

**Modifikasi Metode PCR Dalam Penentuan Identitas Bakteri Asam Laktat  
Dari Koleksi Isolat Yang Berasal Dari Berbagai Jenis Minuman  
Fermentasi Yang Mengandung Kultur Probiotik Menggunakan Metode  
16S rDNA**

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

**Liliana Saragih**

**0305250336**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**DEPARTEMEN FARMASI**

**DEPOK**

**2008**

**Modifikasi Metode PCR Dalam Penentuan Identitas Bakteri Asam Laktat  
Dari Koleksi Isolat Yang Berasal Dari Berbagai Jenis Minuman  
Fermentasi Yang Mengandung Kultur Probiotik Menggunakan Metode  
16S rDNA**

**Oleh:**

**Liliana Saragih**

**0305250336**



**DEPOK**

**2008**

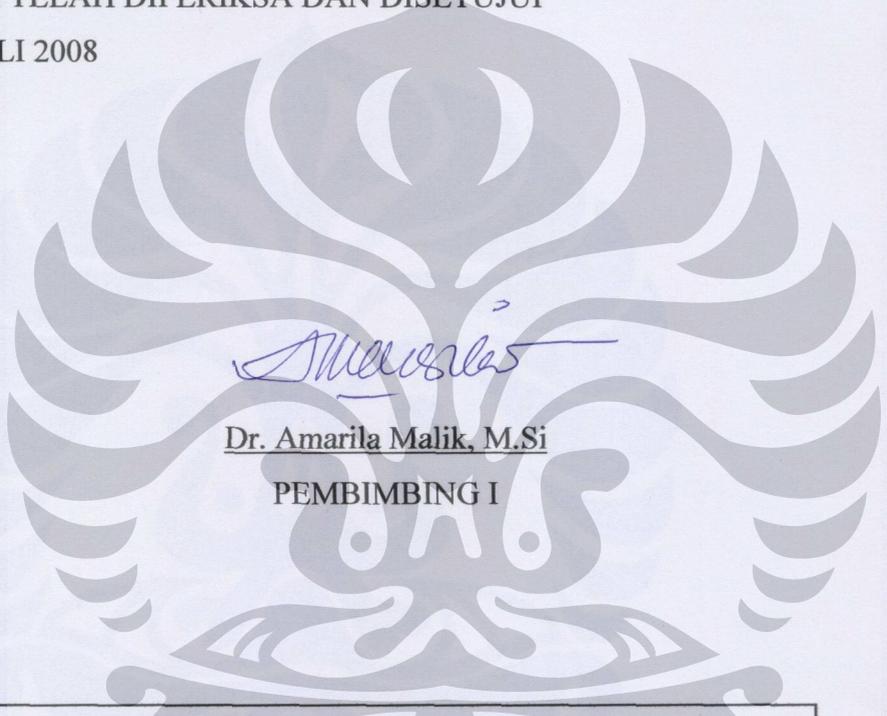
SKRIPSI : MODIFIKASI METODE PCR DALAM PENENTUAN  
IDENTITAS KOLEKSI BAKTERI ASAM LAKTAT HASIL  
ISOLASI DARI BERBAGAI MINUMAN FERMENTASI  
MENGUNAKAN 16rDNA

NAMA : LILIANA SARAGIH

NPM : 0305250336

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2008



*Amarila Malik*  
Dr. Amarila Malik, M.Si

PEMBIMBING I

Tanggal Lulus Ujian Sarjana:.....

Penguji 1 : Dr. Abdul Mun'im, MS..... *Abdul Mun'im*

Penguji II : Dr. Yahdiana Harahap, MS..... *Yahdiana Harahap*

Penguji III : Sutriyo, M.Si..... *Sutriyo*

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yesus karena atas kasih karunia dan anugerahNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul "Modifikasi Metode PCR Dalam Pemeriksaan Identitas Koleksi Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi Dari Berbagai Minuman Fermentasi Menggunakan 16S rDNA"

Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis tidak lepas dari bantuan dari banyak pihak untuk itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Amarila Malik, M.Si selaku pembimbing yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian ini, dan yang telah memberikan banyak bimbingan, pengarahan, saran, ilmu, dan bantuan yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Dr. Maksum Radji, M.Biomed selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
3. Dr. Abdul Mun'im, M.si selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.

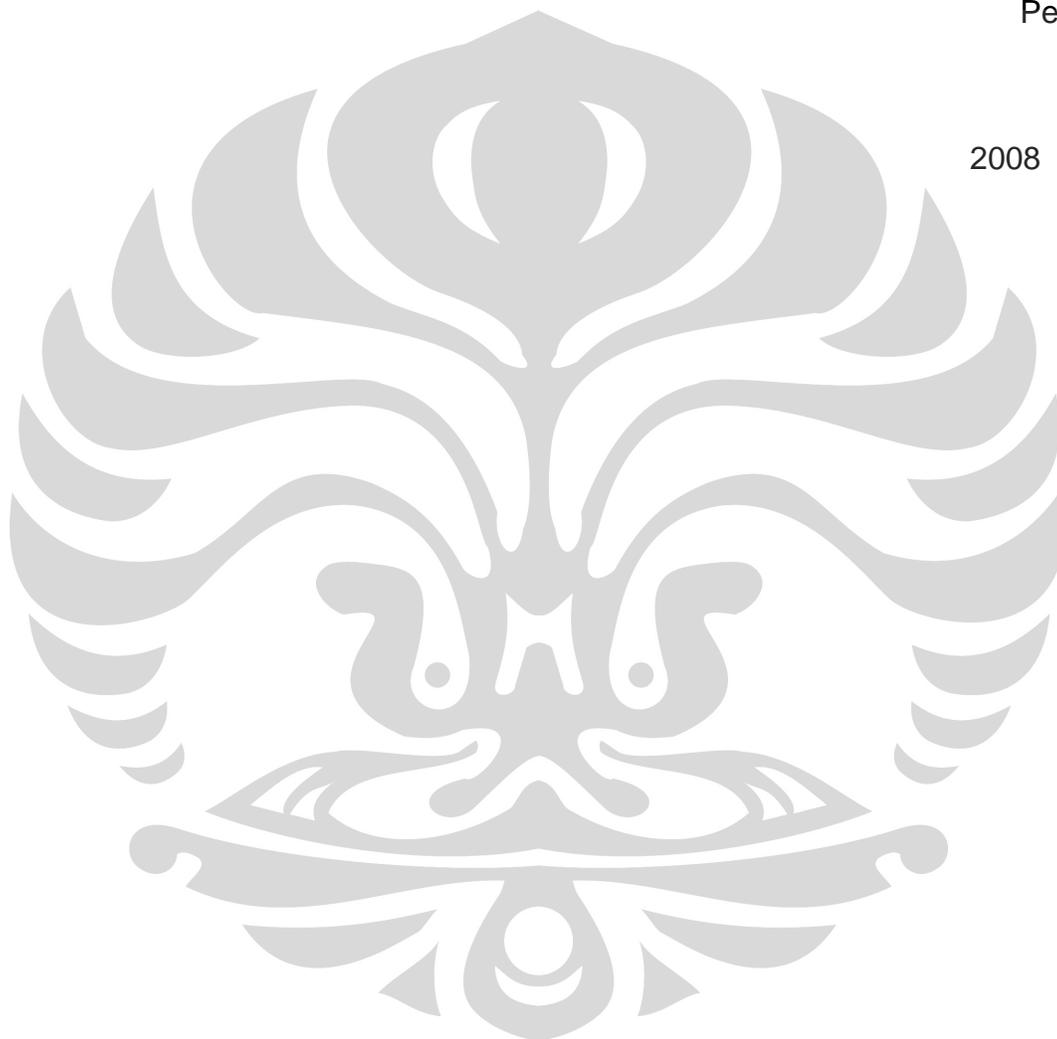
4. Drs. Hayun, M.Si, selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Program Ekstensi Farmasi UI.
5. Dr. Atiek Soemiati, Ms, selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Seluruh dosen, laboran, dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
7. Kedua orang tuaku, serta adikku tersayang yang telah memberikan kasih sayang, semangat, dukungan doa dan bantuan selama ini. Ibu Lia atas semangat dan dukungan doa.
8. Indriani atas bantuannya selama penelitian berlangsung
9. Teman seperjuanganku, Anglia, Arum, Ajit, Tyas, serta Yuyun dan geng endofit lainnya. Mba Catur dan Mas Tri atas bantuannya selama penelitian berlangsung.
10. Seluruh rekan Ekstensi farmasi angkatan 2005, terutama Ari dan Vira atas kebersamaannya selama di HT juga di UI. Christina, Indah, Dita, Christin, Yunita atas kenangan yang telah diberikan selama penulis menempuh pendidikan.
11. Semua pihak yang telah membantu penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran-saran yang membangun untuk

melengkapi skripsi ini. Namun, besar harapan penulis agar penelitian ini dapat bermanfaat dalam dunia farmasi dan masyarakat pada umumnya.

Penulis

2008



## ABSTRAK

Bakteri asam laktat (BAL) disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *generally recognized as safe* (GRAS) yaitu mikroorganisme yang tidak berisiko terhadap kesehatan. BAL penting pada industri produk susu, sebab BAL digunakan sebagai zat pengasam pada susu. Yoghurt merupakan salah satu produk susu yang menggunakan bakteri asam laktat untuk fermentasi. Hampir semua produk susu ini mengklaim bahwa produk mereka mengandung kultur hidup probiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ulang 6 isolat BAL yang telah diisolasi sebelumnya dari berbagai minuman susu menggunakan teknik molekular dengan melakukan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan sekuensing DNA menggunakan primer oligonukleotida. Primer-primer 16S rDNA yang digunakan pada penelitian ini adalah spesifik dengan bakteri asam laktat seperti yang telah dilaporkan dalam beberapa

penelitian. Enam isolat yang ditumbuhkan kembali pada medium agar MRS yang kemudian diinokulasi ke dalam medium MRS cair untuk dilakukan ekstraksi DNA. *Genomic* DNA diperoleh dari 5 isolat BAL yang digunakan sebagai cetakan dalam PCR, sementara *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 120 adalah kontrol positif. Hasil yang diperoleh hanya 1 amplikon berhasil diidentifikasi, namun bukan termasuk BAL, yaitu *Staphylococcus saprophyticus*.

Kata kunci: Bakteri asam laktat, susu fermentasi, probiotik, identifikasi molecular, PCR, 16S rDNA.

Xi + 73 hlm.; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi: 43 (1990-2007)

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are food grade microorganism or known as microorganism that possess generally recognized as safe (GRAS). LAB are important in dairy product industry, because they have been used as an acid substance in milk. Yoghurt is one of the dairy product that uses LAB for fermentation. Almost all of this dairy product claim that they contain living culture of probiotics in their product. The aim of this study was to identify six isolates of LAB isolated previously from various dairy product samples by molecular technique performing Polymerase Chain Reaction and DNA sequencing using 16S rDNA oligonucleotide primers. The 16S rDNA primers used in this study is highly specific for lactic acid bacteria as reported in several studies. Six isolates of LAB were chosen to be reconfirmed compare to previous study. LAB were grown on de Man Rogosa Sharpe agar medium and were subsequently inoculated into MRS broth for DNA

extraction. Genomic DNA obtained from 5 LAB isolates were used as template in PCR whereas *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 120 was the positive control. Result revealed that only one amplicon was identified successfully, but not the member of LAB, however, i.e *Staphylococcus saprophyticus*.

Keyword: Lactic Acid Bacteria, probiotic, molecular identification, PCR, 16S  
rDNA.

Xi + 73 pages; figures; tables; appendixes

Bibliography: 43 (1990-2007)

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Tujuan penelitian .....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
A. Bakteri Asam Laktat .....	4



B. Probiotik .....	6
C. Identifikasi Konvensional Bakteri Asam Laktat .....	8
D. Identifikasi Molekular .....	9
E. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	13
F. Elektroforesis Gel Agarosa.....	19
G. Teknik Sekuensing DNA.....	20
H. Metode BLAST.....	22
BAB III. BAHAN, ALAT, CARA KERJA .....	23
A. Lokasi .....	23
B. Bahan .....	23
C. Alat .....	24
D. Pembuatan Medium.....	25
E. Cara Kerja .....	28
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	36
A. Hasil .....	36
B. Pembahasan .....	38

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....48

    A. Kesimpulan .....48

    B. Saran .....48

DAFTAR ACUAN .....49

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 1. <i>Microsentrifuse</i> .....	53

Gambar 2.	<i>Microsentrifuse</i> Mini Spin.....	53
Gambar 3.	Elektroforesis Gel Mini.....	54
Gambar 4.	Dri-Bath Type 17600.....	54
Gambar 5.	UV-Transluminator yang terhubung dengan computer.....	55
Gambar 6.	<i>Thermal Cycler</i> .....	55
Gambar 7.	Koloni bakteri hasil purifikasi dari kultur stok beku pada medium agar MRS.....	56
Gambar 8	Hasil Identifikasi Bakteri Asam Laktat berdasarkan 16S rDNA menunjukkan amplicon sekitar 700 pb.....	57



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Isolat .....	58
Tabel 2. Daftar Sampel Minuman Susu fermentasi .....	59
Tabel 3. Hasil Pengamatan Amplikon Dari 6 Isolat Terpilih .....	61
Tabel 4. Hasil Analisis Sekuens Dari 6 Amplikon Yang Terpilih .....	62
Tabel 5. Perbandingan Kandungan Bakteri Asam Laktat (BAL) Sampel Dari Hasil Identifikasi .....	63

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi Medium.....	64
Lampiran 2. Cara Pembuatan Reagen Yang Digunakan Dalam Penelitian .....	65
Lampiran 3. Komposisi Larutan Dan Perhitungan Yang Dipergunakan Pada Proses PCR .....	68
Lampiran 4. Perbandingan sekuens DNA S.IX.B dengan sekuens pada GenBank.....	69
Lampiran 5. Elektrogram hasil sekuensing DNA S.IX.B:	

*Staphylococcus saprophyticus*..... 71  
Lampiran 6 bagan Alur Kerja Pada Penelitian.....72



# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Fermentasi merupakan kegiatan mikroba pada bahan pangan sehingga dihasilkan produk yang dikehendaki. Teknologi fermentasi merupakan salah satu cara pengolahan dan pengawetan makanan, baik secara konvensional, maupun modern (1). Mikroba yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir, dan kapang. Contoh bakteri yang digunakan dalam fermentasi makanan maupun minuman adalah bakteri asam laktat (BAL) yang merupakan bakteri yang menguntungkan.

