



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**IDENTIFIKASI GEN DARI BAKTERI ASAM LAKTAT  
PENGHASIL BAKTERIOSIN *Streptococcus macedonicus* MBF  
10-2 DAN *Weissella confusa* MBF 8-1 DENGAN TEKNIK  
*GENOMIC LIBRARY***

**SKRIPSI**

**EVELINA  
0806398146**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**IDENTIFIKASI GEN DARI BAKTERI ASAM LAKTAT  
PENGHASIL BAKTERIOSIN *Streptococcus macedonicus* MBF  
10-2 DAN *Weissella confusa* MBF 8-1 DENGAN TEKNIK  
*GENOMIK LIBRARY***

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains**

**EVELINA  
0806398146**

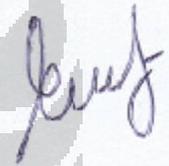
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**

## SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 16 Juli 2012



Evelina

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.



Nama : Evelina  
NPM : 0806398146  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 16 Juli 2012

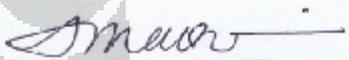
## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Evelina  
NPM : 0806398146  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi : Identifikasi Gen dari Bakteri Asam Laktat  
Penghasil Bakteriosin *Streptococcus macedonicus*  
MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 dengan  
Teknik *Genomic Library*

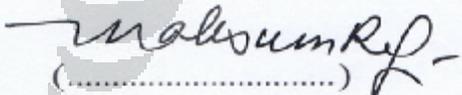
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

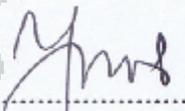
Pembimbing I : Dr. Amarila Malik Apt., M.Si

  
(.....)

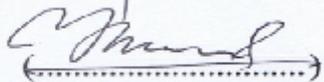
Pembimbing II : Prof. Maksum Radji M.Biomed., Ph.D.

  
(.....)

Penguji I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS.

  
(.....)

Penguji II : Dr. Herman Suryadi, MS

  
(.....)

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 16 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas selama masa pendidikan dan penelitian berlangsung.
2. Ibu Dr. Amarila Malik Apt., M.Si, selaku pembimbing I, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan biaya, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama kegiatan penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Bapak Prof. Dr. Maksun Radji, M.Biomed, selaku pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dan bantuan yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Orang tua tercinta dan kakak yang selalu memberikan doa, dukungan, perhatian, kasih sayang dan semangat selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Berna Elya, M.S., selaku pembimbing akademis.
6. Seluruh staf pengajar, karyawan, laboran Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.
7. Amanda Rusli dan Theda Lukito yang telah banyak membagi ilmu serta semangat.

8. Editha, Furqon, Neti, Ola, Bu Melda, Radit, Iqbal, Pauline yang senantiasa menemani hari-hari penelitian.
9. Hannie Puspaananda selaku sahabat yang tak henti-hentinya memberikan dorongan dan semangat kepada penulis.
10. Ester, Ebonk, Yurika, Citra, Nui, Cyntiani, Wenny, Nath, Vanie, Gladys atas doa dan dukungannya.
11. Teman-teman farmasi angkatan 2008 atas kebersamaan dan dukungannya kepada penulis.
12. Teman-teman Recis Tefvina, Sasa, Ivon, Imel, Ata yang banyak memberikan motivasi dan hiburan kepada penulis.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikannya skripsi ini.

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

Penulis

2012

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Evelina  
NPM : 0806398146  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Identifikasi Gen dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 dengan Teknik *Genomic Library*

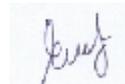
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 16 Juli 2012

Yang menyatakan



( Evelina )

## ABSTRAK

Nama : Evelina  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Identifikasi Gen dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin  
*Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa*  
MBF 8-1 dengan Teknik *Genomic Library*

Beberapa Bakteri Asam Laktat (BAL) diketahui menghasilkan peptida antimikroba yang dikenal sebagai bakteriosin. Bakteriosin mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan bakteri penghasil. Dari penelitian terdahulu, telah dilakukan skrining pada genus *Streptococcus* dan *Weissella* dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi Universitas Indonesia. Hasilnya menunjukkan bahwa *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 memiliki aktivitas bakteriosin terhadap bakteri indikator *Leu. mesenteroides*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen bakteriosin dari bakteri tersebut dengan teknik *genomic library*. Dalam hal ini DNA genomik BAL dipotong acak secara parsial dengan menggunakan enzim *Sau3A1* dan diklon pada vektor pUC19 terdigest *BamHI* kemudian ditransformasikan ke dalam *E.coli* kompeten. Seleksi rekombinan dilakukan dengan seleksi koloni biru putih. Koloni putih yang didapat diidentifikasi dengan PCR koloni menggunakan kombinasi primer universal M13 dan degenerate Bac. Hasilnya adalah dua dari tiga koloni putih klon *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan satu koloni putih dari klon *Weissella confusa* MBF 8-1 memberikan hasil PCR koloni yang positif dengan kedua kombinasi primer yang dipakai. Meskipun demikian setelah dilakukan sekuensing DNA, fragmen DNA tersebut teridentifikasi bukan sebagai gen bakteriosin.

Kata Kunci : bakteriosin, bakteri asam laktat, *genomic library*, PCR, primer *degenerate*, *Streptococcus*, *Weissella*.

xv + 76 halaman; 23 gambar; 15 lampiran, 1 tabel

Daftar Acuan : 43 (1990-2011)

## ABSTRACT

Name : Evelina  
Program Study : Farmasi  
Title : Gene Identification of Bacteriocins Producing – Lactic Acid Bacteria *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 and *Weissella confusa* MBF 8-1 by using Genomic Library Technique

Many Lactic Acid Bacteria (LAB) are known to produce antimicrobial peptides, termed bacteriocins. Bacteriocins can inhibit the growth of closely related bacteria. From previous study, screening was performed on genus *Streptococcus* and *Weissella* from the collection of Laboratory of Microbiology and Biotechnology Pharmacy Universitas Indonesia. Result showed that *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 and *Weissella confusa* MBF 8-1 possess bacteriocins activity against indicator bacteria *Leu. mesenteroides* strain TISTR 120 and JCM 6124. This study aimed to isolate bacteriocins gene from those bacteria by using genomic library technique. Genomic DNA LAB was partially digested randomly using restriction enzyme *Sau3A1* then was cloned to pUC19 vector which has been digested with *Bam*HI, followed by transformation to competent *E.coli*. Recombinant selection was performed using blue white screening colonies and antibiotic marker. The white colonies was analyzed by Colony PCR using primer combination M13 universal dan degenerate Bac. The result is two of three white colonies from *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 clone and one colony from *Weissella confusa* MBF 8-1 clone gave positif result of Colony PCR using two combinations primer. However, after DNA sequencing, the DNA fragment was identified not as bacteriocins gene.

