarian Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida yang Mempunyai Aktivitas Fruktansukrase dari Koleksi Isolat Asal Sumber Lokal*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI, 2009.
41. Pratiwi TV. *Skrining Aktivitas Fruktansukrase terhadap Koleksi Bakteri Asam Laktat Menggunakan Media Rafinosa*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI, 2009.
42. Winfrey MR, Rott MA, Wortman A. *Unraveling DNA Molecular Biology for the Laboratory*. India: Pearson Education, 2009: 42-43.
43. Scawen MD, Hammond PM. Downstream Processing: Protein Extraction and Purification. *Dalam: Walker JM, Rapley R, (ed). Molecular Biology and Biotechnology Fourth Edition*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000: 461-464.

44. Lewis M. 2002. Agarose Gel Electrophoresis (Basic Method). 1 hlm. <http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html>. 5 Januari 2010, pk. 21.34.
45. Black JG. *Microbiology: Principles and Explorations*. New Jersey: Prentice Hall, 1999: 238-243.
46. Yuen K. 2008. PCR and Agarose Gel Electrophoresis. 5 hlm. <http://www.scribd.com/doc/2093598/PCR-and-Agarose-Gel-Electrophoresis>. 5 Januari 2010, pk. 22.15.
47. Johnson A. 2006. PCR 10X *Taq Buffer* with  $MgCl_2$ . 1 hlm. <http://74.125.153.132/search?q=cache:tucAKTPecNcJ:www.bio.net/bionet/mm/methods/2006-October/101217.html+pcr+10x+taq+buffer+with+mgcl2&cd=2&hl=id&ct=clnk&gl=id>. 30 Desember 2009, pk. 00.43.
48. Malik A, Radji M, Kralj S, Dijkhuizen L. Screening of Lactic Acid Bacteria from Indonesia Reveals Glucansucrase and Fructansucrase Genes in Two Different *Weissella confusa* Strains from Soya. *FEMS Microbiol Lett*, 2009. **300**: 131-138.
49. Winfrey MR, Rott MA, Wortman AT. *Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory*. New Jersey: Prentice Hall Inc, 1997.
50. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.





Gambar 1. Koloni tunggal beberapa galur BAL. 1. CNC 2(1); 2. PDG 4



Gambar 2. Mikrosentrifus berpendingin [Sorvall-fresco]



Gambar 3. Mikrosentrifus Mini Spin [Eppendorf]



Gambar 4. *Thermal Cycler* [MJ Mini BioRad]

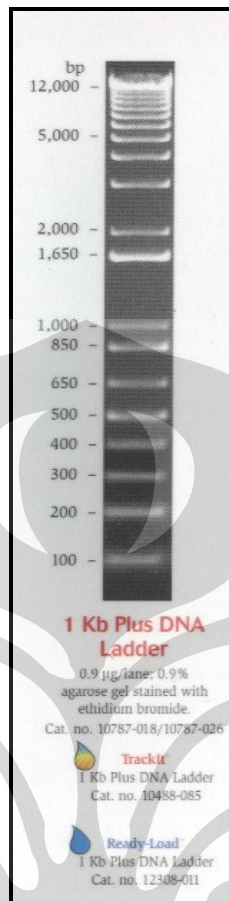


Gambar 5. Alat elektroforesis gel mini [Mupid-eX]

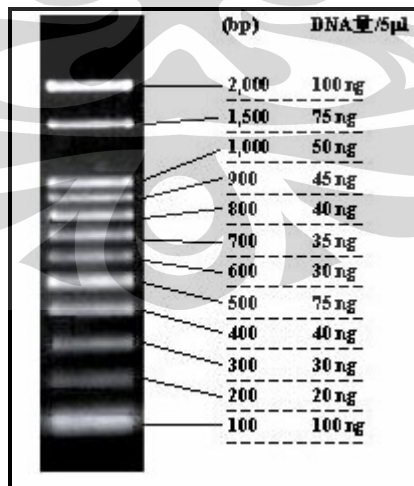


Gambar 6. *UV transilluminator* dengan pelindung dan kamera digital yang terhubung dengan komputer [BDA Biometra TI 1]