Peran utama bakteri ini dalam industri makanan adalah untuk pengasam bahan mentah dengan memproduksi sebagian besar asam laktat (bakteri homofermentatif) atau asam laktat, asam asetat, etanol dan CO<sub>2</sub> (bakteri heterofermentatif) (2).

Bakteri asam laktat juga berfungsi sebagai probiotik. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang terdapat pada saluran cerna dalam jumlah tertentu, yang memiliki manfaat kesehatan melebihi makanan pokok alami (3). Beberapa turunan dari bakteri asam laktat memiliki peranan penting dalam kesehatan, yaitu merupakan mikroflora yang menguntungkan dalam saluran pencernaan, karena membantu menurunkan

derajat keasaman dan menghambat pertumbuhan organisme pengganggu dalam sistem pencernaan (4).

Pada penelitian terdahulu telah dilakukan penerapan metode molekuler untuk memeriksa identitas BAL dari berbagai produk fermentasi berbahan dasar susu dari berbagai produk yang sudah beredar di pasaran. Penelitian tersebut bertujuan untuk mengkonfirmasi kandungan BAL dengan penerapan 16S rDNA menggunakan PCR (5). Namun ternyata hasil menunjukkan ketidak sesuaian identitas hasil PCR dengan pernyataan kandungan BAL. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dianalisa kembali teknik PCR yang telah dilakukan.

Perbedaan hasil yang diperoleh dari penelitian tersebut dapat disebabkan karena DNA yang kurang murni dan konsentrasi yang rendah sehingga menyebabkan kesalahan baca sekuens. Di dalam satu reaksi kemungkinan terdapat lebih dari satu fragmen DNA. Fragmen tersebut dapat berupa ampikon-ampikon yang dihasilkan dari proses PCR, maupun berupa kontaminasi dari primer oligonukleotida yang berlebih, ataupun cetakan DNA yang berlebih. Selain masalah kemurnian, kemungkinan lainnya adalah adanya variasi genetik dalam kelompok BAL. Namun demikian masih diperoleh beberapa kandungan BAL yang sesuai dengan pernyataan produsen masing-masing (5).

PCR merupakan teknik yang cepat, sederhana namun adekuat untuk mengamplifikasi sejumlah kecil sekuens DNA spesifik menjadi berjuta kali

lebih banyak hanya dalam waktu beberapa jam. Namun ada enzim *Taq polymerase* yang menunjukkan kelemahan dalam hal menginkorporasikan basa nukleotida yang salah dibandingkan yang lainnya. Oleh karena itu dilakukan modifikasi metode PCR dalam pemeriksaan identitas koleksi bakteri asam laktat hasil isolasi dari berbagai minuman fermentasi menggunakan 16S rDNA yang spesifik pada organisme prokariot, terutama BAL.

#### **B. TUJUAN PENELITIAN**

Menerapkan metode PCR yang dimodifikasi untuk mengidentifikasi kembali isolat-isolat BAL hasil isolasi dari berbagai minuman fermentasi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

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

Istilah bakteri asam laktat mulanya ditujukan hanya untuk sekelompok bakteri yang menyebabkan keasaman pada susu. Secara umum bakteri asam laktat (BAL) didefinisikan sebagai suatu kelompok bakteri gram positif, berbentuk bulat atau panjang, tidak bersifat motil, tidak menghasilkan spora, tidak membentuk pigmen, yang memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama fermentasi karbohidrat dan tumbuh pada pH lingkungan yang rendah (2, 7, 8, 9). Asam yang dihasilkannya dapat menurunkan pH dan menghambat berkembangnya bakteri yang hidup pada suasana netral maupun alkali (7). Semua BAL bersifat fakultatif aerob, yaitu BAL dapat hidup pada keadaan adanya oksigen, tetapi tidak dapat menggunakannya untuk respirasi, sebaliknya satu-satunya cara BAL memperoleh energi adalah melalui fermentasi gula (2, 10). Semua bakteri asam laktat dapat tumbuh secara anaerobik, namun tidak seperti bakteri yang bersifat anaerob lainnya, dimana bakteri asam laktat dapat tumbuh dengan adanya oksigen (2).

Bakteri asam laktat termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya tidak toksik dan tidak

menghasilkan toksin karena tidak dapat membusukkan protein sehingga tidak dapat menghasilkan senyawa beracun, maka disebut *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *generally recognized as safe* (GRAS) yaitu mikroorganisme yang tidak berisiko terhadap kesehatan, bahkan beberapa jenis bakteri tersebut berguna bagi kesehatan. Bakteri asam laktat bermanfaat untuk peningkatan kualitas higiene dan keamanan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap mikroorganisme berbahaya yang bersifat patogen. Karena asam laktat yang dihasilkan BAL mencegah pertumbuhan organisme lain, terutama jika pH diturunkan sampai 4,0-5,0, maka prinsip ini yang digunakan untuk pembuatan acar, *sauerkraut*, dan *kim chee*. Selain itu BAL juga penting pada industri produk susu, sebab BAL merupakan zat pengasam pada susu (2, 10).

Bakteri asam laktat dikelompokkan ke dalam beberapa genus antara lain *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, dan *Weissella*. Diantara genus dan spesies BAL yang mempunyai potensi untuk digunakan sebagai probiotik adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Pediococcus* (8, 9). Isolat bakteri yang tumbuh pada pH 3,5 mempunyai sifat tahan asam, yaitu genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, dan *Streptococcus* (7).

Secara fisiologis bakteri asam laktat dibagi menjadi dua golongan yaitu golongan homofermentatif dimana mampu mengkonversi glukosa menjadi asam laktat lebih dari 85%, sedangkan golongan heterofermentatif

hanya mampu mengkonversi sebanyak 50% dan menghasilkan produk akhir lainnya berupa alkohol, asam asetat dan gas CO<sub>2</sub>. Bakteri asam laktat homofermentatif mampu menghasilkan enzim fruktosa difosfat aldolase sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif mampu menghasilkan enzim glukosa-6-fosfat dehidrogenase dan 6-fosfoglukonat dehidrogenase.

## B. PROBIOTIK

Istilah probiotik bersal dari bahasa Yunani dan artinya adalah "*for life*" untuk menggambarkan substansi yang dikeluarkan oleh suatu mikroorganisme. Berdasarkan definisi WHO/FAO, probiotik adalah bakteri hidup yang apabila diberikan dalam jumlah yang sesuai akan memberikan efek yang menguntungkan pada tubuh manusia (11).

Istilah probiotik pertamakali diperkenalkan oleh seorang peneliti Rusia bernama Ilya Ilyich Mechnikov atau dikenal juga dengan nama Eli Metchnikoff (1845-1916), yang melakukan banyak penelitian mengenai mikrobiologi dan sistem kekebalan tubuh dan bekerja di Institut Pasteur, Paris. Beliau membuat teori bahwa yoghurt dan kandungan bakteri asam laktatlah yang membuat orang Bulgarian memiliki kesehatan dan usia serta harapan hidup yang panjang dan mengkonsumsi yoghurt dapat mencegah penuaan (12).

Probiotik adalah kultur (mikroba) hidup dalam suplemen makanan yang menguntungkan dan mempengaruhi hewan inang dengan

mengembangkan keseimbangan mikroorganisme tersebut dalam saluran pencernaan. Oleh karena itu bertujuan untuk menghasilkan efek yang menguntungkan pada inang dengan mendistribusikan mikroorganisme hidup seperti yang ditemukan dalam yogurt dan makanan fermentasi lainnya (11).

Pangan probiotik merupakan pangan (makanan atau minuman) yang mengandung sejumlah bakteri hidup yang memberi efek yang menguntungkan kesehatan. Pangan probiotik yang telah lama dikenal antara lain produk susu fermentasi oleh bakteri asam laktat, seperti yogurt. Selain mempunyai nutrisi yang baik, produk tersebut dianggap memberi manfaat kesehatan dan terapeutik. Manfaat ini diperoleh akibat terbawanya bakteri-bakteri hidup ke dalam saluran pencernaan yang mampu memperbaiki komposisi mikroflora usus sehingga mengarah pada dominasi bakteri-bakteri yang menguntungkan kesehatan (3).

Setelah masuk ke dalam tubuh, probiotik harus dapat bertahan hidup dalam kondisi lingkungan lambung yang asam serta di dalam usus yang terdapat enzim-enzim pankreas dan empedu yang bersifat basa. Setelah mencapai usus halus bagian bawah, probiotik membentuk koloni di lapisan mukosa usus. Koloni probiotik inilah yang dapat meningkatkan sistem kekebalan usus, dengan cara menggantikan posisi bakteri patogen, menghasilkan antioksidan dan antimutagen, dan efek lainnya yang bermanfaat bagi manusia (13).

Suatu mikroorganisme dapat menjadi probiotik yang efektif dalam memberi efek kesehatan, sebaiknya: 1) mengandung sejumlah besar sel hidup, 2) stabil terhadap asam maupun cairan empedu, 3) dapat menempel pada sel intestin manusia, 4) tidak bersifat patogen dan tidak toksik, 5) mampu bertahan hidup dan melakukan metabolisme dalam usus, 6) dapat hidup selama pengolahan dan penyimpanan, 7) tidak menyebabkan penyakit, 8) dan tidak resisten terhadap antibiotik (11).

Prebiotik adalah suatu bahan makanan yang dapat memberikan pengaruh menguntungkan bagi kesehatan karena dapat menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas berbagai mikroba di dalam saluran pencernaan. Kombinasi antara probiotik dan prebiotik disebut sinbiotik (11).

### **C. IDENTIFIKASI KONVENSIONAL BAKTERI ASAM LAKTAT**

Pada identifikasi konvensional, pencirian suatu mikroorganisme didasarkan pada bentuk morfologi dan karakterisasi yang diteliti dengan mikroskop, teknik pewarnaan, motilitas, seleksi medium, seleksi nutrisi, tes biokimia, penentuan komponen kimiawi dan sebagainya. Identifikasi dan karakterisasi BAL dilakukan dengan teknik pewarnaan gram, aktivitas enzim katalase, keberadaan spora dan kemampuannya untuk tumbuh dalam medium *De Man Rogosa Sharp* (MRS) pada suhu tertentu (10, 14).

BAL memiliki kebutuhan nutrisi yang kompleks. Selain karbohidrat, BAL juga membutuhkan asam amino, peptida, asam lemak atau ester asam lemak, derivat asam nukleat, dan vitamin untuk tumbuh ( 15)

Bentuk morfologi sel bakteri asam laktat diamati menggunakan mikroskop dan terdapat dalam bentuk batang ataupun bulat. BAL merupakan bakteri fakultatif anaerob yang dapat tumbuh dengan adanya oksigen, tetapi tidak menggunakan oksigen tersebut dalam proses respirasi. Ketika terpapar oksigen, maka BAL akan memproduksi hidrogen peroksida yang bersifat racun terhadap sel, namun BAL tidak mampu menghasilkan enzim katalase yang berfungsi untuk mendegradasi peroksida dan karenanya disebut sebagai organisme yang bersifat katalase negatif. Sebagai gantinya, BAL memiliki enzim lain, yaitu peroksidase yang dapat mendegradasi hidrogen peroksida. Selain itu, BAL juga memiliki enzim superoksida dismutase, yakni dapat mendekomposisi superoksida yang merupakan bentuk toksik dari oksigen. Oleh karena kerja enzim-enzim tersebut, maka BAL dapat bertahan hidup dengan adanya oksigen (15, 16).

#### **D. IDENTIFIKASI MOLEKULAR**

Identifikasi molekular digunakan untuk mempelajari kesamaan DNA (*deoxyribonucleic acid*) atau *genetic homology* diantara organisme. Kesamaan DNA dapat dipelajari dengan menentukan komposisi basa DNA,

sekuensing terhadap basa DNA atau RNA, dan hibridisasi DNA. DNA terdiri dari empat basa pendek, yaitu A (*adenine*), T (*thymine*), G (*guanine*), C (*cytosine*). Teknik lain untuk mempelajari hubungan evolusi antarorganisme dapat dilakukan dengan menentukan sifat-sifat ribosom, termasuk dengan menggunakan komponen ribosom 16S rRNA, reaksi imunologi, dan *phage typing* (17).

Protein suatu organisme ditentukan oleh informasi DNA mikroorganisme tersebut. Oleh karena itu profil protein dan penentuan sekuens asam amino merupakan ukuran yang penting dalam hubungan antarorganisme seperti homolog DNA (18). Sekuens yang dihasilkan dapat memberikan informasi mengenai bentuk protein dengan membandingkan dengan protein lain yang fungsinya telah diketahui. Asam amino dan protein, gen-gen penghasil enzim tertentu dapat juga dibandingkan berdasarkan sekuens yang dimiliki.