Keywords : bacteriocins, degenerate primer, genomic library, lactic acid bacteria, PCR, *Streptococcus*, *Weissella*.

xv +76 pages ; 23 pictures; 15 appendixes, 1 table

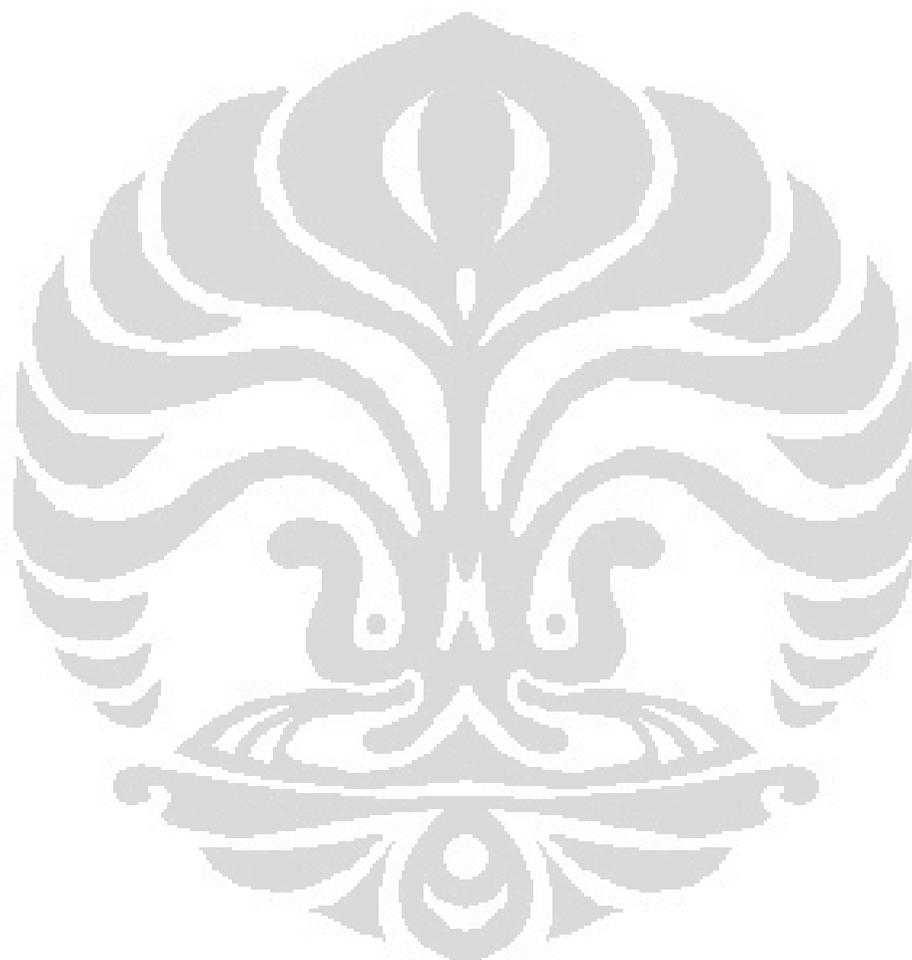
Bibliography : 43 (1990-2011)

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
<b>1. PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	2
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	<b>3</b>
2.1. Bakteriosin	3
2.2. Bakteri Penghasil Bakteriosin	4
2.3. Protein Imunitas	6
2.4. Ekstraksi DNA Genomik Menggunakan CTAB	7
2.5. Kloning Gen	8
2.6. Kloning Gen dengan Menggunakan Teknik <i>Genomic Library</i>	8
2.7. Plasmid sebagai Wahana Kloning	9
2.8. Digesti	11
2.9. Ligasi	14
2.10. Transformasi	14
2.11. Seleksi Hasil Transformasi Koloni Biru Putih dan Ampisilin	15
2.12. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	16
2.13. Elektroforesis Gel Agarosa	20
2.14. Sekuensing	21
<b>3. METODE PENELITIAN</b>	<b>23</b>
3.1. Waktu dan Tempat	23
3.2. Bahan	23
3.2.1. Sampel dan Bakteri	23
3.2.2. Medium	23
3.2.3. Bahan Kimia	23
3.3. Alat	24
3.4. Cara Kerja	24
3.4.1. Pembuatan Medium	24
3.4.1.1 Medium MRS Agar	24

3.4.1.2	Medium MRS untuk Agar Miring .....	25
3.4.1.3	Medium MRS Cair.....	25
3.4.1.4	Medium LB Agar-Ampisilin.....	25
3.4.1.5	Medium LB Agar untuk Transformasi .....	26
3.4.1.6	Medium LB Cair .....	26
3.4.1.7	Medium LB Cair dengan Penambahan Ampisilin .....	27
3.4.2.	Pembuatan Larutan Dapar dan Pereaksi .....	27
3.4.2.1	Dapar STET .....	27
3.4.2.2	SDS 10%.....	27
3.4.2.3	Proteinase K 25 mg/mL .....	27
3.4.2.4	CTAB.....	28
3.4.2.5	Tris Base 1 M.....	28
3.4.2.6	Tris HCl 10 mM pH 8.....	28
3.4.2.7	Lisozim 10 mg/ml.....	28
3.4.2.8	Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M.....	28
3.4.2.9	Dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 50 X.....	29
3.4.2.10	Dapar TAE 1X.....	29
3.4.2.11	X-Gal 20 mg/ml .....	29
3.4.2.12	IPTG 0,1 M .....	29
3.4.3.	Proses Peremajaan dan Pemiakan Kultur .....	29
3.4.4.	Ekstraksi DNA Genomik BAL .....	30
3.4.5.	Isolasi DNA Plasmid .....	31
3.4.6.	Digest DNA Genomik menggunakan Endonuklease Restriksi <i>Sau3A1</i> .....	32
3.4.7.	Digest DNA Plasmid menggunakan Endonuklease Restriksi <i>BamHI</i> .....	32
3.4.8.	Analisis Fragmen DNA dengan Elektroforesis Gel Mini.....	32
3.4.9.	Purifikasi Fragmen DNA dari Gel Elektroforesis.....	33
3.4.10.	Ligasi Fragmen DNA ke dalam Vektor pUC19 .....	33
3.4.11.	Transfomasi Hasil Ligasi ke dalam One Shot® TOP 10 <i>Chemically Competent E.coli</i> dengan Menggunakan <i>Heat Shock</i> .....	34
3.4.12.	Seleksi Koloni Biru Putih.....	34
3.4.13.	PCR Koloni .....	34
3.4.14.	Sekuensing Produk PCR .....	35
3.4.15.	Analisis Hasil Sekuensing.....	35
3.4.16.	Verifikasi Rekombinan dengan Endonuklease Restriksi.....	36
3.5.	Skema Kerja.....	37
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>38</b>
4.1.	Isolasi DNA Genomik .....	38
4.2.	Isolasi Plasmid pUC 19.....	40
4.3.	Kloning DNA Genomik BAL ke dalam plasmid pUC19 .....	41
4.4.	PCR Koloni .....	45
4.5.	Hasil Sekuensing.....	47
4.6.	Verifikasi dengan Menggunakan Endonuklease Restriksi.....	51

<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>56</b>
5.1. Kesimpulan .....	56
5.2. Saran.....	56
 DAFTAR ACUAN .....	 57