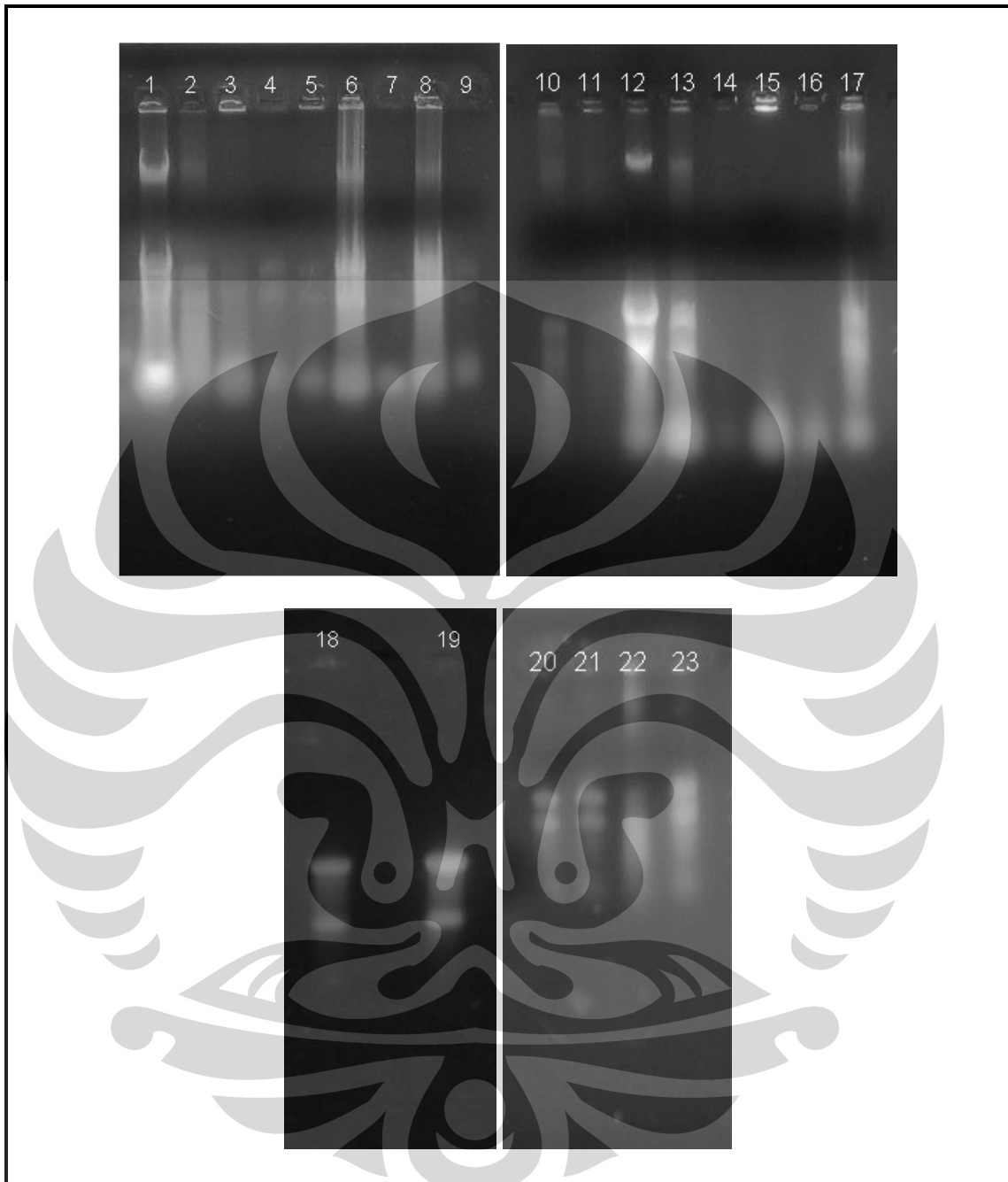




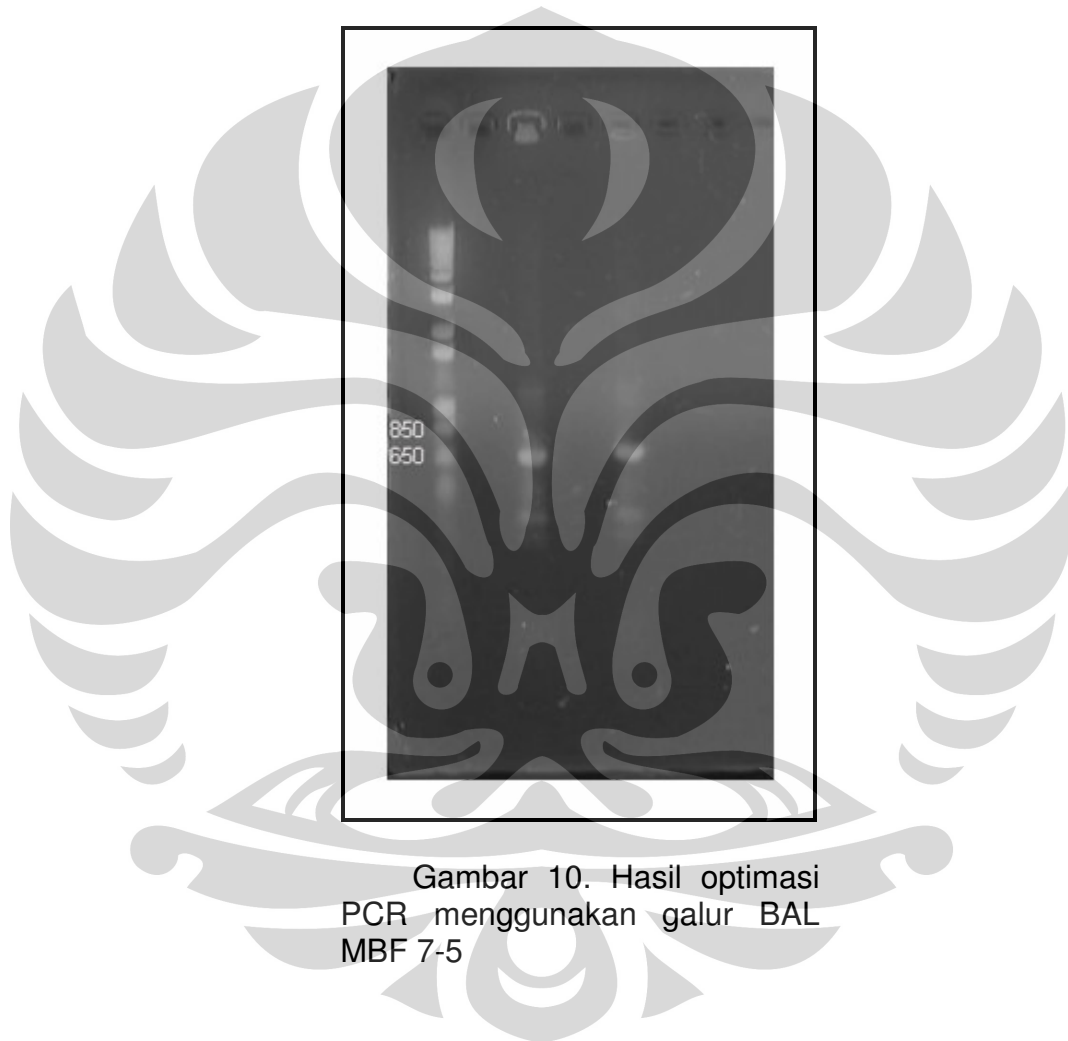
Gambar 7. 1 Kb Plus DNA Ladder



Gambar 8. Gene Ladder 100



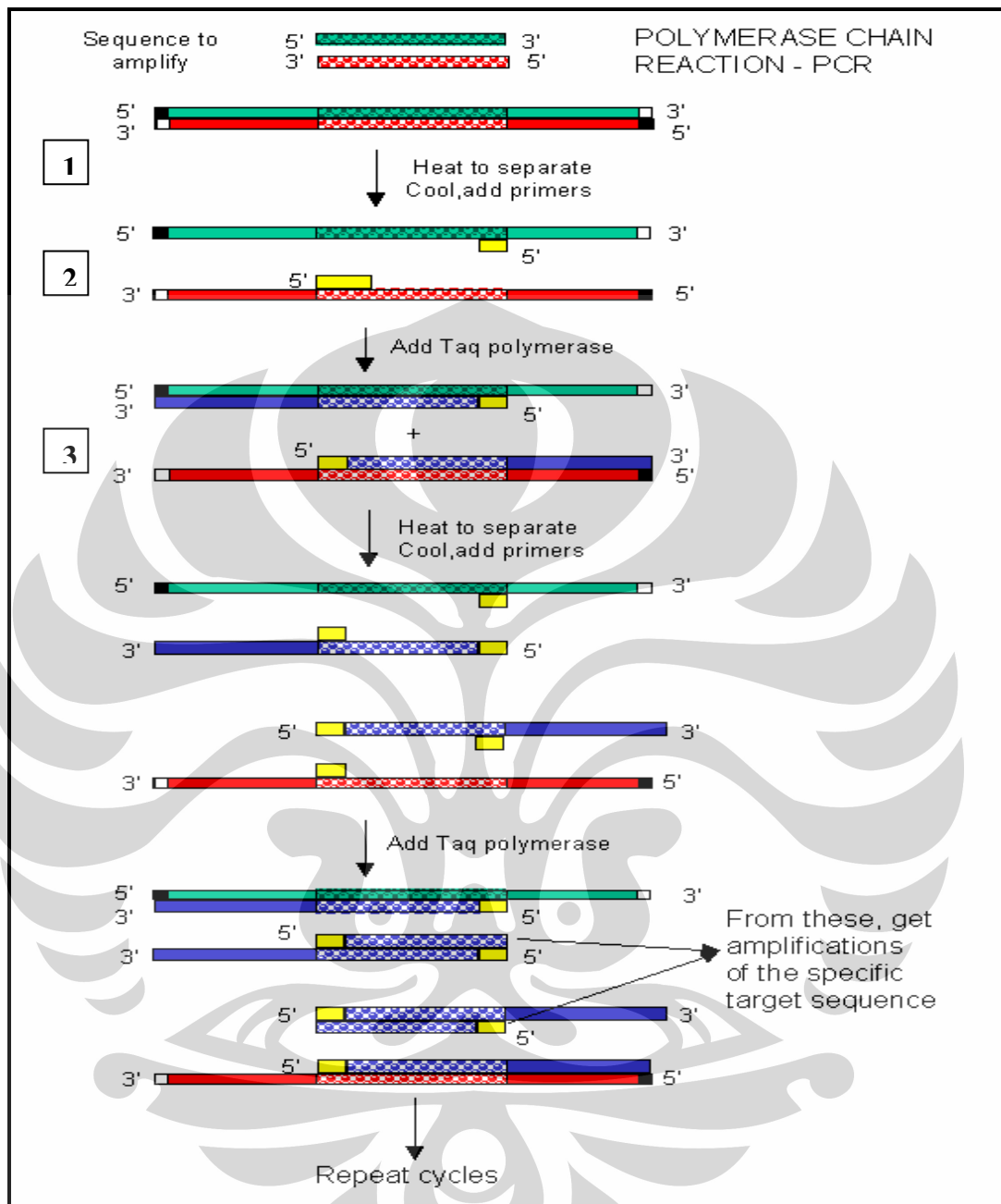
Gambar 9. Hasil ekstraksi DNA genomik galur BAL. 1. MBF 5-4; 2. MBF 7-15; 3. BJB 1; 4. CNC 7(1); 5. CNC 11; 6. PDG 3(1); 7. PDG 4; 8. PDG 10(1); 9. WRS 6; 10. MBF 6-13; 11. MBF 9-1; 12. MBF 10-2; 13. MBF 8-2; 14. CNC 3(2); 15. WRS 3; 16. WRS 5; 17. TISTR; 18. MBF 4-9; 19. MBF 5-14; 20. MBF 4-2; 21. MBF 7-5; 22. CNC 2(1); 23. CNC 6.