#### 1. Identifikasi Molekular Bakteri Asam Laktat (BAL)

Kebanyakan genus BAL memiliki jumlah pasang basa G-C yang relatif rendah (<50 %) pada DNA genom yang dimilikinya. Terdapat pula satu genus yang secara filogenetik tidak berhubungan, yaitu *Bifidobacterium*. Genus tersebut memiliki jumlah pasang basa G-C yang tinggi (>50 %) (10).

BAL memiliki genom yang paling kecil diantara bakteri-bakteri lainnya. Bergantung pada spesiesnya, ukuran genom BAL berkisar antara 1,1-2,6 Mb.

Spesies BAL yang pertama kali diperoleh genomnya secara lengkap adalah *Lactococcus lactis* subsp (19).

Selanjutnya empat spesies BAL lain juga telah diperoleh genom lengkapnya, yaitu *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* dan *S. thermophilus*. Terdapat lebih dari dua puluh spesies yang sedang diteliti genomnya secara lengkap. Hasil sekuensing tersebut akan dipublikasikan ke dalam basis data untuk dapat dipergunakan secara umum (19).

## 2. Identifikasi Molekular terhadap 16S ribosomal DNA (rDNA)

Teknik yang akurat untuk identifikasi molekular bakteri adalah identifikasi terhadap 16S rDNA yang dikenal dengan sebutan *ribotyping* atau *riboprinting*. Identifikasi tersebut didasarkan pada tingkat kesamaan dalam sekuens 16S rDNA sebagai sidik jari genetik bakteri atau disebut sebagai sekuens sidik jari (6). Teknik ini berkembang setelah diciptakannya mesin DNA *sequencer* (20).

Bagian yang stabil dalam sekuens dimiliki oleh 16S rDNA dari setiap spesies bakteri. Satu sel bakteri memiliki ribuan kopi rDNA, 16S rDNA berupa polinukleotida yang besar (1500 basa) dan merupakan bagian dari subunit kecil dari ribosom prokariot. Beberapa protein kecil bersama dengan 16S rDNA digabung dalam subunit ribosom.

Analisis terhadap 16S rDNA merupakan metode terpilih untuk identifikasi dan melihat filogenitas bakteri. Keuntungannya adalah rRNA secara umum dimiliki oleh semua bakteri, merupakan unit yang konstan dan merupakan target yang sensitif karena terdapat dalam jumlah banyak dalam sel yang aktif. Jika sekuens nukleotida dari gen 16S rDNA dari dua tipe organisme sangat mirip atau memiliki sedikit perbedaan basa dalam rDNA, maka kedua organisme tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang dekat, ditinjau dari kedekatan evolusinya (17).

Sekuensing gen 16S rDNA dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu sekuensing secara langsung dan sekuensing dengan bantuan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik PCR merupakan metode terpilih karena membutuhkan lebih sedikit bahan, lebih cepat, dan lebih praktis dilakukan untuk penelitian daripada sekuensing rDNA secara langsung. Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi gen rDNA menggunakan primer komplemen yang diproduksi secara sintetik. Kemudian DNA hasil amplifikasi dengan PCR tersebut disekuensing dengan bantuan mesin *sequencer* (17).

Sekuens DNA pada BAL terdapat pada daerah 677 sampai 699 dari penomoran gen 16S rDNA bakteri *E.coli* (6). Hasil sekuens pada daerah rDNA tersebut menunjukkan kemiripan sebesar 66-69 % dengan sekuens gen 16S rDNA dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactococcus* pada GenBank.

## E. **POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

### 1. Definisi dan Manfaat

PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat dengan cara *in vitro* tanpa menggunakan organisme hidup seperti *E. coli* atau khamir (20, 21, 22). Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti di perusahaan Cetus Corporation.

PCR digunakan untuk mengamplifikasi suatu bagian kecil yang telah ditentukan dari utas DNA yang dapat berupa gen tunggal atau hanya bagian dari gen. Berbeda dengan yang dihasilkan oleh organisme hidup, PCR hanya dapat menghasilkan fragmen DNA yang pendek, biasanya kurang dari 10 kb. Reaksi PCR dilakukan pada suatu *thermal cycler*. Mesin ini dapat memanaskan atau mendinginkan tabung eppendorf supaya reaksi di dalamnya terjadi pada temperatur yang tepat yang dibutuhkan pada setiap tahap dari proses reaksi PCR (21). Teknik PCR ini banyak digunakan dalam penelitian biologis dan medis mencakup diagnosis penyakit hereditas atau cacat pada gen, identifikasi penyakit baru dan deteksi keberadaan virus AIDS dalam sel manusia (14, 21). Selain itu PCR juga mempunyai peranan penting dalam bidang kehakiman. Potensi penggunaan sumber DNA untuk meyakinkan identitas seseorang dalam ilmu kehakiman adalah bukti akurat

yang telah diakui. Teknik ini dipakai dalam menemukan kaitan pelaku kejahatan dengan membandingkan sampel darah, semen, atau rambut pelaku dengan yang ditemukan di tubuh korban.

Pada bidang ilmu pengetahuan dan kesehatan, PCR dapat digunakan sebagai metode yang sangat cepat dan akurat untuk skrining atau sekuensing suatu koloni bakteri. Hal ini disebabkan karena PCR sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA.

Empat komponen utama pada proses PCR adalah:

(1) Cetakan DNA, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan; (2) Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15 – 25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA; (3) Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan; (4) DNA polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA (12). Komponen lain yang juga penting adalah senyawa dapar (20, 21).

Secara umum, proses PCR dibagi menjadi tiga tahap, yaitu: tahap pertama dimulai dengan melakukan denaturasi cetakan DNA sehingga rantai DNA yang berantai ganda akan terpisah menjadi rantai tunggal. Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan panas ( $95^{\circ}\text{C}$ ) selama 1-2 menit. Tahap kedua adalah *annealing*, yaitu penempelan primer kepada untai DNA yang telah terdenaturasi. Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan

cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Primer dapat melekat pada sekuen komplementernya dengan cara menurunkan suhu sampai  $40^{\circ}\text{C}$  -  $60^{\circ}\text{C}$ . Tahap terakhir yaitu proses perpanjangan primer yang menempel pada cetakan DNA dengan melibatkan DNA *polymerase* sebagai katalis. Tahap ini dilakukan dengan menaikkan suhu antara  $70^{\circ}\text{C}$  -  $75^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Optimasi PCR

Tidak terdapat suatu prosedur PCR yang cocok untuk semua kondisi, oleh karena itu setiap amplifikasi PCR dalam suatu penelitian yang baru membutuhkan optimasi. Masalah yang sering muncul pada penelitian adalah ampikon yang tidak terdeteksi, amplifikasi yang rendah dari jumlah yang diinginkan, hasil pita yang tidak spesifik akibat mutasi, kesalahan pemasukan primer, dan lainnya (16, 23).

Keberhasilan PCR sangat ditentukan oleh beberapa faktor antara lain yaitu (21) :

### a. Deoksiribonukleotida trifosfat

Larutan *stok* dNTP yang akan digunakan dalam PCR sebaiknya dinetralkan menjadi pH 7,0 dan pengukuran konsentrasinya menggunakan spektrofotometer. Larutan *stok* tersebut kemudian dituang dalam volume kecil (*aliquot*) dengan konsentrasi 1 mM dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Konsentrasi masing-masing dNTP yang diperlukan dalam PCR berkisar

antara 20 – 200  $\mu\text{M}$  menghasilkan keseimbangan yang optimal dalam hal jumlah, spesifisitas, dan ketepatan.

b. Enzim yang digunakan

Kebutuhan enzim dapat bervariasi bergantung pada primer atau cetakan target masing-masing. Namun, bila konsentrasi enzim terlalu tinggi, maka akan terjadi akumulasi sehingga menghasilkan ampikon yang tidak spesifik. Apabila terlalu rendah, maka tidak mencapai jumlah ampikon yang diinginkan (21, 24).

*Taq polymerase* merupakan salah satu DNA *polymerase* yang digunakan dalam PCR. Konsentrasi enzim yang dianjurkan untuk DNA *Taq polymerase* adalah 1-2,5 unit / reaksi. *Taq DNA polymerase* adalah enzim yang diisolasi dari mikrobia termofilik, *Thermus aquaticus*, yang stabil dan tetap aktif pada suhu tinggi. *Taq DNA polymerase* tersusun atas satu rantai polipeptida dengan berat molekul kurang lebih 95 kD. Enzim ini mempunyai aktivitas eksonuklease  $5' \rightarrow 3'$ , tetapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease  $3' \rightarrow 5'$ . Enzim ini aktif pada suhu  $20^\circ\text{C}$  dan suhu aktivitas optimumnya sekitar  $75^\circ\text{C}$ - $80^\circ\text{C}$  (19, 22). Aktivitas spesifik enzim ini dalam menggabungkan nukleotida mencapai 150 nukleotida per detik per molekul enzim. Waktu paruh *Taq DNA polymerase* pada suhu  $95^\circ\text{C}$  adalah 40 menit (21).

DNA *polymerase* lain yang juga digunakan dalam PCR antara lain:

(1) *Tth DNA polymerase*. Enzim ini mempunyai aktivitas eksonuklease  $5' \rightarrow 3'$ ,

tetapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease 3'→5'. Enzim ini mempunyai aktivitas tertinggi pada suhu sekitar 75°C. Enzim ini juga mempunyai aktivitas transkriptase balik intrinsik yang sangat efisien dengan adanya ion mangan; (2) *Pwo* DNA *polymerase*. Enzim ini mempunyai stabilitas thermal yang lebih tinggi dibanding dengan *taq* DNA *polymerase*. *Pwo* DNA *polymerase* mempunyai aktivitas eksonuklease 5'→3', dan mempunyai aktivitas eksonuklease 3'→5'. Aktivitas eksonuklease 3'→5' (aktivitas *proofreading* dalam proses sintesis DNA) yang dimiliki oleh *Pwo* DNA *polymerase* meningkatkan ketepatan proses sintesis DNA. Hasil amplifikasi menggunakan enzim ini adalah molekul DNA dengan ujung tumpul (*blunt-end*) sehingga dapat digunakan dalam proses ligasi ujung tumpul secara langsung tanpa harus dilakukan modifikasi terhadap ujung-ujung molekul DNA; (3) *Pfu* dan *Tli* DNA *polymerase*. *Pfu* DNA *polymerase* diisolasi dari *Pyrococcus furiosus* dan mempunyai berat molekul 92 kD, aktif pada suhu 74°C dan mempunyai aktivitas eksonuklease 3'→5'. Produk amplifikasi dengan menggunakan enzim ini adalah molekul DNA dengan ujung yang tumpul. *Tli* DNA *polymerase* diisolasi dari jasad *Thermococcus litoralis* dan sangat stabil terhadap panas, aktivitas optimum pada suhu 75°C dan tetap berfungsi meskipun diinkubasi pada suhu 100°C. Enzim ini juga mempunyai aktivitas eksonuklease 3'→5' (21).

c. Siklus reaksi

PCR dilakukan dengan mengulangi siklus reaksi perlipatgandaan sebanyak 20–30 siklus. Banyaknya siklus yang dilakukan tergantung pada konsentrasi awal DNA target yang dilipatgandakan (21).

d. Larutan dapar

Dapar yang dianjurkan untuk melakukan PCR adalah 10-50mM Tris-HCl, pH 8,3 – 8,8 (pada suhu 20°C). Untuk membantu proses penempelan primer dapat juga ditambah KCl sampai konsentrasi 50 mM. Diatas konsentrasi 50 mM, KCl justru akan menghambat aktivitas *Taq* DNA polimerase. Komponen lain yang perlu ditambahkan adalah tween 20 sebanyak 0,05 – 0,1% untuk mempertahankan kestabilan enzim *Taq* DNA polimerase (21).

e. DNA Cetakan

DNA yang digunakan sebagai cetakan dapat berupa rantai-tunggal atau rantai-ganda. Pada inkubasi awal PCR suhu mencapai 95°C untuk mendenaturasi DNA sehingga memungkinkan oligonukleotida primer menempel pada DNA cetakan yang ada di dalam reaksi (16, 21).

f. Oligonukleotida primer

Konsentrasi primer yang optimal berkisar antara 0,1-0,5 µM. Konsentrasi primer yang lebih tinggi dari 0,1 µM dapat menyebabkan terakumulasinya hasil polimerisasi yang non spesifik. *Primer degenerate*

dapat digunakan untuk mengisolasi gen baru atas dasar kesamaan atau sekuen asam amino (21).

*Primer degenerate* adalah campuran oligonukleotida yang bervariasi dalam hal urutan basa nukleotidanya, tetapi mempunyai panjang atau jumlah nukleotida yang sama. *Primer degenerate* berguna dalam PCR jika ingin mengamplifikasi suatu fragmen DNA yang belum banyak diketahui urutan nukleotidanya sehingga *primer* yang spesifik tidak dapat dibuat (21).

## **F. ELEKTROFORESIS GEL AGAROSA**

Elektroforesis gel agarosa adalah metode untuk memisahkan dan memvisualisasikan fragmen DNA. Fragmen DNA dipisahkan berdasarkan muatan dan ukurannya, dengan melewati DNA melalui matriks gel agarosa yang diletakkan pada medan listrik. Elektroforesis merupakan metode standar untuk pemisahan, identifikasi dan pemurnian fragmen DNA (21, 25).

Teknik elektroforesis didasarkan pada fakta bahwa DNA bermuatan negatif pada pH netral, karena memiliki gugus fosfat. Karena itu jika DNA diberikan potensial listrik maka DNA akan bergerak menuju kutub positif. Laju pergerakan DNA menuju kutub positif diperlambat dengan melewati DNA pada gel agarosa (21, 25).