## DAFTAR GAMBAR

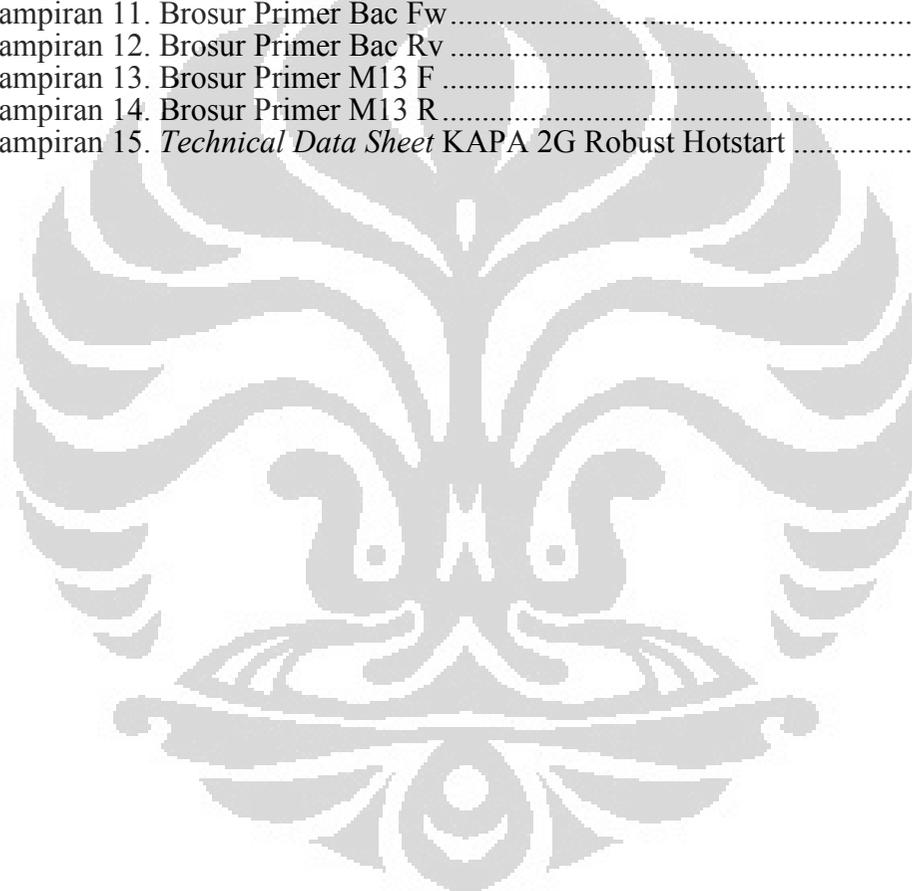
Gambar 2.1.	Mekanisme kerja protein imunitas bakteriosinkelas Ila .....	6
Gambar 2.2	Peta restriksi pUC19 .....	10
Gambar 2.3	Contoh situs restriksi dari endonuklease <i>Bam</i> HI dan <i>Sau</i> 3A yang menghasilkan ujung kohesif.....	13
Gambar 2.4	Contoh situs restriksi dari endonuklease <i>Alu</i> I yang menghasilkan ujung tumpul.....	14
Gambar 4.1.	Hasil isolasi DNA .....	41
Gambar 4.2	Hasil orientasi digest DNA genomik <i>Streptococcus macedonicus</i> MBF 10-2 dan <i>Weissella confusa</i> MBF 8-1 dengan enzim <i>Sau</i> 3A 1.....	43
Gambar 4.3.	Koloni biru putih dari rekombinan pUC19- <i>Weissella confusa</i> MBF 8-1 yang telah diambil koloni putihnya .....	45
Gambar 4.4.	Hasil PCR koloni dengan menggunakan kombinasi primer Bac Fw dan M13 Rv. ....	46
Gambar 4.5.	Hasil PCR koloni menggunakan kombinasi primer M13 Fwd dan Bac Rv .....	47
Gambar 4.6.	Electropherogram hasil sekuensing Klon A5 dengan primer universal M13 Fw .....	48
Gambar 4.7.	Electropherogram hasil sekuens klon A5 dengan primer universal M13 Rv.....	49
Gambar 4.8.	Electropherogram hasil sekuensing klon A5 dengan primer deg Bac Fw. ....	50
Gambar 4.9.	Electropherogram hasil sekuensing klon A5 dengan primer deg Bac Rv .....	51
Gambar 4.10.	Hasil verifikasi dengan enzim restriksi dari klon A2 .....	52
Gambar 4.11.	Hasil verifikasi dengan enzim restriksi dari klon A4 .....	53
Gambar 4.12.	Hasil verifikasi dengan enzim restriksi dari klon A5 .....	54
Gambar 4.13.	Hasil verifikasi dengan enzim restriksi dari klon B2.....	55
Gambar 1.	Mikrosentrifus berpendingin.....	60
Gambar 2.	Mikrosentrifus Mini Spin.....	60
Gambar 3	<i>Orbital Shaker Incubator</i> .....	61
Gambar 4.	Thermal Cycler .....	61
Gambar 5.	Alat elektroforesis gel mini.....	62
Gambar 6.	UV transilluminator .....	62

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Beberapa contoh endonuklease restriksi beserta situs pemotongannya .....	12
-----------	--	----

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Gambar alat-alat yang digunakan di laboratorium.....	60
Lampiran 2.	Komposisi medium .....	63
Lampiran 3.	<i>Certificate of Analysis BamHI</i> .....	64
Lampiran 4.	<i>Certificate of Analysis Sau3A1</i> .....	65
Lampiran 5.	<i>Certificate of Analysis T4 DNA Ligase</i> .....	66
Lampiran 6.	<i>Certificate of Analysis Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder</i> .....	67
Lampiran 7.	<i>Certificate of Analysis Solis BioDyne 100 bp DNA Ladder</i> ....	68
Lampiran 8.	Solis Biodyne 1 kb DNA Ladder .....	69
Lampiran 9.	Solis Biodyne 100 bp DNA Ladder .....	70
Lampiran 10.	<i>Certificate of Analysis E.coli TOP 10</i> .....	71
Lampiran 11.	Brosur Primer Bac Fw .....	72
Lampiran 12.	Brosur Primer Bac Rv .....	73
Lampiran 13.	Brosur Primer M13 F .....	74
Lampiran 14.	Brosur Primer M13 R.....	75
Lampiran 15.	<i>Technical Data Sheet KAPA 2G Robust Hotstart</i> .....	76



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Dalam beberapa tahun terakhir resistensi antibiotik menjadi masalah serius karena penggunaannya yang luas pada pengobatan penyakit manusia dan hewan (Lipsitch, Bergstrom, Levin, 2000; Yoneyama dan Katsumata, 2006). Akibatnya muncul beberapa galur bakteri yang resisten sehingga penggunaan antibiotik menjadi terbatas. Hal ini memicu para peneliti untuk menciptakan kelas baru dari antimikroba yang dapat berguna dalam pengobatan (Kumar dan Schweiser, 2005; Fisher, Meroueh dan Mobashery, 2005).

Untuk mengendalikan penyalahgunaan antibiotik dalam makanan dan produk pakan, salah satu alternatif yang menjanjikan yaitu penerapan peptida bakteri sebagai agen antimikroba. Sekarang ini yang banyak menarik perhatian adalah bakteriosin, yaitu peptida yang dihasilkan oleh bakteri yang selama ini banyak dilaporkan diperoleh dari bakteri asam laktat. Bakteriosin memiliki aktivitas dalam jangkauan nanomolar dan tidak toksik (Parada, Caron, Medeiros, dan Soccol, 2007). Disamping itu bakteriosin juga memiliki potensi sebagai komplemen dari antibiotik konvensional dalam pemakaiannya untuk memperkuat aktivitasnya (Drider, Fimland, Hechard, McMullen dan Prevost, 2006; Nes, Yoon, Diep, 2007)

Sensitivitas antimikroba bakteriosin dari bakteri asam laktat dimodulasi oleh protein imunitas bakteriosin. Protein imunitas merupakan protein terakumulasi yang dihasilkan agen antimikroba melalui sekresi intraselular. Gen bakteriosin merupakan satu grup gen dengan gen imunitasnya. Melalui sistem modulasi (*quorum sensing*), sel bakteri dapat bertahan dan terus tumbuh serta mengatur ekspresi bakteriosin termasuk melindungi bakteri penghasil bakteriosin dari bakteriosin yang dihasilkannya (Fremaux, Hechard dan Cenatiempo, 1995; Oppegard, Emanuelsen, Thorbek, Fimland dan Nissin, 2010).

Dari penelitian terdahulu telah diketahui terdapat beberapa bakteri asam laktat (BAL) isolat lokal yang memiliki aktivitas bakteriosin yang mampu menghambat bakteri indikator *Leuconostoc mesenteroides*. BAL tersebut adalah

*Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 (Sari, Anita, Radji dan Malik, 2011). Dari hasil penelitian tersebut, akan dilakukan identifikasi lebih lanjut perihal gen bakteriosin yang terdapat didalamnya dengan cara melakukan kloning gen dengan metode *genomic library*. Kemudian sekuens DNA gen bakteriosin akan diketahui melalui sekuensing produk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) hasil amplifikasi dengan primer *degenerate* bakteriosin dan primer universal primer pUC19.