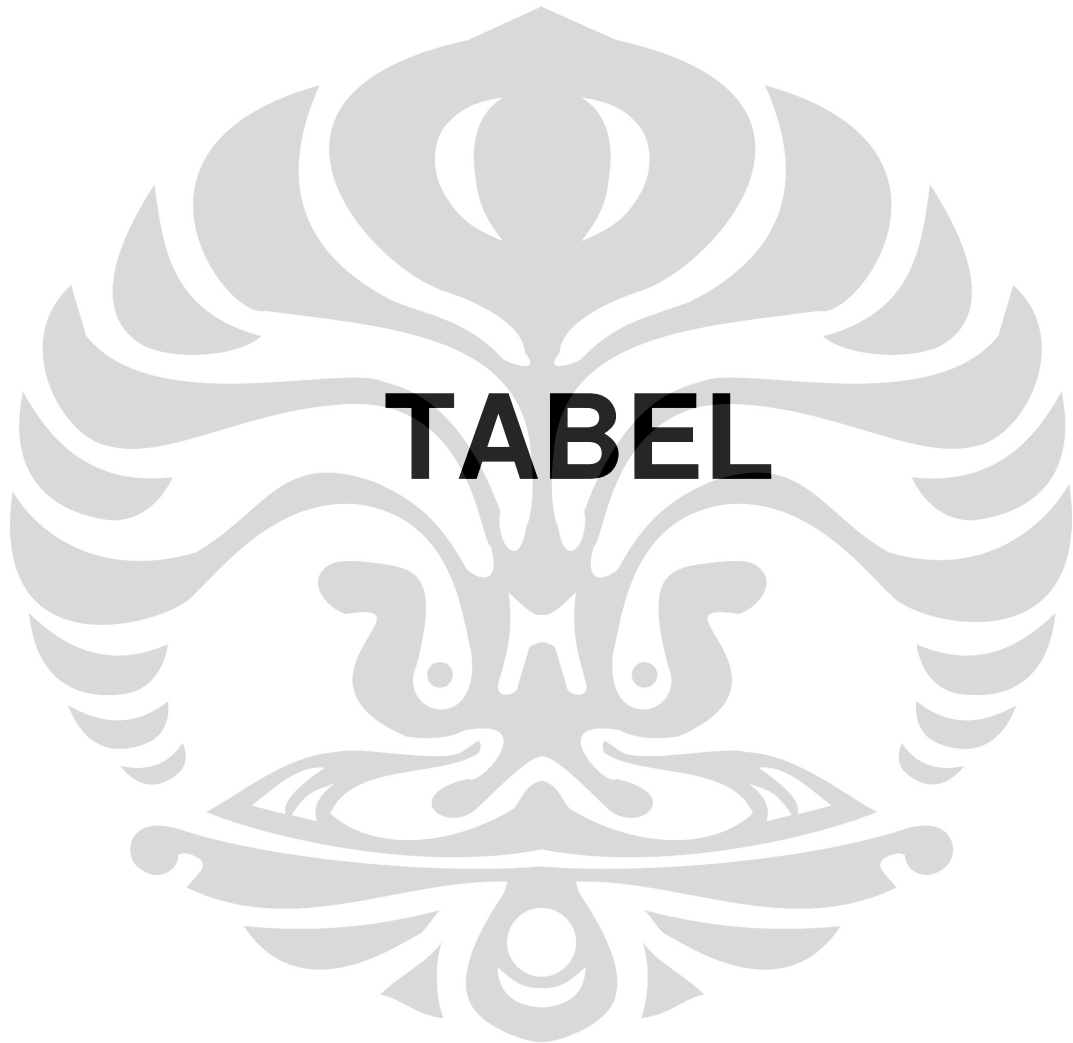
Gambar 10. Hasil optimasi PCR menggunakan galur BAL MBF 7-5