Agarosa membentuk kisi-kisi dalam larutan dapar, dan DNA harus melewati kisi-kisi tersebut untuk bergerak menuju kutub positif. Hal ini

memperlambat pergerakan molekul sehingga molekul yang besar akan bergerak lebih lambat daripada molekul yang kecil karena molekul yang kecil lebih mudah melewati kisi. Konsentrasi gel agarosa dapat bervariasi disesuaikan dengan kebutuhan pemisahan. Konsentrasi gel agarosa yang besar akan menurunkan mobilitas molekul DNA sehingga berguna untuk memisahkan molekul DNA yang kecil. Sebaliknya konsentrasi yang rendah akan meningkatkan mobilitas molekul DNA sehingga berguna untuk memisahkan molekul DNA yang besar (21, 25).

Gen ini kemudian divisualisasikan pada sinar UV dengan cara menodai DNA dengan pewarna berfluoresensi yaitu etidium bromida. Gel agarosa biasanya dilakukan dengan konfigurasi horisontal dalam medan listrik dengan kekuatan dan arah yang konstan. Pada elektroforesis gel agarosa biasanya digunakan pula penanda ukuran molekul DNA yaitu sebuah set fragmen DNA yang ukurannya diketahui. Penanda ini digunakan sebagai standar untuk menentukan ukuran DNA dari suatu fragmen yang tidak diketahui.

#### **G. TEKNIK SEKUENSING DNA**

Sekuensing DNA adalah penentuan urutan basa nukleotida suatu gen atau suatu fragmen DNA. Dalam bidang molekular, pemahaman terhadap suatu molekul DNA ditentukan dari sekuens nukleotidanya. Fungsi dari suatu

gen sering disimpulkan atas dasar sekuens nukleotidanya, yaitu dengan membandingkan sekuens sampel yang diperoleh dengan sekuens gen yang diketahui.

Teknik sekuensing telah menghasilkan sekuens dari ribuan gen. Metode ini juga digunakan untuk mengetahui urutan basa nukleotida juga sangat bermanfaat bagi penelitian kloning molekular (18). Keunggulan sekuensing DNA adalah metode ini mampu digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang tidak dapat dikultur, sulit untuk tumbuh, inert terhadap reaksi biokimia, atau hal-hal yang menyebabkan identifikasi dengan metode konvensional menjadi tidak memungkinkan.

*The Sanger Chain-Termination Sequencing Method* merupakan metode terpilih untuk sekuensing DNA. Metode Sanger ini disebut juga metode dideoxynucleotide atau metode enzimatik.

Metode Sanger adalah metode sintesis suatu fragmen DNA dalam mesin PCR yang merakit salah satu dari empat basa nukleotida termodifikasi sehingga menghentikan sintesis urutan basa sesudah basa termodifikasi tersebut. Metode asli dilakukan secara manual, tetapi sekarang semua telah dilakukan secara otomatis dengan bantuan mesin *sequencer* (18).

## H. METODE BLAST

Perbandingan sekuens dari nukleotida atau protein dari mikroorganisme yang sama atau berbeda memerlukan alat khusus dalam molekuler biologi. Saat ini seluruh genom telah di sekuens. Sekuens yang hampir sama dapat digunakan untuk memprediksikan lokasi dan daerah regulasi transkripsi dalam DNA genomik (26).

*Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* adalah alat yang sering digunakan untuk memperhitungkan kesamaan dari sekuens. BLAST juga menyediakan metode untuk mencari satu atau lebih *database* asam nukleat untuk *sequences* yang mirip ke satu atau lebih *sequences* yang meragukan dari beberapa tipe (26).

## **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 bulan Mei 2008.

#### **B. BAHAN**

##### **1. Sampel**

Sampel yang digunakan adalah kultur stok beku yang berasal dari penelitian sebelumnya dari hasil isolasi dari minuman susu fermentasi yang beredar di pasaran yang dinyatakan mengandung kultur hidup (probiotik) bakteri asam laktat. Nama dan sumber BAL yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

## 2. Bahan Kimia

Dapar STET (Sukrosa [Merck], tris base [Merck], EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) [Sigma], dan triton x-100 [Merck]), Lysozyme [Sigma], SDS (Sodium Dodesil Sulfat) [Sigma], proteinase-K [Usb], NaCl [Oxoid], CTAB (*Cethyltrimethyl Ammonium Bromide*) [Sigma], kloroform [Mallinckrodt], isoamil alkohol [Sigma], isopropanol [Merck], etanol 70 % [Merck], agarose ultra pure [Invitrogen], dapar TAE (Tris base, EDTA, asam asetat glasial) [Merck], PCR Hivi, *Ready-To-Go* (RTG) PCR *bread*s, 1 kb plus DNA *ladder* [Invitrogen], etidium bromida 10 mg/mL [Sentra BD], primer LAB Forward 5' AGA GTT TGA T(C/T)(A/C) TGG CTC AG 3', DAN LAB Reverse 5' CAC CGC TAC ACA TGG AG 3', gliserol.

## C. ALAT

Pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pines Scientific], autoklaf [Hirayama, Japan], *Laminar Air Flow Cabinet* [Esco], pH meter [Eutech], timbangan analitik [Scout dan Acculab], lemari pendingin [Sansio dan Toshiba], *deep freezer* -40°C [New Brunswick Scientific] *freezer* -20°C [Gea], oven [Lab-line dan WTC Binder], *vortex mixer* [Health, Digisystem], penangas air (*waterbath*) [Imperial, Lab-line], mikrosentrifus [Eppendorf dan Sorvall-fresco], inkubator (*Orbital Shaker Incubator*), alat elektroforesis gel mini

[Mupid-ex], UV-transiluminator [BDA Biometra TI 1], *thermal cycler* [MJ Mini BioRad], kamera digital [Fuji FinePix], *Dry Bath Type 17600* [Barnstead Thermolyne] dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

#### D. PEMBUATAN MEDIUM

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) dengan komposisi yang terdiri dari Pepton [Difco], 'lab-lemco' [Oxoid], *yeast extract* [Difco], dikalium hidrogen fosfat [Merck], natrium asetat [Merck], diammonium hidrogen sitrat [Merck], magnesium sulfat [Merck], mangan sulfat [Merck], kalsium karbonat [Merck], agar bakto [Pronadiosa], dan dekstrosa [Merck]. Medium yang digunakan antara lain: medium modifikasi agar MRS, medium MRS untuk agar miring, dan medium cair MRS.

##### 1. Medium agar MRS

Pepton, 'lab-lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, ammonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dekstrosa dan agar bakto, ditimbang masing-masing sebesar 5 g; 4 g; 2g; 1g; 2,5 g; 1 g; 0,1 g; 0,025 g; 10 g; 7g. Semuanya dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 ml,

ditambahkan dengan akuades secukupnya, diaduk dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 0,25 mL tween 80, diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan medium ini diatur pHnya dengan menggunakan pH meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$ , setelah itu volume dicukupkan hingga 250 ml. Selanjutnya medium dipanaskan hingga mendidih. Sementara itu dekstrosa ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat, dan volume dicukupkan hingga 250 mL. Setelah itu dipanaskan di atas *hotplate* hingga mendidih. Kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan 2 atm  $115^{\circ}$ - $116^{\circ}$ C. *Laminar Air Flow* (LAF) disiapkan ketika medium akan digunakan. Larutan dekstrosa tersebut dicampurkan ke dalam medium MRS secara aseptis dan dihomogenkan. Setelah medium hangat, medium tersebut dituang secara aseptis ke cawan Petri dibalik dan disimpan dalam lemari pendingin.

## 2. Medium MRS untuk agar miring

Pepton, 'lab-lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, amonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dekstrosa, agar bakto, dan  $\text{CaCO}_3$ , ditimbang masing-masing sebesar 2,5 g; 2 g; 1 g; 0,5 g; 1,25 g; 0,5 g; 0,05 g; 0,0125 g; 5 g; 3,75 g; dan 2,5 g. Kemudian semuanya dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 ml, ditambahkan dengan aquades secukupnya, diaduk dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 0,25 mL

tween 80, diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan medium ini diatur pHnya dengan menggunakan pH meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$ , setelah itu volume dicukupkan hingga 250 ml. Dalam keadaan panas dan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, medium tersebut dipipet sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian seluruh tabung reaksi disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit. Tabung reaksi dimiringkan hingga membeku dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

### 3. Medium Cair MRS

Pepton, 'lab-lemco', *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, amonium sitrat, magnesium sulfat, mangan sulfat, dekstrosa ditimbang masing-masing sebesar 2 g; 1,6 g; 0,8 g; 0,4 g; 1 g; 0,4 g; 0,04 g; 0,01 g; 4 g. Kemudian semuanya dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 ml, ditambahkan dengan aquades secukupnya, diaduk dengan *magnetic stirrer*, kemudian ditambahkan 0,25 mL tween 80, diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga larut. Larutan medium ini diatur pHnya dengan menggunakan pH meter hingga pH  $6,2 \pm 0,2$ , setelah itu volume dicukupkan hingga 200 ml. Dalam keadaan panas dan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*, medium tersebut dipipet sebanyak 10 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian seluruh tabung reaksi disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit. Setelah

dingin, dapat langsung digunakan atau dimasukkan ke dalam lemari pendingin untuk digunakan keesokan harinya.

## **E. CARA KERJA**

### **1. Purifikasi isolat**

Isolat-isolat yang tumbuh digoreskan ke medium agar MRS kemudian diinkubasi. Selanjutnya isolat yang diperoleh ditanam pada medium MRS agar miring dan diremajakan setiap dua minggu sekali yaitu dengan memindahkan kembali kultur dari agar miring ke cawan petri. Setelah diperoleh koloni tunggal, isolat ditanam kembali pada agar miring dengan pengerjaan duplo, yaitu sebagai kultur stok dan kultur kerja.

Isolat untuk kultur stok disimpan dalam gliserol. Prosedurnya adalah sebagai berikut. Sebanyak 0,75 mL gliserol dan 0,25 dapar TE dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL, kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan disimpan pada suhu 30°C. Sejumlah 0,5 mL kultur yang telah diinkubasi selama 24 jam dalam medium cair MRS, dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus tersebut, dikocok dengan vortex, dan disimpan pada suhu -70°C untuk penyimpanan jangka panjang. Untuk mendapatkan kembali isolat yang disimpan tersebut, dapat digores kembali pada medium agar MRS.

## 2. Ekstraksi DNA genom Bakteri Asam Laktat (BAL)

Ekstraksi DNA genomik dengan Metode Modifikasi Murray dan Thompson (1980) menggunakan *Cethyltrimethyl Ammonium Bromide* (CTAB).

Isolat BAL yang akan diekstraksi, sebelumnya dikultur dalam medium cair MRS, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 30°C. Kemudian sel bakteri tadi dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL steril dan disentrifus dengan mikrosentrifus pada suhu 20°C selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Kemudian supernatan dibuang. Pelet sel yang diperoleh kemudian disuspensikan kembali ke dalam 557 µL dapar STET. Setelah itu sebanyak 10 µL larutan lysozim 10 mg/mL, 30 µL SDS 10 %, dan 4 µL proteinase-K ditambahkan ke dalam suspensi tersebut. Suspensi dihomogenkan dengan cara membalikkan *microtube* selama beberapa kali. Kemudian suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Selanjutnya sebanyak 65 µL NaCl 4 M dan 80 µL CTAB ditambahkan ke dalam suspensi, kemudian dihomogenkan dengan vortex 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 kloroform dan 26 µL isoamilalkohol). Campuran tersebut divortex dan disentrifuse dengan mikrosentrifus pada suhu 20°C, selama 20 menit, dengan kecepatan

10.000 x g. Kemudian campuran diambil dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang baru dan steril dengan menggunakan mikropipet. Ekstraksi dengan kloroform dan isoamilalkohol dilakukan sebanyak dua kali. Setelah itu supernatan tadi ditambahkan dengan isopropanol dingin sebanyak 400  $\mu$ L dan larutan dibolak-balik secara perlahan sampai terlihat benang-benang putih halus (benang DNA). Larutan yang mengandung DNA tersebut kemudian disentrifuse pada suhu 20°C, selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Kemudian pelet DNA ditambahkan dengan etanol 70 % dingin sebanyak 1 mL bolak-balik tabung mikrosentrifus beberapa kali secara perlahan-lahan. Larutan tersebut selanjutnya disentrifuse pada suhu 20°C, selama 2 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Kemudian supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringkan di udara (kira-kira 2 jam). Setelah kering, pelet DNA kemudian dilarutkan ke dalam 40  $\mu$ L aquabides dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. DNA kemudian disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

### 3. Metode *Ethanol Precipitation*

Etanol sebanyak tiga kali volume sampel DNA ditambahkan ke dalam sampel, dan juga ditambahkan natrium asetat pH 5,2 3 M yang telah disterilkan sebanyak 0,1 kali volume, kemudian di homogenkan dengan vortex dan *dispin down* dengan *short spin* dan campuran diinkubasi

selama satu jam pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ , kemudian disentrifus selama sepuluh menit pada kecepatan  $11.000 \times g$ . Sebanyak  $500 \mu\text{L}$  etanol 70%, kemudian disentrifus selama 5 menit pada kecepatan  $11.000 \times g$ . Setelah itu sampel DNA dikeringkan, kemudian tambahkan aquabides sejumlah setengah dari volume semula.

#### 4. Analisis Hasil Ekstraksi DNA Genom Isolat dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Agarosa sebanyak 0,2 g dalam 20 mL tris Asetat EDTA (TAE) 1 x steril dididihkan. Setelah agak dingin, larutan tersebut dituang pada cetakan gel, sisir dipasang, dan didiamkan hingga membeku. Sisir diangkat dan nampan dipindahkan ke wadah elektroforesis. Wadah tersebut diberi dapar TAE 1x hingga menggenangi permukaan gel agarosa.