Manfaat penelitian ini dapat dikembangkan untuk kemungkinan memperoleh peptida antimikroba yang baru struktur molekulnya maupun memproduksi peptida antimikroba sebagai bahan baku yang berpotensi untuk dimanfaatkan di dalam industri pangan dan farmasi (kesehatan).

## 1.2. Tujuan

Melakukan identifikasi gen bakteriosin dari BAL *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 dengan teknik *genomic library*.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Bakteriosin

Bakteriosin merupakan peptida antimikroba yang diproduksi secara luas oleh bakteri, termasuk bakteri asam laktat, yang secara aktif menghambat bakteri Gram positif lainnya (Mozzi, Raya dan Vignolo, 2010). Umumnya ukuran peptida bakteriosin berkisar antara 3 hingga 6 kDa. Bakteriosin dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang memiliki hubungan sekerabat dengan bakteri penghasil, patogen makanan dan bakteri pembusuk (Klaenhammer, 1993).

Bakteriosin pertama kali ditemukan oleh A. Gratia tahun 1925, dengan senyawa yang dikenal sebagai colicin yang berasal dari *Escherichia coli* V dan dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* S. Bakteriosin dapat membunuh bakteri sensitif dengan membentuk pori pada membran sitoplasma atau dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri (Jack, Tagg dan Ray, 1995; Fimland, Eijsink, dan Meyer, 2002; Quadri, 2002).

Sebagai antimikroba bakteriosin dapat terdegradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan hewan dan manusia. Aktivitas antimikroba bakteriosin menjadi hilang atau tidak stabil dengan adanya enzim proteolitik, seperti protease K atau tripsin (Parada, Caron, Medeiros dan Soccol, 2007).

Gen penyandi bakteriosin umumnya pendek. Salah satu contohnya adalah gen penyandi prekursor dari bakteriosin mundticin (*munA*) yang mengkodekan 58 asam amino (174 bp) (Drider, Fimland, Hechard, McMullen dan Prevost, 2006). Bakteriosin dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelas menurut karakteristik biokimia dan genetiknya, yaitu kelas I, II, dan kelas III. Bakteriosin kelas I disebut lantibiotik, merupakan peptida kecil yang stabil terhadap panas. Lantibiotik berukuran kurang dari 5 kDa, mengandung asam amino alami yaitu lanthionin. Contoh yang paling dikenal dari kelas ini adalah nisin dan macedocin (Drider, Fimland, Hechard, McMullen dan Prevost 2006). Bakteriosin kelas II merupakan bakteriosin non lantibiotik yang berukuran kecil (kurang dari 10 kDa) dan stabil terhadap panas. Bakteriosin kelas II dibagi menjadi beberapa subkelas yaitu bakteriosin kelas II a, II b, II c, dan II d. Bakteriosin kelas II a merupakan peptida

yang efektif melawan genus *Listeria*, termasuk di dalamnya adalah pediocin dan sakacin P. Ukuran protein yang dihasilkan antara 27 hingga 48 asam amino yang dicirikan dengan kehadiran urutan asam amino di daerah N-terminal yang serupa YGNGVXCXXXXCXV (Mozzi, Raya dan Vignolo, 2010). Bakteriosin kelas II b merupakan bakteriosin yang terdiri dari dua buah peptida yang tidak termodifikasi karena mengandung dua peptida yang berbeda satu sama lain, terdapat dalam jumlah yang sama, membentuk pori pada membran sel target, dan mengganggu gradient proton dari sel target. Bakteriosin kelas II c memiliki efek yang luas terhadap permeabilitas membran, terdiri dari satu peptida berbentuk siklik. Bakteriosin kelas II d merupakan bakteriosin nonsiklik dan tidak mempunyai urutan asam amino yang serupa dengan pediocin. Bakteriosin kelas III merupakan bakteriosin non lantibiotik, berupa protein besar berukuran lebih dari 30 kDa yang tidak tahan panas dan yang biasanya dihasilkan oleh genus *Lactobacillus*. Contoh dari bakteriosin yang termasuk dalam kelas III adalah acidofilicin A and lactacins A (Parada, Caron, Medeiros dan Soccol, 2007).

Salah satu contoh bakteriosin yang telah banyak diaplikasikan adalah nisin. Bakteriosin nisin mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Nisin telah banyak diaplikasikan dalam produk pangan sehari-hari (Mozzi, Raya dan Vignolo, 2010).

## 2.2. Bakteri Penghasil Bakteriosin

Semua organisme memproduksi peptida antimikroba yang digunakan untuk sistem imun yang melindungi mereka dari invasi organisme lain. Dalam dunia bakteri, peptida antimikroba ini memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan bakteri, yang lebih dikenal dengan sebutan bakteriosin. Bakteriosin diproduksi baik oleh bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif. Bakteriosin dari bakteri Gram positif memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri dari spesies yang dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin itu sendiri dan juga terhadap spesies lain yang berbeda (Nes, Yoon, Diep, 2007). Kelompok bakteri Gram positif yang sudah terkenal sebagai penghasil bakteriosin salah satunya BAL. Morfologi dari BAL adalah berbentuk batang ataupun kokus, tidak membentuk spora dan umumnya bersifat anaerobik fakultatif. BAL terdiri dari

banyak genus antara lain : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* . Sebagian besar BAL merupakan organisme yang tidak patogen dengan predikat *Generally Recognized as Safe* (GRAS) dan memiliki peran penting dalam pengawetan makanan serta produk fermentasi (Parada, Caron, Medeiros dan Soccol, 2007).

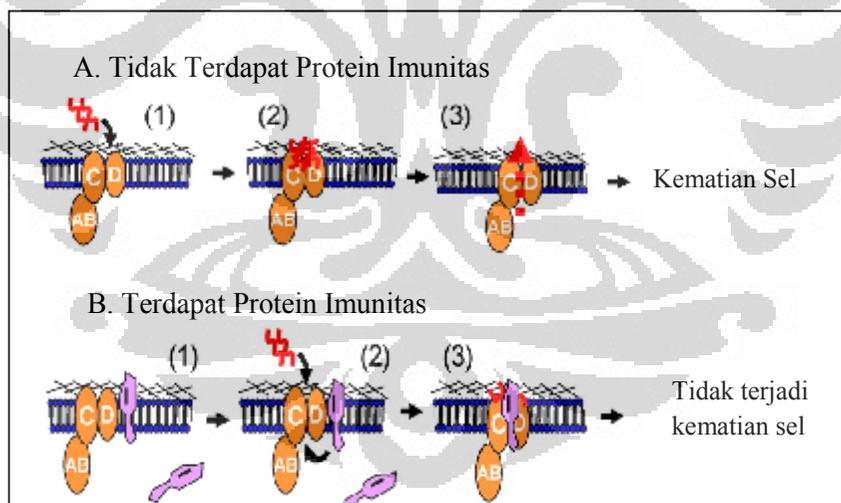
Genus *Streptococcus* tergolong dalam kelompok bakteri Gram positif yang berbentuk kokus atau bulat ketika dilihat di bawah mikroskop. Selnya bersifat nonmotil, tidak membentuk endospora, dan diameter selnya kurang dari 2  $\mu\text{m}$ . Seluruh spesiesnya merupakan organisme yang bersifat anaerobik fakultatif, beberapa spesies membutuhkan tambahan  $\text{CO}_2$  untuk pertumbuhannya. Genus *Streptococcus* ini terdiri atas beberapa kelompok, antara lain : kelompok *pyogenic*, kelompok *mutan*, dan kelompok *bovis*. Beberapa spesies *Streptococcus* dapat menghasilkan bakteriosin, salah satunya berasal dari kelompok *bovis* yaitu *Streptococcus macedonicus*. Spesies ini pertama kali diisolasi dari produk pangan sehari-hari, seperti keju Greek Kasserli dan keju Italia. Jumlah basa G + C dalam DNA dari spesies ini berkisar antara 34,6 hingga 38 % (Bergey dan Boone, 2009).