Gambar 11. Hasil identifikasi gen *ftf* pada koleksi galur BAL penghasil EPS dengan menggunakan primer *degenerate*. M. Gene Ladder 100bp; 1. TISTR; 2. MBF 8-2; 3. PDG 3(1); 4. PDG 4; 5. WRS 3; 6. CNC 11; 7. MBF 4-2; 8. MBF 7-5; 9. MBF 9-1; 10. MBF 10-2; 11. MBF 4-9; 12. MBF 5-4; 13. MBF 5-14; 14. MBF 6-13; 15. MBF 7-15; 16. BJG 1; 17. CNC 2(1); 18. CNC 3(2); 19. CNC 6; 20. CNC 7(1); 21. PDG 10(1); 22. WRS 5; 23. WRS 6



Gambar 12. Skema siklus amplifikasi PCR pada DNA gen target 1. Tahap denaturasi (peningkatan temperatur untuk memisahkan utas DNA) 2. Tahap pelekatan (penurunan temperatur sehingga primer (warna kuning) dapat membentuk ikatan hidrogen dengan ujung sekuens target) 3. Tahap pemanjangan (penambahan nukleotida ke ujung 3' masing-masing primer oleh *Taq polymerase*). Selanjutnya siklus berulang, amplicon siklus pertama akan menjadi DNA cetakan untuk siklus berikutnya, dan begitu seterusnya.



Tabel 1

Daftar galur BAL yang sudah teridentifikasi secara molekuler dengan 16s rDNA (10, 48)

No.	Nama Galur	Homologi (% identitas)	Identitas	Sumber, asal
1.	MBF 4-2	96	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Tanah
2.	MBF 4-9	-	-	Tanah
3.	MBF 5-4	100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Tanah
4.	MBF 5-14	-	-	Tanah
5.	MBF 6-13	-	-	Tanah
6.	MBF 7-5	100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Tanah
7.	MBF 7-15	-	-	Tanah
8.	MBF 8-2	96	<i>Weissella confusa</i>	Kedelai
9.	MBF 9-1	-	-	Ampas tahu
10.	MBF 10-2	100	<i>Streptococcus macedonicus</i>	Ampas tahu
11.	MBF BJG 1	93	<i>Leuconostoc citreum</i> *	Bajigur, Ciputat
12.	MBF CNC 2(1)	98	<i>Weissella confusa</i> *	Es Cincau, Ciputat
13.	MBF CNC 3(2)	-	-	Es Cincau, Ciputat
14.	MBF CNC 6	-	-	Es Cincau, Ciputat
15.	MBF CNC 7(1)	-	-	Es Cincau, Ciputat
16.	MBF CNC 11	99	<i>Weissella cibaria</i> *	Es Cincau, Ciputat
17.	MBF PDG 3(1)	-	-	Es Podeng, Ciputat
18.	MBF PDG 4	-	-	Es Podeng, Ciputat

Tabel 1 (lanjutan)

Daftar galur BAL yang sudah teridentifikasi secara molekuler dengan 16s rDNA (10, 48)

No.	Nama Galur	Homologi (% identitas)*	Identitas	Sumber, asal
19.	MBF PDG 10(1)	98	<i>Weissella confusa</i> *	Es Podeng, Ciputat
20.	MBF WRS 3	98	<i>Weissella cibaria</i> *	Wedang Ronde, Solo
21.	MBF WRS 5	100	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	Wedang Ronde, Solo
22.	MBF WRS 6	98	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	Wedang Ronde, Solo

\* Nomor akses GenBank : GU049407-GU056835



Tabel 2

Hasil pengamatan morfologi koloni galur BAL pada medium agar MRS dibandingkan dengan data penelitian sebelumnya