*Loading buffer* sebanyak  $2,5 \mu\text{L}$  ditambahkan pada sejumlah  $3 \mu\text{L}$  ekstrak DNA disuspensikan dengan pemipetan. Campuran tersebut dimuatkan 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.

Metode pewarnaan dapat dilakukan dengan mencampurkan  $1 \mu\text{L}$  etidium bromida  $10 \text{ mg/mL}$  setelah agarosa mendidih, kemudian dihomogenkan dan dituang pada cetakan gel.

Pemucatan warna dilakukan dengan mencelupkan gel agarosa pada wadah yang sudah diisi dengan aquades selama 5 menit sambil digoyang-goyang dan aquades diganti beberapa kali. Hasil diamati pada UV transluminator pada panjang gelombang 590 nm dan difoto.

#### 5. Persiapan PCR

Ke dalam *microtube* 0,5 mL yang telah terdapat enzim RTG ditambahkan air bebas nuklease sebanyak 36  $\mu$ L. Diresuspensikan sampai enzim RTG terlarut sempurna dengan air bebas nuklease. Kemudian ditambahkan *primer forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 2  $\mu$ L, kemudian diresuspensi, setelah itu di spin. Sebanyak 20  $\mu$ L dipindahkan ke dalam mikrotube 0,5 mL lainnya. DNA cetakan dimasukkan dalam ke dua mikrotube tersebut masing-masing sebanyak 5  $\mu$ L. Volume akhir yang diperoleh yaitu sebanyak 25  $\mu$ L. Larutan tersebut di-*spin down* dan dimasukkan ke dalam alat *thermal cycler* PCR.

#### 6. Proses PCR

Kondisi PCR diatur sebagai berikut:

- a. Pra-siklus : 95°C : 4 menit
- b. Siklus 30 kali : 95°C : 30 detik Denaturasi

	55°C	: 30 detik	Penempelan
	72°C	: 1 menit	Ekstensi
c. Pasca-siklus	: 72°C	: 7 menit	Pasca-ekstensi
	: 8°C	: 10 menit	Penyimpanan

## 7. Analisis Amplikon dengan Elektroforesis gel Agarosa

Prosedur pelaksanaan sama dengan prosedur analisis DNA genom bakteri hasil ekstraksi yang tertulis sebelumnya. Perbedaannya terletak pada penambahan 1 kb *plus* DNA ladder sejumlah 5µL dan *loading buffer* sejumlah 3 µL.

## 8. Isolasi dan Purifikasi DNA

Amplikon yang diperoleh, diisolasi dan dipurifikasi dengan DNA *extraction kit*, menggunakan PCR *Clean Up Kit* Geneaid sebanyak 20 µL DNA hasil amplifikasi PCR dan 5µL *loading buffer* dielektroforesis di gel agarosa 1% dan yang menghasilkan pita-pita tertentu yang spesifik dipotong dengan menggunakan pisau tajam. Irisan gel ( $\pm$  300 mg) dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL dan ditambahkan 500 µL buffer DF, kemudian dikocok dengan vortex dan diinkubasi pada 50-60°C selama 10-15 menit hingga irisan gel terlarut sempurna. Campuran tersebut didiamkan

dingin pada suhu 20°C, dan sebanyak ± 700 µL dimasukkan ke dalam kolom DF yang telah dilengkapi oleh tabung penampung, kemudian disentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang tertampung dibuang dan dalam kolom DF ditempatkan kembali dan ditambahkan 600 µL *wash buffer* beserta etanol dan selanjutnya disentrifuse kembali pada 13.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang terkumpul dibuang kembali dan kolom DF ditempatkan kembali ke dalam tabung pengumpul dan disentrifuse selama 3 menit sampai kolom membran mengering.

Kolom DF kering dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus yang bersih kemudian ditambahkan 15-50 µL buffer elusi atau ddH<sub>2</sub>O ke dalam bagian tengah dari membran kolom DF agar pengendapan pada dinding kolom dapat dihindari. Buffer elusi atau dH<sub>2</sub>O dibiarkan terserap selama 2 menit kemudian disentrifuse pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan DNA murni.

#### 9. Analisis Hasil Sekuensing DNA dengan sekuens yang terdapat pada GenBank

Selain diperoleh DNA murni, kemudian diamati lagi dengan elektroforesis gel agarosa sebelum dikirim ke Laboratorium Bioteknologi Lembaga Eijkman, untuk disekuensing.

Hasil sekuensing DNA dari Lembaga Eijkman dianalisa dengan membandingkan terhadap sekuens yang terdapat pada GenBank dengan program BLAST.



## BAB IV

### HASIL PENGAMATAN DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL

##### 1. Purifikasi Isolat

Enam isolat terpilih yang terdapat pada kultur stok kemudian ditumbuhkan kembali pada medium agar MRS dan dari 6 isolat yang ditumbuhkan kembali dipilih 6 koloni yang dianggap mewakili dan satu isolat yang mewakili kontrol positif.

Hasil purifikasi isolat dengan medium MRS agar menunjukkan satu isolat yang berasal dari Biokul, yaitu isolat S.X.A tumbuh dengan waktu yang lama, demikian pula pada saat peremajaan. Gambar hasil pengenceran isolat dapat dilihat pada Gambar 7.

##### 2. Pengamatan Morfologi Koloni Isolat

Hasil pengamatan morfologi koloni isolat adalah seluruh isolat membentuk koloni dengan permukaan yang halus. Koloni isolat berwarna putih sampai kuning. Namun lebih banyak yang berwarna putih kekuningan. Hasil pengamatan morfologi koloni isolat dapat dilihat pada Tabel 1.

### 3. Ekstraksi DNA

Lima isolat dari enam isolat terpilih dan satu isolat kontrol positif yang diekstraksi DNA genomiknya. Enam ekstrak DNA genomik diperoleh dari hasil ekstraksi.

### 4. Pengamatan Amplikon

Lima isolat dipilih mewakili untuk mewakili masing-masing sampel, seluruhnya positif menghasilkan amplikon berukuran lebih kurang sekitar 700 pb. Hasil pengamatan amplikon dapat dilihat pada Tabel 3. Gambar hasil identifikasi bakteri asam laktat berdasarkan 16S rDNA pada elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada Gambar 8.

### 5. Purifikasi Amplikon

DNA amplikon yang diperoleh dari hasil PCR, kemudian dipurifikasi untuk memperoleh DNA murni. Hasil purifikasi dari 6 amplikon diamati dengan elektroforesis gel agarosa dan semuanya menunjukkan hasil yang positif.

## 6. Analisis Sekuens

Lima amplikon yang dipilih untuk disekuensing, 1 amplikon teridentifikasi, namun tidak sebagai BAL dengan homologi 97 %. Hasil analisis sekuens dapat dilihat pada Tabel 4.

## B. PEMBAHASAN

Sebanyak 6 isolat BAL digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. Isolat BAL tersebut berasal dari kultur stok dari penelitian sebelumnya yang diisolasi dari berbagai minuman fermentasi yang diklaim mengandung kultur probiotik.

Pada tahap awal penelitian ini dipilih 6 isolat yang berasal dari kultur stok beku di *freezer*  $-70^{\circ}\text{C}$  yang kemudian ditumbuhkan kembali pada medium agar MRS dan disebar, kemudian diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Hal ini dimaksudkan untuk melihat bentuk koloni yang terpisah .

Waktu tumbuh bakteri kebanyakan sesuai dengan waktu tumbuh setelah diisolasi dari berbagai minuman fermentasi pada penelitian sebelumnya.

Setelah tumbuh dipilih satu koloni terpisah sama sekali dari koloni lainnya, kemudian dipindahkan dan digoreskan pada medium agar MRS untuk pengenceran koloni dengan tujuan memperoleh koloni yang benar-benar tunggal. Jika dalam satu medium terdapat koloni yang berbeda, maka

semua koloni tersebut digoreskan pada medium yang terpisah. Setelah proses peremajaan, BAL disimpan pada temperatur rendah (4°C).

Pada saat purifikasi, S.X.A tidak tumbuh dengan baik. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya pemanasan yang berlebih pada media saat penuangan setelah disimpan dan agar mengeras. Kebanyakan media bakteri kaya akan sumber nutrisi, seperti pepton kaya akan sumber asam amino, *yeast extract* kaya akan sumber vitamin dan berbagai macam garam (15). Oleh karena itu dengan pemanasan yang berlebih dapat menyebabkan rusaknya nutrisi.

Koloni tunggal yang diperoleh kemudian dipindahkan dan digoreskan pada medium agar miring dengan penambahan  $\text{CaCO}_3$ . Penambahan  $\text{CaCO}_3$  dilakukan dengan maksud untuk menjaga agar pH medium tidak terlalu asam akibat asam laktat yang dihasilkan oleh BAL sehingga dapat membunuh BAL. BAL itu sendiri diketahui dapat menghasilkan asam laktat sehingga dapat menyebabkan pH 2. Medium MRS dipilih karena telah diketahui sebagai medium yang spesifik untuk BAL.

Langkah selanjutnya adalah proses ekstraksi DNA dengan menggunakan metode modifikasi Murray dan Thompson menggunakan CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) (33). Metode ini dipilih karena cukup mudah dan hasil ekstraksinya juga dinilai cukup bersih.

Sebelum melakukan ekstraksi DNA, terlebih dahulu dipersiapkan reagen-reagen yang dibutuhkan. Reagen-reagen yang digunakan dilarutkan

dengan aquabides steril, karena memiliki kemurnian air yang tinggi. Hal ini penting karena ion logam dapat tercampur dengan reaksi enzimatik yang dapat menutupi DNA (15).

Kultur yang akan diekstraksi ditanam terlebih dahulu pada medium cair MRS, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 18-24 jam sebelum digunakan untuk diekstraksi DNA genomik. Hal ini dilakukan karena sel dapat tumbuh dalam jumlah yang besar dalam medium cair MRS, selain itu sebagian besar bakteri dapat ditumbuhkan dalam medium cair sampai mencapai fase stasioner dan kemudian di panen (42). Isolasi DNA membutuhkan jumlah sel yang cukup banyak, supaya pita DNA dapat terlihat, sehingga sebelum melakukan isolasi DNA, kultur yang akan diekstraksi lebih baik ditanam terlebih dahulu pada medium cair MRS daripada dengan cara mengerok sendiri dari medium MRS agar miring, karena jumlah sel yang didapatkan akan lebih sedikit, sehingga lebih sulit untuk mendapatkan DNA.

Pelet sel yang diperoleh kemudian disuspensikan dengan dapar STET untuk membersihkan pelet sel dari sisa-sisa medium MRS yang mungkin masih terbawa. Dapar STET (sukrosa, *tris-base*, EDTA dan triton X-100) dapat menghambat DNase yang dapat merusak DNA, selain itu dapar STET juga berfungsi mengganggu membran sel luar bakteri dengan cara mengikat ion  $Mg^{2+}$  yang terdapat di lapisan lipopolisakarida (14). Selanjutnya ditambah SDS yang merupakan deterjen yang membantu proses lisis dengan

menghilangkan lipid pada dinding sel. Karena BAL merupakan bakteri gram positif, sehingga perlakuan tidak cukup hanya melisis sel saja, namun perlu ditambahkan lisozim yang merupakan pendegradasi protein. Lisozim adalah suatu enzim yang mendegradasi peptidoglikan (15). Peptidoglikan adalah komponen utama dari dinding sel bakteri gram positif dan merupakan polimer linier yang terdiri dari subunit asam N-asetilmuramat dan asetilglukosamin. Lisozim atau 1,4- $\beta$ -N-asetilmurmidase bekerja memutus ikatan  $\beta$ -1,4 yang menghubungkan subunit asam N-asetilmuramat dengan N-asetilglukosamin tersebut sehingga peptidoglikan dapat terdegradasi (10).

Untuk proses lisis lebih lanjut ditambahkan SDS 10% yang merupakan suatu deterjen yang membantu disosiasi kompleks DNA-protein sehingga DNA dapat terlepas dari protein. Selain itu ditambahkan proteinase-K. Proteinase-K merupakan enzim proteolitik yang sering ditambahkan untuk menghilangkan protein lebih lanjut. Proteinase-K adalah enzim yang bekerja mendegradasi protein. Proteinase-K tidak terdenaturasi dengan adanya SDS, bahkan bekerja efektif dengan adanya SDS (15). Tabung mikrosentrifuse ini kemudian dibolak-balik secara perlahan dan divortex untuk menghomogenkan campuran yang ada di dalamnya, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam agar pereaksi dapat bekerja optimal.

Selanjutnya adalah penambahan CTAB yang bertujuan untuk menghilangkan debris sel. CTAB merupakan surfaktan kationik yang dapat membentuk kompleks dengan asam nukleat. Kompleks ini tidak larut pada konsentrasi NaCl 4M, sedangkan karbohidrat dan protein larut pada konsentrasi tersebut sehingga dapat dipisahkan dari DNA yang mengendap.

Ekstraksi dengan kloroform dan isoamylalkohol dilakukan untuk memisahkan DNA dari debris sel karena dapat melarutkan kompleks DNA. Larutan kemudian di homogenkan dengan vortex dan disentrifus. Setelah itu terbentuk dua lapisan. Lapisan yang berwarna bening diambil dengan cara dipipet dengan hati-hati agar tidak tercampur dengan debris sel. Ada yang terbentuk tiga lapisan. Yang diambil adalah bagian tengah yang bening dengan menggunakan pipet dengan hati-hati. Hal ini kemungkinan disebabkan karena jumlah sel yang terlalu banyak sehingga menghasilkan debris sel yang banyak juga. Sehingga perlu dilakukan ekstraksi dengan kloroform dan isoamylalkohol sebanyak tiga kali untuk mengurangi kemungkinan terbawanya debris sel. Supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam mikrotube yang baru dan steril untuk mencegah kontaminasi yang dapat merusak DNA (15).