Genus *Weissella* memiliki sel berbentuk batang pendek dengan ujung yang membulat dan biasanya ditemukan dalam bentuk rantai pendek. *Weissella* merupakan bakteri Gram positif yang bersifat nonmotil, anaerobik fakultatif, dan tidak berspora. Tempat hidup dari genus *Weissella* bervariasi, ada yang berasosiasi dengan produk daging, dengan produk keju, ataupun di saluran pencernaan manusia. Beberapa spesies dari genus ini antara lain adalah *Weissella cibara*, *Weissella koreensis*, *Weissella confusa* (Bergey dan Boone, 2009). Beberapa spesies dari genus *Weissella* diketahui menghasilkan bakteriosin yaitu spesies *Weissella confusa* dan *Weissella cibara*. Bakteriosin dari genus *Weissella* baru pertama kali ditemukan pada tahun 2007 pada spesies *Weissella cibara* yang diisolasi dari plaasom, suatu makanan fermentasi yang berasal dari Thailand (Sriornual, Yanagida, Lin, Hsiao, Chen, 2007).

### 2.3. Protein Imunitas

Bakteri penghasil bakteriosin terlindungi dari bakteriosin yang dihasilkannya sendiri oleh karena adanya ekspresi dari protein imunitas (Fimland, Eijsink dan Meyer, 2002). Protein imunitas terdiri dari 81-115 asam amino yang memiliki variasi persamaan urutan nukleotida antara 5%-85%. Melalui analisis fungsional telah diketahui bahwa protein imunitas terletak intraselular dan bagian intraselularnya terdiri dari dua fraksi, yaitu fraksi kecil terkait membran dan fraksi yang lebih besar terkait sitoplasma (Fimland, Eijsink dan Meyer, 2002; Eijsink, V., Skeie, Middelhoven, Bruberg, dan Nes, 1998).

Gen bakteriosin terletak dalam satu grup gen dengan gen pengkode protein imunitasnya. (Oppegard, Emanuelsen, Thorbek, Fimland dan Nissin, 2010). Cara kerja dari protein imunitas itu sendiri belum diketahui pasti. Mekanisme keberadaan protein imunitas yang melindungi bakteri penghasil bakteriosin dari bakteriosin yang dihasilkannya sendiri dapat diilustrasikan seperti tampak pada Gambar 2.1.



Sumber : Nies, Diep dan Holo, 2007, telah diolah kembali.

Keterangan : Gambar A, bakteriosin (merah) berikatan dengan reseptor target bakteriosin C dan D (orange), akibatnya terjadinya kerusakan pada membran sitoplasma sehingga sel bakteri mati. Gambar B, protein imunitas (merah muda) akan mengenali reseptor bakteriosin dan terjadi ikatan yang kuat sehingga bakteriosin tidak dapat berikatan dengan reseptornya dan tidak terjadi kerusakan pada membran sitoplasma.

**Gambar 2.1.** Mekanisme kerja protein imunitas bakteriosin kelas IIa

Mekanisme kerja dari protein imunitas pada suatu bakteri diduga adalah dengan mencegah ikatan antara bakteriosin dan reseptornya. Ketika bakteri tersebut menghasilkan bakteriosin maka protein imunitas bebas akan berikatan kuat dengan reseptor yang sama untuk bakteriosin. Hal ini mencegah terbentuknya pori pada membran sitoplasma yang dapat membahayakan bakteri tersebut (Nies, Diep dan Holo, 2007).

#### **2.4. Ekstraksi DNA Genomik dengan Menggunakan Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB)**

Ekstraksi DNA merupakan salah satu cara yang umum dilakukan dalam fisiologi bakteri, genetik, biologi molekular dan biokimia. Dengan melakukan ekstraksi DNA akan didapatkan DNA murni yang dapat digunakan untuk berbagai aplikasi, seperti mempelajari struktur dan sifat kimia DNA, memeriksa interaksi DNA dengan protein, hibridisasi DNA, sekuensing atau keperluan PCR, untuk keperluan penelitian genetika, dan kloning gen (Ausubel et al., 2003).

Pada proses ekstraksi DNA, sel dari organisme akan dilisis kemudian DNA akan diisolasi dengan menggunakan metode tertentu. Setelah proses lisis, konstituen seluler selain DNA akan dihilangkan. Kemudian dilakukan pengendapan DNA dari larutan menggunakan alkohol yang selanjutnya dilarutkan dalam ddH<sub>2</sub>O atau dapa yang sesuai (Ausubel et al., 2003).

Salah satu metode ekstraksi DNA adalah dengan menggunakan *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB). Pada konsentrasi NaCl di bawah 0,5M, CTAB merupakan surfaktan kationik yang dapat membentuk kompleks yang tidak larut dengan asam nukleat. Sebagian besar karbohidrat serta protein akan larut dalam kondisi tersebut sehingga dapat dipisahkan dari DNA yang mengendap melalui sentrifugasi. Kompleks CTAB dengan asam nukleat akan larut pada konsentrasi garam yang lebih tinggi, oleh karena itu asam nukleat dapat dipisahkan dari deterjen (Brown, 2010).

Setelah kompleks CTAB asam nukleat dilarutkan melalui peningkatan konsentrasi garam, selanjutnya dilakukan pengendapan asam nukleat dengan penambahan etanol. Deterjen yang lebih mudah larut dalam etanol dibandingkan

dalam air, akan tetap berada dalam larutan supernatan setelah disentrifugasi (Brown, 2010).

## 2.5. Kloning Gen

Klon merupakan sebuah populasi dari sel yang identik, terutama yang mengandung molekul DNA rekombinan yang identik (Brown, 2010). Klon didapat dari hasil manipulasi gen. Manipulasi gen merupakan pembentukan kombinasi baru materi yang dapat diturunkan dengan melakukan penyisipan molekul-molekul asam nukleat yang dihasilkan dengan cara apapun di luar sel, ke dalam suatu virus, plasmid bakteri atau sistem pembawa lainnya yang memungkinkan terjadinya penggabungan ke dalam organisme inang secara tidak alami tetapi selanjutnya mampu melakukan penggandaan lagi (Primrose, Twyman, dan Old, 2001). Kloning fragmen DNA dapat membantu untuk memperoleh sekuens spesifik dari DNA tanpa gangguan dari sekuens yang lain (Brown, 2010). Ada beberapa teknik yang biasa dilakukan dalam kloning gen, utamanya yaitu secara terkait sel (*in vivo*) ataupun tanpa menggunakan sel (*in vitro*). Pada kloning gen terkait sel tahap awal dilakukan dengan menggabungkan fragmen DNA pada sekuens DNA yang mampu bereplikasi secara mandiri, kemudian ditransformasikan ke dalam sel inang khusus untuk diperbanyak secara selektif. Untuk kloning gen tanpa menggunakan sel dapat dilakukan dengan memanfaatkan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Strachan dan Read, 1999).