No	Nama isolat	Morfologi koloni data penelitian ini		Morfologi koloni data penelitian sebelumnya	
		Warna	Permukaan	Warna	Permukaan
		Putih			
1.	MBF 4-2	kekuningan	Halus	Coklat muda	Halus
2.	MBF 5-4	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
3.	MBF 7-5	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
4.	MBF 8-2	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
5.	MBF 9-1	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
6.	MBF 10-2	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
7.	MBF BJG 1	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
8.	MBF CNC 2(1)	Putih	Halus	Putih	Halus
9.	MBF CNC 3(2)	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
10.	MBF CNC 6	Putih	Halus	Putih	Halus
11.	MBF CNC 7(1)	Putih	Halus	Putih	Halus
12.	MBF CNC 11	Putih	Halus	Putih	Halus
13.	MBF PDG 3(1)	Putih	Halus	Kuning	Halus
14.	MBF PDG 4	Putih	Halus	Putih	Halus
15.	MBF PDG 10(1)	Putih	Halus	Putih kekuningan	Halus
16.	MBF WRS 3	Putih	Halus	Putih	Halus
17.	MBF WRS 5	Putih	Halus	Putih	Halus
18.	MBF WRS 6	Putih	Halus	Putih	Halus
19.	TISTR	Putih	Halus	-	-

Tabel 3

Hasil pengamatan amplikon dari 21 galur terpilih

No.	Nama Galur	Skrining gen	Amplikon (700 pb)
1.	TISTR	-	-
2.	MBF 8-2	<i>gtf, ftf</i>	+
3.	MBF PDG 3(1)	NI	+
4.	MBF PDG 4	NI	+
5.	MBF WRS 3	NI	+
6.	MBF CNC 11	<i>gtf</i>	-
7.	MBF 4-2	NI	+
8.	MBF 7-5	NI	+
9.	MBF 9-1	NI	-
10.	MBF 10-2	<i>gtf</i>	-
11.	MBF 4-9	NI	-
12.	MBF 5-4	NI	-
13.	MBF 5-14	NI	-
14.	MBF 6-13	NI	-
15.	MBF 7-15	NI	-
16.	MBF BJG 1	<i>gtf</i>	-
17.	MBF CNC 2(1)	NI	-
18.	MBF CNC 3(2)	NI	-
19.	MBF CNC 6	NI	-
20.	MBF CNC 7(1)	NI	-
21.	MBF PDG 10(1)	<i>gtf</i>	+
22.	MBF WRS 5	NI	-
23.	MBF WRS 6	<i>gtf</i>	+

Ket:

NI = Belum teridentifikasi

Tabel 4

## Kode genetik asam amino dan degenerasinya

Nukleotida pertama	Nukleotida kedua				Nukleotida ketiga
	U	C	A	G	
U	UUU = phe UUC = phe UUA = leu UUG = leu	UCU = ser UCC = ser UCA = ser UCG = ser	UAU = tyr UAC = tyr UAA = term UAG = term	UGU = cys UGC = cys UGA = term UGG = term	U C A G
C	CUU = leu CUC = leu CUA = leu CUG = leu	CCU = pro CCC = pro CCA = pro CCG = pro	CAU = his CAC = his CAA = gln CAG = gln	CGU = arg CGC = arg CGA = arg CGG = arg	U C A G
A	AUU = ile AUC = ile AUA = ile AUG = met	ACU = thr ACC = thr ACA = thr ACG = thr	AAU = asn AAC = asn AAA = lys AAG = lys	AGU = ser AGC = ser AGA = arg AGG = arg	U C A G
G	GUU = val GUC = val GUA = val GUG = val	GCU = ala GCC = ala GCA = ala GCG = ala	GAU = asp GAC = asp GAA = glu GAG = glu	GGU = gly GGC = gly GGA = gly GGG = gly	U C A G


Keterangan :

U = uridin; C = sitosin; A = adenin; G = guanin; gly = glisin; ala = alanin; leu = leusin; ile = isoleusin; ser = serin; thr = treonin; tyr = tirosin; cys = sistein; met = metionin; asp = asam aspartat; asn = asparagin; glu = asam glutamat; glu = glutamin; arg = arginin; lys = lisin; his = histidin; phe = fenilalanin; trp = triptofan; pro = prolin



# LAMPIRAN

Lampiran 1  
Spesifikasi Primer LevV



**Product specification**

Customer id: Sentra-BD  
Nancy Kapantow  
nancy.kapantow@sentrabd.com  
Sentra Biosains Dinamika  
Biosains

*Deliver to:* Djonady Sugriamah Sentra BD Ruko  
Cempaka Mas Building O-26 Letjen Suprpto  
Jakarta 10640 Indonesia