Selanjutnya ditambahkan isopropanol yang bertujuan untuk memvisualisasikan DNA dengan cara mengendapkan DNA yang terlihat berupa benang-benang putih transparan. Kemudian dilakukan penambahan etanol 70% dingin untuk mencuci DNA (15).

Untuk mengetahui kualitas dari DNA hasil ekstraksi, dilakukan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi 1%. Hasil positif yang menunjukkan pita dapat digunakan sebagai cetakan DNA pada proses PCR. Sedangkan hasil ekstraksi yang menunjukkan pita yang tipis atau yang belum menunjukkan pita, maka ekstraksi diulang. Kegagalan ekstraksi dapat disebabkan karena isolat dari medium agar miring MRS ke medium hanya sedikit bakteri asam laktat yang terambil sehingga pita DNA tidak terlalu terlihat jelas.

Proses PCR dilakukan pada tahap selanjutnya untuk mengamplifikasi DNA yang telah diperoleh. Untuk campuran PCR yang digunakan, komposisinya didapat dari *Ready-To-Go* (RTG) PCR *beads* yang didalamnya sudah terdapat dNTP, enzim DNA *Taq polymerase*, dan dapar seperti Tris-HCl, KCl dan MgCl<sub>2</sub> (36). Untuk penggunaan *beads* dilarutkan terlebih dahulu dengan aquabides steril hingga jernih, primer *forward*, primer *reverse*, dan DNA cetakan yang kemudian ditambahkan ke dalam larutan hingga volume menjadi 25 µl. Perhitungan PCR mix dapat dilihat pada Lampiran 3.

Sekuens primer yang digunakan yaitu, *primer forward* –AGA GTT TGA T(C/T)(A/C) TGG CTC AG– 3' dan *primer reverse* (6, 14). Target dari *primer* yang digunakan tersebut sesuai dengan daerah penomoran 677-693 pada gen 16S rRNA *E coli*.

Kondisi PCR yang digunakan berdasarkan penelitian mengenai BAL sebelumnya yang dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Farmasi FMIPA

UI (14). Amplikon yang dihasilkan lebih kurang 700 pb, kemudian diamati dengan cara melakukan elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Presentasi gel dapat bervariasi. Untuk mengukur fragmen DNA digunakan pembanding ukuran 1 kb DNA *ladder* pada proses elektroforesis. Fragmen DNA dapat divisualisasikan dengan penambahan etidium bromida. Dari hasil elektroforesis diperoleh pita-pita tunggal yang spesifik. *Loading buffer* (*xylene cyanol*, *bromophenol blue*) berfungsi memberikan warna dan densitas (gliserol, sukrosa) pada amplikon sehingga mudah untuk dibuatkan sumur-sumur gel.

Sebelum disekuensing, terlebih dahulu amplikon hasil PCR ini dipurifikasi dengan DNA *extraction kit*, menggunakan PCR *Clean Up Kit* geneaid. Proses purifikasi ini dilakukan setelah DNA hasil amplifikasi dielektroforesis di gel agarosa 1%. Pita-pita spesifik diamati dengan sinar UV rendah agar tidak merusak DNA. Gel yang mengandung pita-pita tersebut dipotong dan diiris kecil, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube yang bersih dan steril. Tahap pertama yaitu dilakukan pelarutan gel dengan menambahkan dapar DF dan inkubasi selama 10-15 menit sampai gel benar-benar larut. Selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom penampung DF yang terdapat membran penyaring. Gel yang telah larut dimasukkan ke dalam kolom DF dan disentrifuse. Filtrat yang tertampung kemudian di buang. Tahap ini merupakan proses pengikatan DNA atau penahan DNA oleh membran.

Tahap selanjutnya adalah tahap pencucian yang dilakukan dengan menambahkan dapar pencuci dan etanol untuk membersihkan sisa-sisa gel yang masih tersisa di kolom membran. Setelah disentrifuse dan filtrat dibuang, kolom DF disentrifuse kembali untuk mengeringkan membran. Selanjutnya kolom DF ditempatkan ke dalam mikrotube yang baru dan steril untuk menampung larutan DNA yang dilarutkan pada aquabides. Didiamkan selama 2 menit, agar aquabides terserap dan disentrifuse, maka diperoleh DNA yang murni (41).

Untuk memastikan hasil purifikasi DNA ini maka dilakukan kembali proses elektroforesis, karena dapat hilang pada saat proses purifikasi. Proses sekuensing dilakukan di Lembaga Eijkman. Hasil sekuensing DNA yang diperoleh dibandingkan dengan sekuens yang terdapat pada *GenBank* menggunakan metode BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Sebanyak 5 amplikon yang berhasil diperoleh dari PCR, kemudian dilakukan sekuensing, maka hanya satu amplikon yang dapat diidentifikasi yaitu *Staphylococcus saprophyticus* yang berasal dari sample IX, namun bukan termasuk BAL. Hasil perbandingan sekuens DNA tersebut menunjukkan kehomologian sekitar 97%. Pada sampel IX, yaitu Bulla AB<sup>®</sup> teridentifikasi mengandung *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus saprophyticus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat, memiliki permukaan halus, berwarna abu-abu sampai putih, tidak bersifat motil dan tidak menghasilkan spora, menghasilkan asam laktat, dan

memfermentasikan karbohidrat. *Staphylococcus saprophyticus* banyak terdapat pada saluran pencernaan dan mukosa saluran kemih. Kultur mudah tumbuh pada kondisi aerob dan pada suhu optimum 37°C, sehingga dapat tumbuh bersama dengan BAL (43).

Jika dilihat dari morfologi dan sifatnya, *Staphylococcus saprophyticus* memiliki morfologi dan sifat yang hampir sama dengan BAL. Hal yang dapat membedakan *Staphylococcus saprophyticus* dengan BAL adalah BAL dapat hidup pada keadaan adanya oksigen, tetapi tidak dapat menggunakannya untuk respirasi, sedangkan *Staphylococcus saprophyticus* bersifat aerob sehingga dapat menggunakannya sebagai respirasi (2, 43).

Perbedaan hasil identifikasi pada penelitian ini dibandingkan dengan pernyataan produsen belum dapat dipastikan pada saat ini. Beberapa hal perlu dilakukan untuk menunjang keyakinan akan metode maupun prosedur teknis pelaksanaan. Berdasarkan hasil penelitian ini, sampel-sampel lainnya tidak berhasil diidentifikasi karena adanya kesalahan prosedur teknis sebagaimana dibahas dibawah ini.

Pada sampel III, V, VI dan sampel VIII hasil sekuensing tidak dapat terbaca karena banyak gambar elektrogram yang saling bertumpuk. Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi DNA yang terlalu rendah atau DNA yang kurang murni sehingga dapat menyebabkan kesalahan baca sekuens. Didalam satu reaksi kemungkinan terdapat lebih dari satu fragmen DNA. Fragmen tersebut dapat berupa amplikon-amplikon yang dihasilkan dari

proses PCR. Hal ini dapat disebabkan antara lain karena (1) Setelah dilakukan analisis hasil ekstraksi DNA genomik, didapatkan pita DNA yang sangat tipis, sehingga pada tahap ekstraksi DNA berikutnya, kultur yang akan diekstraksi ditanam terlebih dahulu pada medium cair MRS selama lebih dari 24 jam. Hal ini menyebabkan banyak terdapat debris sel. Hal ini terbukti pada saat penambahan kloroform:isoamylalkohol (24:1) seharusnya terbentuk dua lapisan, namun dalam penelitian ini terbentuk tiga lapisan, sehingga tip yang digunakan pada saat memindahkan supernatan yang mengandung DNA ke mikrotube yang baru dan steril menyentuh debris sel. Hal ini kemungkinan dapat menyebabkan ketidakmurnian DNA, sehingga dapat menyebabkan gambar elektrogram yang saling bertumpuk yang mengakibatkan hasil sekuensing tidak dapat terbaca. (2) Kesalahan teknis lainnya yang terjadi adalah disteril ulang media yang belum terpakai setiap kali akan digunakan, sehingga menyebabkan rusaknya nutrisi (15). Akibatnya kultur tidak dapat tumbuh dengan baik karena kekurangan nutrisi. Kultur yang tidak tumbuh dengan baik akan menyebabkan konsentrasi DNA genomik yang diperoleh melalui ekstraksi menjadi sedikit.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Lima sampel isolat diperoleh dari hasil purifikasi dari kultur stok beku yang berasal dari penelitian sebelumnya dari hasil isolasi minuman susu fermentasi yang beredar di pasaran yang dinyatakan mengandung kultur hidup (probiotik) bakteri asam laktat.
2. Satu sampel yang teridentifikasi dari 5 sampel yang disekuensing namun tidak menunjukkan kandungan BAL, adalah *Staphylococcus saprophyticus* dari Bulla AB yang berbeda dari pernyataan produsen.
3. Enzim PCR yang memberikan hasil yang baik adalah dalam bentuk campuran *Pure Taq Ready-<sub>48</sub> To-Go PCR beads*.

## B. SARAN

Selain kesalahan prosedur teknis pelaksanaan yang telah dibahas, maka:

1. Perlu dilakukan identifikasi BAL menggunakan *primer* oligonukleotida lain yang lebih spesifik.
2. Perlu dilakukan identifikasi BaL menggunakan sampel Bulla AB lain dengan kondisi yang sama.

## DAFTAR ACUAN

1. Satria NH. Pembentukan Asam Organik oleh Isolat Bakteri Asam Laktat pada Media Ekstrak Daging Buah Durian (*Durio zibethinus Murr*). *Bioscientiae*. **2**(1): 15-16
2. Brock, T. D., M. J. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*. 6<sup>th</sup> Edition. New Jersey: Prentice Hall. Hal: 771-775.
3. Prangdimurti E. Desember 2001. Probiotik Dan Efek Perlindungannya terhadap Kanker Kolon. *Makalah Falsafah Sains (PPs/702)*. Institut Pertanian Bogor. Hal: 1-9
4. Savadogo A, Outtara CAT, Savadogo PW, Barro N, Outtara AS, Traore AS. 2004. Identification of Exopolysaccharides-producing Lactic Acid Bacteria from Burkina Faso Fermented Milk Samples. *African Journal of Biotechnology*. **3**(3): 189-194.
5. Indriani. 2007. 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.
6. Heilig, HGJ., Erwin GZ, Elaine EV, Philippe M, Antoon DLA, Willem MdV. Jan 2002. Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. And Other Lactic Acid Bacteria in Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(1): 114-123.
7. Santoso E. dan Alamsyah A. Bakteri Asam Laktat pada Terasi dan Peda serta Aktivitas Penghambatannya terhadap Bakteri Patogen dan Pembusuk. *Jurnal Teknologi dan Pangan*. Hal: 52-56.
8. Wibowo D. 1985. Bakteri Asam Laktat dan Peranannya dalam Pengolahan Sayuran dan Palawija. *Majalah Teknologi Pangan*. **5**(2): 460-463.
9. Pato Usman. Maret 2002. Manfaat Bakteri Asam Laktat untuk Menurunkan Resiko Penyakit Jantung Koroner. *Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia*. Hal: 1-6
10. Perry JJ, Staley JT. 1997. *Microbiology Dynamic and Diversity*. USA: Saunders College Publishing. Hal: 479-486, 680-681, 864-867.

11. Collins D. and Gibson G. 1999. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the Gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. **69**(5): 3-12.
12. Triyanto I. 2007. Kembali Tentang Probiotik. [www.halalguide.com](http://www.halalguide.com).
13. Shah, N.P. 2000. Symposium: probiotic Bacteria. Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*. **83**(4).
14. Malik A, Felicia, Maksum R, Aryati O. 2007. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Sumber Lokal menggunakan Gen Penyandi 16S rRNA. *Jurnal Sains Indonesia*. **12**(2): 1-6.
15. Winfrey, MR. Rott, MA. Wortman, AT. 1997. Unraveling DNA: *Molecular Biology for the laboratory*. New Jersey: prentice Hall Inc.
16. Felicia. 2007. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Asal Sumber Lokal menggunakan Gen Penyandi 16S rRNA. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
17. Black JG. 1999. *Microbiology Principles and Explorations*. New Jersey: Prentice Hall. Hal: 238-243
18. Nester EW, Anderson DG, Robert Jr. C. 2001. Microbiology A human Perspective. *New York. Mc Graw Hill Companies Inc*. hal: 235-241.
19. Klaenhammer T, Altermann, Arigoni F, Bolotin A, Breidt F, Broadbent J, et al. 2002. Discovering Lactic Acid Bacteria by Genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **82**: 29-58
20. Weafer RF. 2001. *Molecular Biology, Third Edition*. New York: *Mc Graw Hill Companies Inc*. Hal: 235-241.
21. Yuwono Triwibowo. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Penerbit Andi. Hal: 5-23.
22. Buffery C. 1993. *The Polymerase Chain Reaction: Molekular Biology and Biotechnology*. Third Edition. Edited by J.M Walker and E.B Gingold. Cambrige: Royal Society of Chemistry, Hal: 51-62.