## 2.6. Kloning Gen dengan Menggunakan Teknik *Genomic Library*

Salah satu teknik kloning gen pada tahap sel adalah dengan *genomic library*. *Genomic library* dibuat dengan memurnikan total sel DNA, kemudian dipotong secara parsial dan acak dengan menggunakan endonuklease restriksi untuk merepresentasikan populasinya. Pemotongan parsial dapat dicapai dengan membatasi waktu reaksi ataupun dengan mengatur jumlah endonuklease restriksi yang digunakan (Ausubel et al., 2003). Fragmen yang didapatkan kemudian diklon ke dalam vektor yang sesuai (Brown, 2010).

Hasil pemotongan parsial dari DNA genomik harus dilakukan pemisahan ukuran sebelum diligasikan dengan vektor. Tujuannya adalah untuk

menghilangkan fragmen yang ukurannya terlampau kecil ataupun terlampau besar. Jika hal ini tidak dilakukan maka fragmen ukuran kecil dapat saling berligasi dan membentuk rekombinan yang sulit untuk dianalisis. Sedangkan fragmen DNA berukuran besar dapat berligasi dengan vektor namun menghambat pertumbuhannya (Ausuble et al., 2003).

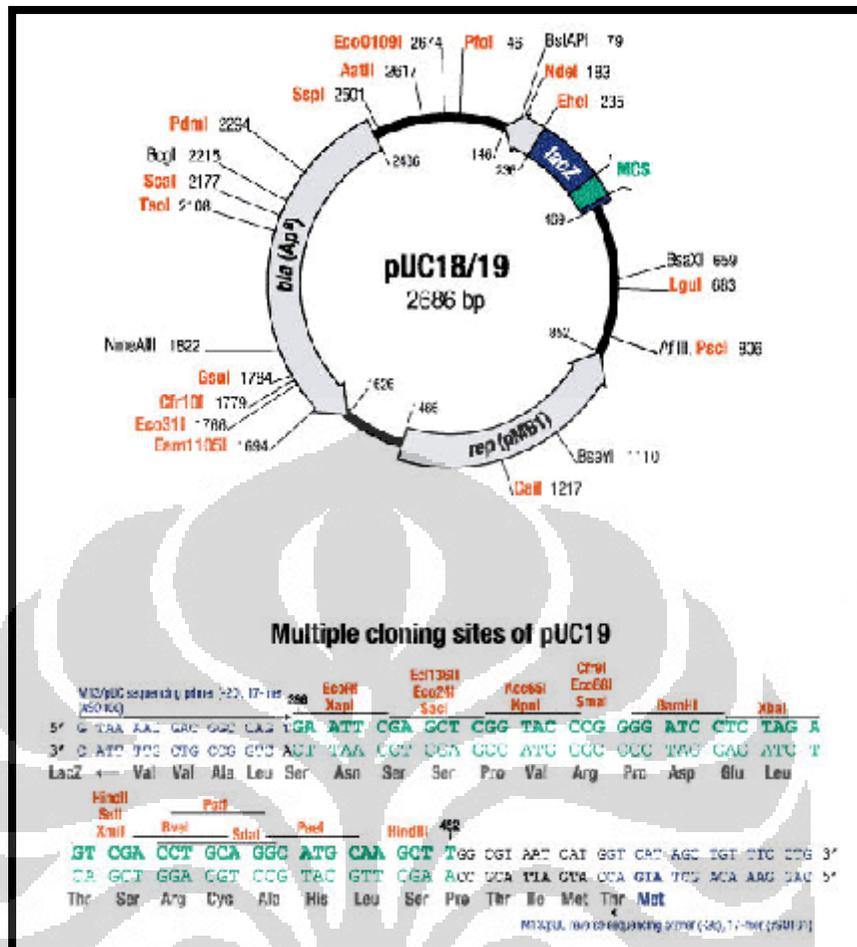
## 2.7. Plasmid sebagai Wahana Kloning

Plasmid dipakai secara luas sebagai wahana untuk melakukan kloning. Plasmid merupakan replikan yang diturunkan secara stabil dalam keadaan ekstra kromosom. Plasmid biasanya terdapat dalam bentuk molekul DNA lingkaran yang beruntai ganda (Primrose, Twyman, dan Old, 2001). Plasmid dapat bereplikasi secara otonom dalam sel hospes serta tersebar luas dalam sel prokariot.

Plasmid hampir selalu membawa satu atau lebih gen yang bermanfaat bagi inangnya. Sebagai contoh, kemampuan bertahan dalam konsentrasi toksik antibiotik seperti kloramfenikol dan ampisilin dikarenakan keberadaan dari plasmid bakteri yang membawa gen resisten antibiotik tersebut. Kebanyakan plasmid memiliki sekuens DNA yang menjadi *origin of replication*, sehingga plasmid dapat memperbanyak diri dalam sel secara independen (Rapley dan Walker, 2005; Brown, 2010)

Plasmid sebagai vektor kloning memiliki ukuran kurang dari 10 kb. Sebagai vektor kloning, plasmid harus memiliki daerah pengenalan bagi DNA sisipan, daerah ini disebut dengan sisi endonuklease restriksi yang biasanya membentuk *multiple cloning site*. Yang penting pula bagi plasmid sebagai vektor kloning adalah angka penggandaan / *copy number*. Angka penggandaan spesifik bagi tiap plasmid (Rapley dan Walker, 1998; Brown, 2010).

Plasmid pUC19 berukuran panjang 2,69 kb dan memiliki peta restriksi seperti tersaji pada Gambar 2.1.



Sumber : <http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-cloning/sd005>

**Gambar 2.2.** Peta restriksi pUC19

Plasmid pUC19 memiliki sifat :

- Gen resisten ampisilin yang menyebabkan resistensi terhadap ampisilin yang dapat digunakan untuk seleksi rekombinan.
- lacZ , ujung 5' dari gen lacZ mengkodekan fragmen N-terminal dari beta-galaktosidase yang berguna untuk pemilihan koloni biru putih setelah proses transformasi.
- *High copy* number,
- MCS dari vektor ini terdiri dari 13 situs pemotongan enzim.
- Situs rep pMB1 yang dapat menyebabkan tetap berlangsungnya replikasi hingga dua atau tiga ribu salinan ketika terjadi penghambatan sintesis protein dan replikasi pada kromosom bakteri.

Pemurnian DNA plasmid menjadi prasyarat utama dalam proses kloning menggunakan plasmid. Walaupun pemurnian DNA plasmid telah dilakukan secara rutin, namun bukan berarti tidak terdapat masalah. Tahapan yang paling sulit adalah pada proses lisis dari sel inang. Situasi yang ideal adalah saat setiap sel mengalami kerusakan yang cukup untuk memungkinkan DNA plasmid keluar tanpa terlalu banyak kontaminasi dari DNA kromosom. Proses lisis harus dilakukan dengan hati-hati sehingga DNA kromosom yang dilepaskan adalah yang memiliki berat molekul tinggi dan dapat dihilangkan bersama dengan debris sel melalui sentrifugasi. Saat ini metode yang paling populer untuk ekstraksi dan pemurnian DNA plasmid adalah dengan metode dari Birnboim dan Doly [1979]. Metode ini memanfaatkan sifat dari denaturasi DNA pada rentang pH basa yang sempit yaitu 12,0 hingga 12,5. Sel bakteri yang mengandung plasmid diberi lisozim untuk melemahkan dinding sel kemudian dilisis dengan menggunakan natrium hidroksida dan natrium dodesil sulfat. DNA kromosom akan tetap berada pada bentuk berat molekul yang tinggi namun terdenaturasi. Ketika terjadi netralisasi dengan natrium asetat, DNA plasmid segera kembali ke konformasi awal sedangkan DNA kromosom akan terpresipitasi bersama dengan debris sel. Konsentrasi yang tinggi dari natrium asetat akan menyebabkan terjadinya pengendapan dari kompleks protein-natrium dodesil sulfat. Debris sel, DNA kromosom dan kompleks protein dihilangkan dengan sentrifugasi. Sekarang telah banyak produk biologi molekular yang dibuat dalam bentuk kits untuk mempermudah pelaksanaan dan meningkatkan kemurnian dari DNA plasmid yang diisolasi (Primrose, Twyman, dan Old, 2001; Ausubel et al., 2003).