*Invoice reference:* None  
*Invoice address:* customer number 1453


**General information**  
**Volume:** Your oligo is originally dissolved in 450 ul 20% acetonitrile. We normally use 20 ul for Absorbency readings. The final volume might vary slightly.  
**Lyophilized oligos:** Should be dissolved in 430 ul of desired solution in order to receive the concentration mentioned in the report and on the tube.  
**Storage:** In general non-labelled oligonucleotides can be stored for more than a year with little or no degradation. They can be stored in media (such as water, ammonia, 20% acetonitrile, dilute buffer containing EDTA, salt etc.) or as a dry pellet. The most important is to keep them cold to avoid bacterial growth and minimize degradation. Avoid storing oligos in solutions that are mutagenic, oxidizing or outside the pH range of 2-12. If you prefer storing your oligo freeze dried, please note that too many freeze drying cycles might degrade your oligo. Make aliquots before drying it! Dye-labelled oligos should be stored when lyophilized in the dark at -20 degree Celsius. Dye-labelled oligos should be stable for at least one year in lyophilized form. Dye primers are stable for at least one month in solution when stored at -20 degree Celsius in the dark. For maximum stability, limit both the number of freeze thaw cycles and the exposure to light. If you have any questions please do not hesitate to contact us.  
Good luck with your new oligo!

**Oligo Data**  
Order number: 34823  
Lab number: 138825  
Order date and time: Fri Oct 10 03:53:46 2008  
Oligo name: LevV (F)  
Oligo comment: None  
Sequence:  
GAY GTI TGG GAY WSI TGG C  
Total length: 19  
Number modifications: 2  
Unmodified length: 17  
5' modification: none  
3' modification: none  
Internal modification: Inosine  
Int. mod. positions:  
Scale: 0.05  
Purification: Cartridge  
Delivery: Standard  
Delivery form: Freeze dried

Synthesis date and time: Wed Oct 29 07:55:17 2008  
Unmodified mol weight: 5283.08  
Modified mol weight: 5911.46  
Od: 12.46  
Concentration [pmol/ul]: 173.02  
Yield [micro gram]: 460.27  
T(m): 49.43  
T(a): 44.43  
C/G content: 42.10

## Lampiran 2

### Spesifikasi Primer LevR



CYBERGENE AB

**Product specification**

Customer id: Sentra-BD  
Nancy Kapantow  
nancy.kapantow@sentrabd.com  
Sentra Biosains Dinamika  
Biosains

*Deliver to:* Djonady Sugiaman Sentra BD Ruko  
Gempaka Mas Building O-26 Letjen Suprpto  
Jakarta 10640 Indonesia

*Invoice reference:* None  
*Invoice address:* customer number 1453

**General information**  
**Volume:** Your oligo is originally dissolved in 450 ul 20% acetonitrile. We normally use 20 ul for Absorbency readings. The final volume might vary slightly.  
**Lyophilized oligos:** Should be dissolved in 430 ul of desired solution in order to receive the concentration mentioned in the report and on the tube.  
**Storage:** In general non-labelled oligonucleotides can be stored for more than a year with little or no degradation. They can be stored in media (such as water, ammonia, 20% acetonitrile, dilute buffer containing EDTA, salt etc.) or as a dry pellet. The most important is to keep them cold to avoid bacterial growth and minimize degradation. Avoid storing oligos in solutions that are mutagenic, oxidizing or outside the pH range of 3-12. If you prefer storing your oligo freeze dried, please note that too many freeze drying cycles might degrade your oligo. Make aliquots before drying it! Dye-labelled oligos should be stored when lyophilized in the dark at -20 degree Celsius. Dye-labelled oligos should be stable for at least one year in lyophilized form. Dye primers are stable for at least one month in solution when stored at -20 degree Celsius in the dark. For maximum stability, limit both the number of freeze thaw cycles and the exposure to light. If you have any questions please do not hesitate to contact us.  
Good luck with your new oligo!

**Oligo Data**  
Order number: 34823  
Lab number: 138824  
Order date and time: Fri Oct 10 03:48:54 2008  
Oligo name: LevR (R)  
Oligo comment: None  
Sequence:  
TCI TYY TCR TCI SWI RMC AT  
Total length: 20  
Number modifications: 3  
Unmodified length: 17  
5' modification: none  
3' modification: none  
Internal modification: Inosine  
Int. mod. positions:  
Scale: 0.05  
Purification: Cartridge  
Delivery: Standard  
Delivery form: Freeze dried

Synthesis date and time: Wed Oct 29 07:55:17 2008  
Unmodified mol weight: 5084.96  
Modified mol weight: 6027.53  
Od: 4.29  
Concentration [pmol/ul]: 61.97  
Yield [micro gram]: 168.10  
T(m): 47.89  
T(a): 42.89  
C/G content: 20.00

### Lampiran 3

Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian (49, 50)