23. Saiki RK. 1990. Amplification of Genomic DNA. Dalam: Innis, Michel A. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press Inc. Hal: 13-20.
24. Bagasra O, *In Situ PCR Techniques. Molecular Retrovirology Laboratories*. Thomas Jefferson University Jefferson Medical College Philadelphia, Pennsylvania, John Hansen, John Hansen. Mj. Research, Inc. Watertown, Massachusetts. Hal: 3-36.
25. Ariestanti DM. 2007. Ekstraksi DNA Genomik dan Identifikasi Gen Glukansukrase Bakteri Asam Laktat (BAL) Penghasil Ekspolisakarida (EPS) dengan Metode PCR. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
26. The Blast Sequences Analysis Tool. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 09 Mei 2008, 19:20:30.
27. PCR, Mempercepat Proses Analisis DNA. [http://www.pikiranrakyat.Com/cetak/2005/1105/cakrawala\\_lain/html](http://www.pikiranrakyat.Com/cetak/2005/1105/cakrawala_lain/html). 09 Januari 2007, 20:15:12.
28. Ford-Liold, Brian. 1996. Measuring Genetic Variation Using Molecular Markers Version 1.22 <http://www.cqjar.org/ipgrj>. 01 September 2007, 16:35:16
29. Misgiyarta dan Widowati S. 2003. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus. *Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya genetik Pertanian*. Hal 374-380.
30. Principles of Sequencing. <http://users.urgent.be/~avierstr/principles/seq.html>. 09 Januari 2007, 19:20:52.
31. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Probiotik. <http://www.klikpdpi.com/moduls.php?name=news&file=article&sid=2504>. 07 Januari 2008, 18:19:30.
32. Cusick SM, O'Sullivan Dj. 2000. Use of a Single, Triplicate Arbitrarily Primed-PCR Procedure for Molecular Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(5): 2227-2231.
33. Malik A, Ariestanti DM, Nurfachtiyani A, Yanuar A. 2008. Skrining gen Glukosil Transferase (gtf) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Ekspolisakarida. *Makara (Seri Sains)*, **16** (in press)..

34. Benson, JH. Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 7<sup>th</sup> Edition. New York: McGraw-Hill. Hal: 229-230.
35. Ljungh, Asa, Torkel W. 2006. Lactid Acid Bacteria as Probiotics. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 7: 73-90.
36. Amersham Biosciences. 2004. *Ready-To-Go PCR beads*. UK: Amersham Biosciences Group. Hal.: 6-9
37. Sambrook J, Russel DW. 2001.. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Third Edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hal: A.5, B.4-B24, C.3-C.12, D.1-D.6, E.3-E.5, E.10
38. Thermostable DNA Polymerases. <http://arbl.cvmbs.edu/hbooks/genetics/bitech/enzymes/hotpolys.html>. 09 Mei 2008. 18:19:30.
39. Yuwono Triwibowo. 2005. Biologi Molekular. Jakarta: Penerbit Airlangga
40. Quick SM, O'Sullivan DJ. February 2000. Use a Single, Triplicate Arbitarily Primed-PCR Procedure For Molecular Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5): 2227-2231.
41. Geneaid. October 2002. Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit.
42. Sudjadi. 2008. Bioteknologi Kesehatan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Hal: 91-94
43. Staphylococcus Streptococcus. [http://elearning.unej.ac.id/courses/CL773b/document/KULIAH\\_STAPHYILO\\_PSIK, Dr. M. Ali sH ODIKIN.ppt?cidReq=CL7d44](http://elearning.unej.ac.id/courses/CL773b/document/KULIAH_STAPHYILO_PSIK,_Dr._M._Ali_sH_ODIKIN.ppt?cidReq=CL7d44). 16 Juni 2008. 19:0



Gambar 1. Microsentrifuse [Fresco]



Gambar 2. Microsentrifuse Mini Spin [Eppendorf]



Gambar 3. Elektroforesis Gel Mini [Mupid-ex]



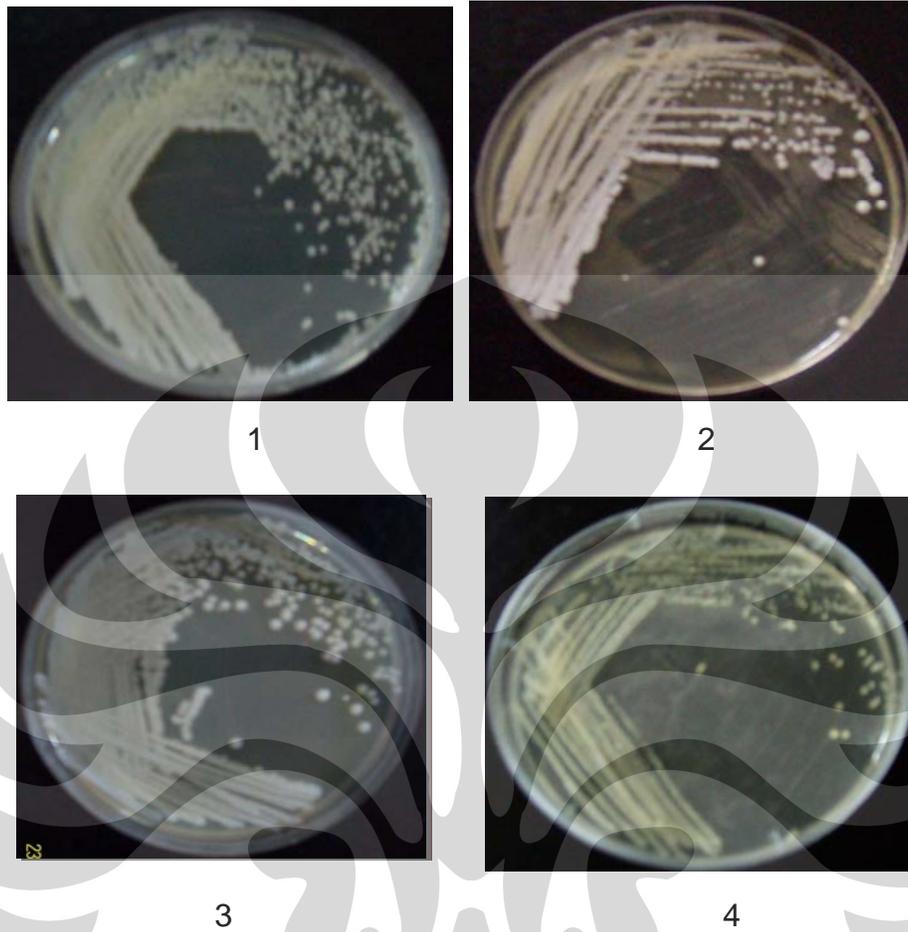
Gambar 4. *Dri-Bath Type 17600* [Barnstead Thermolyne]



Gambar 5. UV-Transluminator [BDA Biometra TI 1] yang terhubung dengan komputer



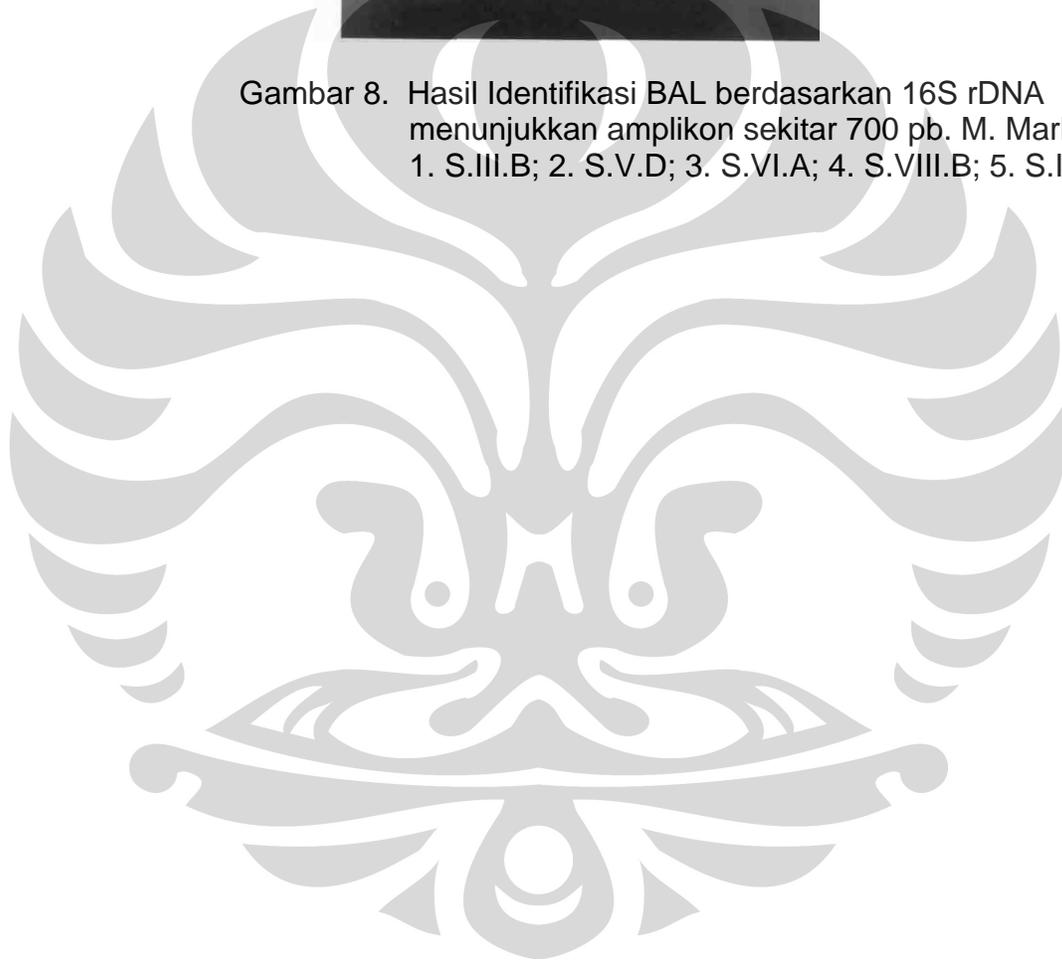
Gambar 6. Thermal Cycler [MJ Mini BioRad]



Gambar 7. Koloni bakteri hasil purifikasi dari kultur stok beku pada medium agar MRS. 1. S.V.D;2. S.VIII.B; 3. S.VI.A; 4. S.IX.B.



Gambar 8. Hasil Identifikasi BAL berdasarkan 16S rDNA menunjukkan amplikon sekitar 700 pb. M. Marker; 1. S.III.B; 2. S.V.D; 3. S.VI.A; 4. S.VIII.B; 5. S.IX.B



**Tabel 1**  
**Hasil pengamatan morfologi koloni isolat**

No	Nama Isolat	Sumber	Morfologi Koloni Bakteri			Periode Tumbuh
			Warna	Permukaan	Bentuk	
1.	S.III.B	Sampel III	Putih	halus	kecil	4 hari
2.	S.V.D	Sampel V	putih	halus	kecil	3 hari
3.	S.VI.A	Sampel VI	putih kekuningan	halus	besar	3 hari
4.	S.VIII.B	Sampel VIII	putih	halus	kecil	4 hari
5.	S.IX.B	Sampel IX	putih kekuningan	halus	kecil	3 hari
6.	S.X.A	Sampel X	Putih	halus	kecil	4 hari

Tabel 2

## Daftar sampel minuman susu fermentasi

No Sampel	Merek Sampel	Produsen	Bentuk	Kandungan bakteri
I	Yakult	Yakult Honsha Co.Ltd (Japan)	Cair	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus casei</i> Shirota strain</li> </ul>
II	Vitacharm	PT. Ultra Prima Artaboga/Orang Tua (Indonesia)	Cair	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Bifidobacteria</i></li> <li>• <i>Lactobacillus casei</i></li> </ul>
III	Dutch mill	Dutch Mill Group (Thailand)	Cair	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> </ul>
IV	Emmi Swiss Premium	Emmi International Ltd (Switzerland)	Semi padat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> </ul>
V	Yummy Yoghurt	PT. Yummy Foot Utama (Indonesia)	Semi padat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Bifidobacteria</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> </ul>
VI	Queen Yoghurt	Queen Bandung Indonesia	Semi padat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> </ul>
VII	Taurus Bioyoghurt	Fajar Taurus (Indonesia)	Semi padat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Bifidobacteria</i></li> </ul>
VIII	Mella Yoghurt	Mella (Indonesia)	Semi padat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> </ul>

Sambungan Tabel 2

IX	Bulla AB	Regal Cream Products Pty. Ltd (Australia)	Semi padat	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li><li>• <i>Bifidobacteria</i></li></ul>
X	Biokul	Diamond Cold Storage (Indonesia)	Semi padat	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li><li>• <i>Bifidobacteria</i></li></ul>



Tabel 3

## Hasil pengamatan amplikon dari 6 isolat terpilih

No	Nama Isolat	Sumber	Amplikon (700 pb)
1.	S.III.B	Sampel III	+
2.	S.V.D	Sampel V	+
3.	S.VI.A	Sampel VI	+
4.	S.VIII.B	Sampel VIII	+
5.	S.IX.B	Sampel IX	+
6.	Kontrol Positif	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+