## **2.8. Digesti**

Proses digesti biasanya dilakukan dengan melibatkan endonuklease restriksi tipe II yang memutus ikatan fosfodiester yang menghubungkan satu nukleotida ke nukleotida lainnya dalam satu untai DNA (Brown, 2010). Secara alamiah bakteri menghasilkan endokulease untuk mempertahankan diri dari keberadaan DNA asing yang masuk ke dalam sel bakteri. Setiap enzim mengenali rangkaian 4-8 pasang basa tertentu yang terdapat dalam untai DNA. Setiap endonuklease restriksi memiliki situs pengenalan pemotongan yang berbeda dan

sangat spesifik. Pemilihan endonuklease restriksi yang akan digunakan berdasarkan pada frekuensi pemotongan, kesesuaian dapar, kemampuan untuk didenaturasi, serta tipe dari ujung pemotongan yang dihasilkan (Struble, Handke, dan Gill ; 2009).

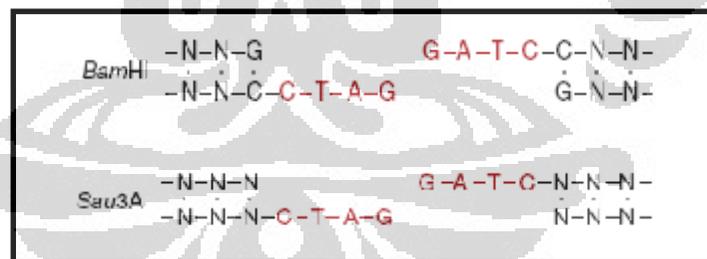
Pada umumnya endonuklease restriksi mengenali situs heksanukleotida namun ada pula yang mengenali pada sekuens tetranukleotida. Jumlah pengenalan sekuens untuk masing-masing endonukelase pada molekul DNA dapat diperkirakan secara matematis dengan asumsi jumlah basa G + C adalah 50 %. Sekuens tetranukleotida (misalnya GATC) biasanya muncul setiap  $4^4$  (256) nukleotida, enzim yang memiliki sifat seperti ini dikenal sebagai enzim pemotong sering. Sedangkan untuk endonuklease restriksi yang mengenali situs sekuens heksanukleotida biasanya muncul setiap  $4^6$  (4096) nukleotida, dikenal sebagai enzim pemotong jarang (Primrose, Twyman, dan Old, 2001; Brown, 2010). Beberapa contoh endonuklease restriksi beserta sekuens pengenalannya tersaji dalam Tabel 2.1.

**Tabel 2.1.** Beberapa contoh endonuklease restriksi beserta situs pemotongannya

Enzim	Sekuens pengenalan
Pemotong Tetranukleotida (4 basa)	
<i>MboI, DpnI, Sau3AI</i>	/GATC
<i>MspI, HpaII</i>	C/CCGG
<i>AluI</i>	AG/CT
<i>HaeIII</i>	GG/CC
<i>TalI</i>	ACGT/
Pemotong Heksanukleotida ( 6 basa)	
<i>BglII</i>	A/GATCT
<i>ClaI</i>	AT/CGAT
<i>PvuI</i>	CAG/CTG
<i>KpnI</i>	GGTAC/C
<i>BamHI</i>	G/GATCC

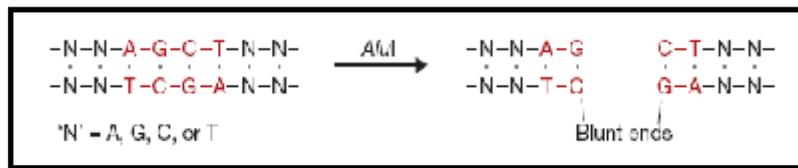
Sistem pemberian nama untuk endonuklease restriksi adalah dengan tiga huruf *italic* yang menunjukkan bakteri asal endonuklease restriksi tersebut diisolasi, dimana huruf pertama mewakili genus bakterinya dan dua huruf berikutnya merupakan penanda spesiesnya. Nama endonuklease restriksi ini juga diikuti oleh huruf yang menandakan strain bakterinya jika memang ada serta diakhiri dengan angka romawi untuk membedakan sistem yang berbeda dari bakteri yang sama. Sebagai contoh : *EcoRI* merupakan endonuklease restriksi pertama yang diisolasi dari bakteri *Escherichia coli* strain R (Karcher, 1995).

Ujung pemotongan yang dihasilkan oleh endonuklease restriksi terdiri dari dua jenis, yaitu ujung kohesif (*sticky ends*) dan ujung tumpul (*blunt ends*). Endonuklease restriksi yang menghasilkan ujung kohesif antara lain : *Sau3A*, *BamHI*, *EcoRI*, yang bentuk pemotongannya dapat diamati pada Gambar 2.3. Contoh dari endonuklease restriksi yang menghasilkan ujung tumpul adalah *HaeIII* dan *AluI*, yang bentuk pemotongannya dapat diamati pada Gambar 2.4. Pemilihan endonuklease restriksi yang digunakan sebaiknya disesuaikan dengan vektor yang telah dipersiapkan sehingga dapat mengeliminasi tahapan untuk memodifikasi kembali ujung fragmen DNA yang akan digunakan untuk proses ligasi (Struble, Handke, dan Gill ; 2009).



Sumber : Brown, 2010

**Gambar 2.3.** Contoh situs restriksi dari endonuklease *BamHI* dan *Sau3A* yang menghasilkan ujung kohesif.



Sumber : Brown, 2010

**Gambar 2.4.** Contoh situs restriksi dari endonuklease *AclI* yang menghasilkan ujung tumpul.

## 2.9. Ligasi

Proses ligasi merupakan tahapan penggabungan molekul plasmid vektor dengan fragmen DNA asing yang diinginkan sebagai sisipan. Enzim yang berperan dalam reaksi ini adalah DNA ligase. Semua sel hidup menghasilkan DNA ligase, namun enzim yang dipakai dalam rekayasa genetika adalah yang telah dimurnikan dari *E.coli* yang telah diinfeksi oleh T4 faga. Dalam sel, enzim ini memiliki peran penting untuk memperbaiki diskontinuitas yang mungkin timbul pada salah satu untai dari molekul DNA untai ganda. Diskontinuitas merupakan keadaan dimana ikatan fosfodiester antara molekul nukleotida yang berdekatan hilang. Mekanisme dari penggabungan vektor plasmid dan DNA sisipan serupa seperti proses perbaikan diskontinuitas tersebut (Brown, 2010).

Enzim T4 DNA ligase merupakan polipeptida tunggal berukuran 68 kDa yang membutuhkan  $Mg^{2+}$  dan ATP sebagai kofaktor (Karcher, 1995). Proses ligasi dapat berjalan selama 1 jam atau lebih pada temperatur  $14^{\circ}C$ - $16^{\circ}C$ . Proses ligasi berjalan cepat ketika terdapat *overhang* pada vektor kloning dan DNA sisipan. Ligasi dari vektor kloning dan DNA sisipan yang tidak memiliki *overhang* (hanya *blunt end*) akan lebih sulit dan rekasinya kurang efektif. Ligasi untuk fragmen seperti ini membutuhkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi serta jumlah ligase yang lebih banyak (Ausubel et al., 2003).