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Natrium hidroksida 1 N	Sebanyak 4 g natrium hidroksida dilarutkan dalam akuades hingga tepat 100 mL.
2.	Asam klorida 1 N	Sebanyak 8,33 mL larutan asam klorida pekat 12 N ditambahkan akuades hingga tepat 100 mL.
3.	Natrium klorida 4 M	Sebanyak 93,6 g natrium klorida dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 400 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
4.	Dapar STET	Sebanyak 32 g sukrosa, 2,42 g tris base, dan 7,4448 g Na <sub>2</sub> EDTA dilarutkan dalam sejumlah akuabides. Kemudian 0,4 mL triton x-100 ditambahkan ke dalam larutan tersebut, kocok hingga homogen. pH larutan disesuaikan hingga 8,0. Kemudian tambahkan akuabides hingga tepat 400 mL dan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

### Lampiran 3 (lanjutan)

Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian (49, 50)

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
5.	Tris base 1 M	Sebanyak 24,228 g tris base dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 200 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
6.	Tris HCl 10 mM PH 8	Sebanyak 0,4 mL tris base 1 M dilarutkan dalam sedikit akuabides. pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan HCl 1 N. Lalu tambahkan dengan akuabides hingga tepat 40 mL. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
7.	Lisozim 10 mg/mL	Sebanyak 10 mg lisozim dilarutkan dalam 1 mL tris HCl 10 mM, pH 8,0. Larutan disimpan dalam freezer -20 <sup>0</sup> C.
8.	SDS (Sodium dodesil sulfat) 10%	Sebanyak 10 g sodium dodesil sulfat dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL.
9.	Alkohol 70%	Sebanyak 73 ml etanol 96% P diencerkan dengan akuabides hingga 100 ml.



### Lampiran 3 (lanjutan)

Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian (49, 50)

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
10.	Proteinase K 25 mg/mL	Sebanyak 25 mg Proteinase K dilarutkan dalam 1 mL akuabides sambil divortex. Larutan disimpan dalam <i>freezer</i> -20 <sup>0</sup> C.
11.	Asam asetat 1 N	Sebanyak 10 mL larutan asam asetat glasial 12 N ditambahkan akuabides hingga tepat 120 mL.
12.	Dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 50 X	Sebanyak 24,2 g tris base, 5,71 mL asam asetat glasial, dan 10 mL Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M dilarutkan dalam akuabides. Kemudian pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan asam asetat 1 N dan tambahkan dengan akuabides hingga 100 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
13.	Dapar TAE 1 X	Sebanyak 5 mL dapar TAE 50 X dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 250 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

### Lampiran 3 (lanjutan)

Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian (49, 50)

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
14.	CTAB ( <i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> )	Sebanyak 2,925 g natrium klorida dilarutkan dalam akuabides secukupnya. Sebanyak 5 g CTAB dilarutkan dalam akuabides dengan cara memasukkan CTAB sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan <i>magnetic stirrer</i> dan dipanaskan di atas <i>hotplate</i> . Kemudian masukkan larutan natrium klorida yang telah dibuat sebelumnya ke dalam larutan CTAB dan tambahkan dengan akuabides hingga tepat 100 mL. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
15.	Na <sub>2</sub> EDTA (Dinatrium edetat) 0,5 M	Sebanyak 18,6 g Na <sub>2</sub> EDTA dilarutkan dalam sedikit akuabides. Larutan ditambahkan natrium hidroksida hingga larut dan hingga pH 8,0. Lalu tambahkan akuabides hingga tepat 100 mL. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit

## Lampiran 4

Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses PCR

### ***PureTaq Ready – To – Go PCR Beads [Amersham Biosciences] (39)***

Untuk volume reaksi 25  $\mu\text{L}$  :

<i>PureTaq DNA polymerase</i>	0,1 U/ $\mu\text{L}$
dNTP ( dATP, dCTP, dTTP, dGTP ) masing- masing	200 $\mu\text{M}$
Tris HCl PH 9,0	10 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM

### **Perhitungan campuran PCR dengan *RTG PCR Beads***

Untuk proses PCR menggunakan DNA cetakan 3  $\mu\text{L}$

1 RTG bead	(1,25 U/reaksi)
Primer LevV 100 pmol/ $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$ (4 $\mu\text{M}$ /reaksi)
Primer LevR 100 pmol/ $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$ (4 $\mu\text{M}$ /reaksi)
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	6 $\mu\text{L}$ (3,75 mM/reaksi)
Air MilliQ	<u>34</u> $\mu\text{L}$ +
Volume total	44 $\mu\text{L}$

#### Lampiran 4 (lanjutan)

Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses PCR

Volume total dibagi menjadi 2 *microtube* masing-masing 22  $\mu\text{L}$

Campuran PCR 22  $\mu\text{L}$

DNA cetakan 3  $\mu\text{L}$  +

Volume total reaksi 25  $\mu\text{L}$

Sumber : Dr. Amarila Malik, MSi