Tabel 4

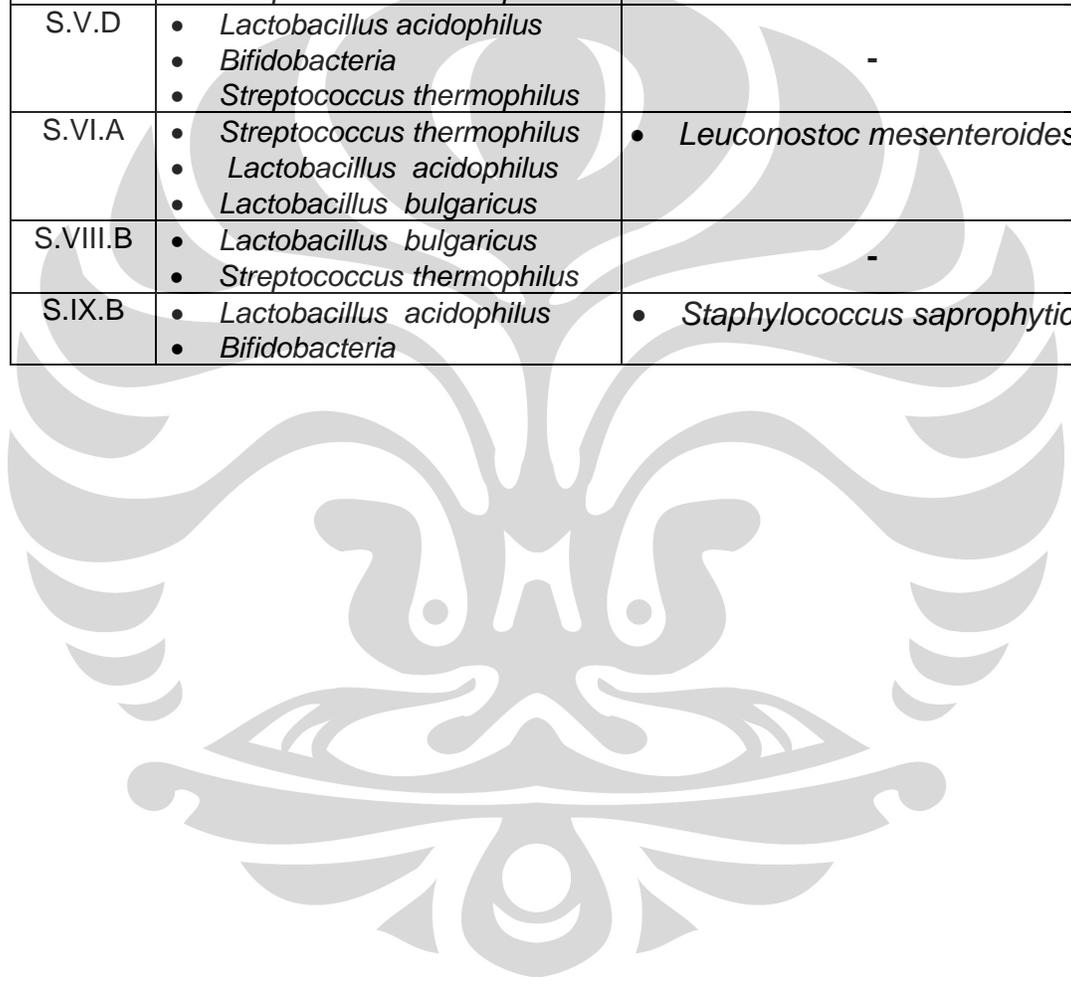
## Hasil analisis sekuens dari 6 ampikon yang terpilih

No	Nama Isolat	Sumber	Hasil Analisis Sekuens ( <i>GenBank</i> )	Homologi
1.	S.III.B	Sampel III	-	
2.	S.V.D	Sampel V	-	
3.	S.VI.A	Sampel VI	-	
4.	S.VIII.B	Sampel VIII	-	
5.	S.IX.B	Sampel IX	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97 %
6.	Kontrol Positif	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	91 %

Tabel 5

## Perbandingan kandungan BAL sampel dan hasil identifikasi

Sampel	Kandungan BAL	Hasil Identifikasi
S.III.B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus haemolyticus</i></li> </ul>
S.V.D	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Bifidobacteria</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> </ul>	-
S.VI.A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Leuconostoc mesenteroides</i></li> </ul>
S.VIII.B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> </ul>	-
S.IX.B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Bifidobacteria</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus saprophyticus</i></li> </ul>



**Lampiran 1**  
**Komposisi Medium**

**Medium de Man Rogosa Sharpe (MRS)**

Setiap 1 L mengandung :

<i>Bacteriological peptone</i>	10,0 g
<i>Beef extract</i>	8,0 g
Sodium acetate	5,0 g
Dextrose	20,0 g
Yeast extract	4,0 g
Dipotassium phosphate	2,0 g
Tween 80	1,0 g
Ammonium citrate	2,0 g
Magnesium sulphate	0,2 g
Manganese sulphat	0,05 g

## Lampiran 2

### Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Reagen Dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Asam Klorida 1 N	Sebanyak 10 mL larutan HCl 12 N ditambahkan aquabides hingga tepat 120 mL.
2.	Asam Asetat 1 N	Sebanyak 10 mL larutan asam asetat glasial 12 N ditambahkan aquabides hingga tepat 120 mL
3.	Cetyltrimethylammonium bromide / CTAB	Sebanyak 2,925 g natrium klorida dilarutkan dalam aquades secukupnya. Sebanyak 5 g CTAB dilarutkan dalam aquades dengan cara memasukkan CTAB sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetic dan dipanaskan dalam hotplate. Lalu masukkan larutan natrium klorida yang telah dibuat sebelumnya ke dalam larutan CTAB dan tambahkan dengan aquabides hingga tepat 100 mL. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
4.	Dapar STET	Sebanyak 32 g sukrosa, 2,42 g tris-base, dan 7,4448 g EDTA dilarutkan dalam sejumlah aquades. Lalu tambahkan 0,4 mL triton x-100 kedalam larutan tersebut, kocok hingga homogen

### Sambungan Lampiran 2

				pH larutan disesuaikan hingga 8,0. Kemudian tambahkan aquabides hingga tepat 400 mL dan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
5.	Dapar Tris Asetat EDTA (TAE) 50 x			Sebanyak 24,2g tris-base, 5,71mL asam asetat dan 5mL EDTA 0,5M dilarutkan dalam aquabides. Kemudian pH larutan disesuaikan hingga 8,0 menggunakan CH <sub>3</sub> COOH 1N, lalu tambahkan dengan aquades hingga 100 mL.
6.	Dapar Tris Asetat EDTA (TAE) 1 x			Sebanyak 5 mL dapar TAE 50 x dilarutkan dengan aquades hingga tepat 250 mL. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
7.	Dinatrium edetat (EDTA) 0,5 M			Sebanyak 18,6g EDTA dilarutkan dalam sedikit aquabides. Larutan ditambahkan natrium hidroksida hingga larut dan hingga pH 8,0. Kemudian tambahkan aquabides hingga tepat 100 mL. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 <sup>0</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

### Sambungan Lampiran 2

8	Lisozim 10 mg/mL	Sebanyak 10 mg lisozim dilarutkan dalam 1 mL tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Larutan disimpan dalam freezer.
9.	Natrium asetat 3 M	Sebanyak 24,6 g natrium asetat dilarutkan dalam aquabides sebanyak 70 mL. Larutan ditambah dengan asam asetat glacial hingga mendapatkan pH 5,2. Kemudian tambahkan aquabides hingga tepat 100 mL. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 <sup>o</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
10.	Natrium hidroksida 1 N	Sebanyak 4 g natrium hidroksida dilarutkan dalam aquades hingga tepat 100 mL.
11.	Natrium klorida 4 M	Sebanayk 93,6 g natrium klorida dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 400 mL. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 <sup>o</sup> C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
12.	Proteinase K 25 mg/mL	Sebanyak 25 mg Proteinase K dilarutkan dalam 1 mL air MilliQ sambil divortex. Larutan disimpan dalam freezer.
13.	Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10 %	Sebanyak 10 g sodium dodesil sulfat dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 100 mL.

**Lampiran 3**  
**Komposisi larutan dan perhitungan yang digunakan**  
**pada proses PCR dalam penelitian**

*Pure Taq Ready-To-Go PCR beads [Sentra BD]*

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

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

Perhitungan PCR mix

1 RTG bead

Primer LAB FW2 100pmol/ $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Primer LAB Rev 100pmol/ $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	36 $\mu\text{L}$ +

Volume total	40 $\mu\text{L}$
--------------	------------------

Volume total dibagi ke dalam 2 mikrotube masing-masing 20  $\mu\text{L}$

PCR mix	20 $\mu\text{L}$
Template DNA	5 $\mu\text{L}$ +
Volume total reaksi	25 $\mu$

## Lampiran 4

### Perbandingan Sekuens DNA S.IX.B dengan Sekuens pada GenBank

Staphylococcus saprophyticus strain RW57 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence Length=1387

Score = 863 bits (467), Expect = 0.0

Identities = 480/493 (97%), Gaps = 0/493 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 21

AGTCGAGCGNNCAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGNCNNNNNGTGAGTAAC 80

|||||

Sbjct 39

AGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAAC 98

Query 81

ACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT 140

|||||

Sbjct 99

ACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT 158

Query 141

AACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGA 200

|||||

Sbjct 159

AACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGA 218

Query 201

CCC CGCCNNATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCG 260

|||||

|||||

Sbjct 219

CCC CGCCGATATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCG 278

Query 261

ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC 320

|||||

Sbjct 279

ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC 338

Query 321

AGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAT 380

|||||

Sbjct 339

AGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAT 398

```

Query 381
GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAACCGTGTAAAGTAACTGTG 440
|||||
Sbjct 399
GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAACCGTGTAAAGTAACTGTG 458

Query 441
CNNGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA 500
|
|||||
Sbjct 459
CACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA 518

Query 501 ATACGTAGGTGGC 513
|||||
Sbjct 519 ATACGTAGGTGGC 531

```

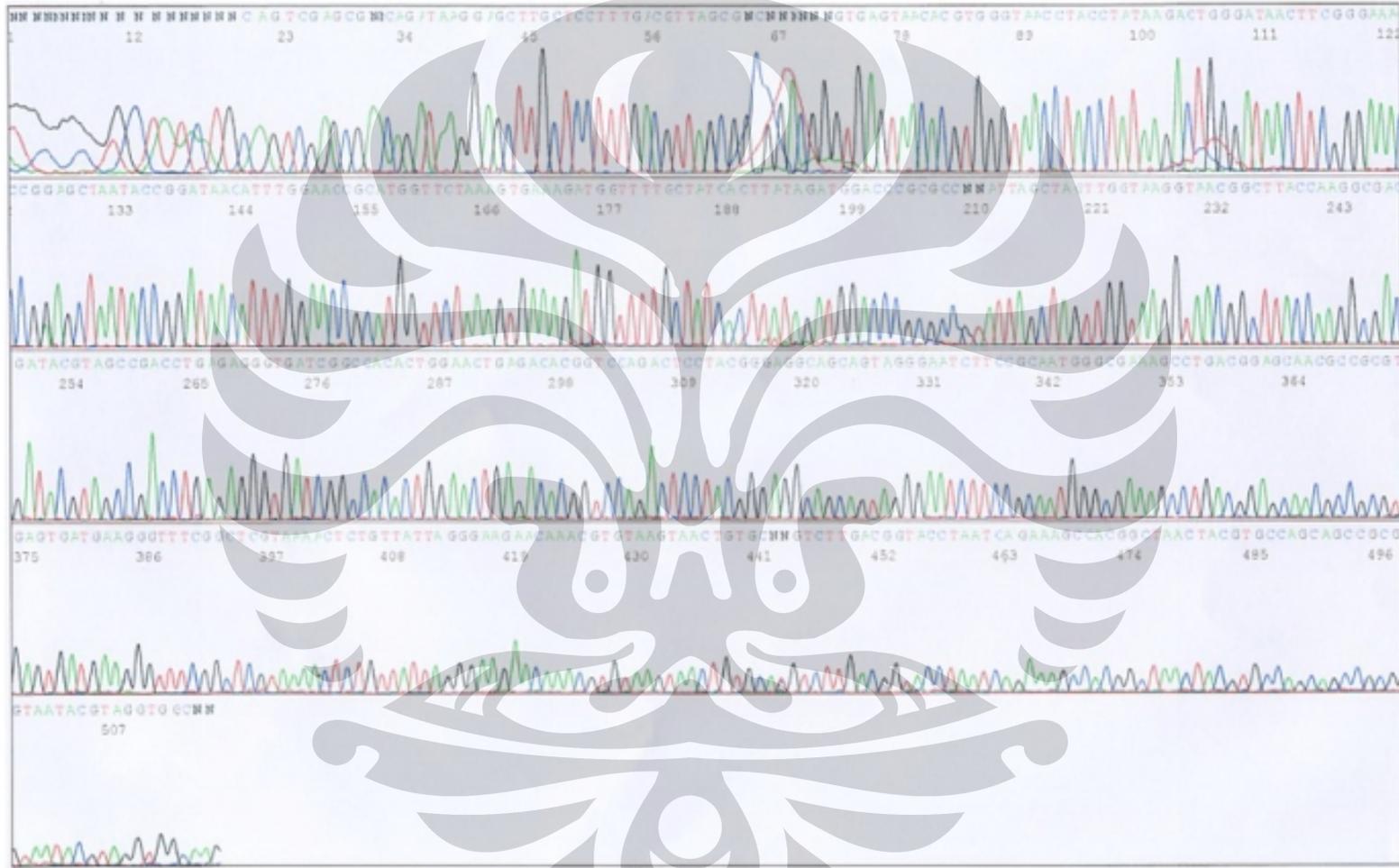
**Keterangan:**

**Query = hasil sekuensing DNA S.IX.B**

**Subject = Staphylococcus saprophyticus strain RW57 (sekuens yang terdapat pada GenBank)**

## Lampiran 5

### Electroforegram hasil sekuensing DNA S.IX.B : *Staphylococcus Saprophyticus*



Keterangan :

G : Guanin  
A : Adenin

C : Sitosin  
T : Timin

**Lampiran 6**  
**Bagan Alur Kerja Pada Penelitian**