## 2.10. Transformasi

Transformasi merupakan proses memasukkan molekul DNA rekombinan ke dalam sel hidup, biasanya bakteri. Kemudian sel hidup tersebut akan tumbuh

dan memperbanyak klon yang ada. Secara umum, terdapat dua tujuan dilakukannya transformasi DNA rekombinan ke sel bakteri. Tujuan pertama adalah memproduksi DNA rekombinan dalam jumlah yang besar dari material awal yang sedikit. Hanya dari beberapa nanogram DNA rekombinan dapat menghasilkan beberapa microgram DNA dalam tiap koloni bakteri dalam media agar dan beberapa milligram DNA dalam kultur cair bakteri, ribuan bahkan jutaan kali meningkat produksinya. Tujuan kedua dari transformasi yaitu untuk mencapai jumlah produksi DNA rekombinan yang memenuhi untuk tahap pemurnian. Pemurnian dari DNA rekombinan perlu dilakukan karena dalam hasil ligasi selain terdapat vektor plasmid dan DNA sisipan yang telah terligasi terdapat pula: molekul vektor yang tidak terligasi, molekul DNA tidak terligasi, molekul vektor yang mengalami resirkulasi tanpa DNA sisipan, dan DNA rekombinan yang membawa fragmen DNA yang tidak diinginkan (Brown, 2010).

Tidak semua bakteri dapat menjadi objek transformasi, hanya sel kompeten yang dapat digunakan. Sel kompeten adalah bakteri yang telah diberi perlakuan fisika atau kimia yang dapat meningkatkan kemampuannya untuk menerima DNA rekombinan. Pembuatan sel kompeten ini dapat dilakukan dengan metode penambahan  $\text{CaCl}_2$  atau dengan penambahan DMSO. Sel kompeten harus dipanen pada fase log dan disimpan pada temperatur dingin ( $-80^\circ\text{C}$ ) karena akan menurunkan kualitas sel kompeten jika dibiarkan dalam suhu ruang (Sambrook dan Russel, 2001).

Proses transformasi dapat dilakukan dengan metode *heat shock* dan elektroporasi. Metode *heat shock* dilakukan melalui inkubasi pada temperatur tinggi dan rendah. Sedangkan metode elektroporasi dilakukan dengan mengalirkan listrik (Sambrook dan Russel, 2001).

### **2.11. Seleksi Hasil Transformasi Koloni Putih Biru dan Ampisilin**

Plasmid hasil transformasi dapat diseleksi dengan menambahkan antibiotik ampisilin dan IPTG X-Gal pada media agar petri. Penambahan ampisilin dan IPTG X-Gal bertujuan untuk mendapatkan selektifitas dari koloni *E.coli* yang tumbuh pada media padat. Antibiotik ampisilin ditambahkan karena vektor pUC19 memiliki gen penanda resisten ampisilin. Diharapkan koloni yang tumbuh

merupakan koloni yang resisten ampisilin atau koloni *E.coli* yang telah mengandung vektor plasmid pUC19. IPTG dan X-Gal digunakan untuk menyeleksi koloni *E.coli* yang benar mengandung hasil ligasi pUC19 dan sisipan fragmen DNA genomik BAL. ORF LacZ menyandikan  $\beta$ -galaktosidase yang dapat memotong X-Gal dengan IPTG sebagai penginduksi dan akan dihasilkan senyawa galaktosa serta 5-bromo-4-kloro-indolil. Senyawa kedua akan dioksidasi menjadi senyawa 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo, berupa senyawa biru yang tidak larut. Ketika sisipan gen bakteriosin benar terligasi dengan pUC19 maka  $\beta$ -galaktosidase tidak dapat tersandikan dan tidak akan terbentuk senyawa biru tersebut (Karcher, 1995).

## 2.12. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah teknik kloning dalam biologi molekuler untuk amplifikasi fragmen DNA sehingga menghasilkan jutaan salinan fragmen DNA dalam waktu yang cepat. Metode ini pertama kali ditemukan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985 (Sambrook dan Russel, 2001).

Proses PCR terdiri dari serangkaian siklus temperatur (pemanasan dan pendinginan) yang berulang dan tiap-tiap siklus terdiri atas tahapan sebagai berikut :

1. Denaturasi pada temperatur 94°C, dimana dua untai dari cetakan DNA terpisah antara satu dan yang lainnya.
2. Penempelan (*annealing*) pada temperatur  $\pm$  55-60°C, pada temperatur ini primer dapat berhibridisasi dengan cetakan DNA. Temperatur pada tahap ini disesuaikan dengan *melting temperature* dari primer.
3. Perpanjangan (*elongation/extension*) pada temperatur  $\pm$  68-72°C, temperatur ini adalah temperatur optimal bagi enzim polymerase untuk mensintesis untai DNA yang kedua.

Komponen dari PCR terdiri dari :

1. Cetakan DNA, yaitu fragmen DNA yang didalamnya terdapat daerah sekuens DNA yang akan diamplifikasi (DNA target). Kualitas dan konsentrasi dari cetakan DNA memberikan pengaruh secara langsung

terhadap hasil PCR. Untuk amplifikasi DNA genom, dapat digunakan 100-500 ng cetakan DNA.

2. Dua oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (16-24 basa nukleotida) yang menentukan bagian awal dan akhir dari daerah yang akan diamplifikasi.
3. Enzim DNA polimerase yang stabil pada pemanasan, biasanya digunakan Taq polimerase yang didapat dari *Thermus aquaticus*. Enzim ini yang akan menyalin bagian yang akan diamplifikasi.
4. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang digunakan DNA polimerase untuk membentuk DNA baru. Ada empat macam nukleotida, yaitu dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
5. Kation divalen (biasanya  $Mg^{2+}$ )  
Konsentrasi dari magnesium berpengaruh terhadap keberhasilan PCR. Konsentrasi yang digunakan berkisar antara 0,5-5 mM. Konsentrasi magnesium yang berlebih akan mengakibatkan akumulasi dari hasil amplifikasi yang tidak spesifik yang akan terlihat pada pita elektroforesis agarosa, sebaliknya jika terjadi kekurangan magnesium akan mengakibatkan menurunnya kualitas amplifikasi PCR.
6. Larutan dapar  
Dapar standar untuk reaksi PCR adalah : 50 mM KCl, 10 mM Tris Cl (pH 8,3 , 25°C).

Beberapa masalah yang sering timbul dalam proses PCR adalah amplikon yang tidak dapat terdeteksi, jumlah amplikon yang dihasilkan terlalu sedikit, serta pita yang dihasilkan pada elektroforesis gel agarosa tidak spesifik karena masalah *mispriming* (kesalahan pemasukan primer) atau *misextension* (Innis dan Gelfand, 1990). Hal-hal yang harus diperhatikan dalam optimasi PCR adalah konsentrasi enzim, konsentrasi magnesium, komponen reaksi lain, pelekatan primer (*primer annealing*), pemanjangan primer (*primer extension*), waktu dan suhu denaturasi, jumlah siklus dan primer.

1. Konsentrasi enzim

Kisaran konsentrasi Taq polimerase yang direkomendasikan adalah antara 1 sampai 2,5 unit per 100  $\mu$ L reaksi jika parameter lain optimum. Namun

enzim yang dibutuhkan bervariasi, tergantung dari target DNA atau primer yang digunakan. Jika konsentrasi enzim terlalu tinggi, maka akan mengakibatkan akumulasi ampikon yang tidak spesifik. Tetapi, jika konsentrasi terlalu rendah maka ampikon yang dihasilkan sedikit (Innis dan Gelfand, 1990; Yuwono, 2006).

2. Konsentrasi magnesium

Konsentrasi magnesium dapat mempengaruhi proses pelekatan primer, temperatur pemisahan rantai DNA baik pada DNA cetakan ataupun ampikon, pembentukan primer dimer, dan aktivitas serta ketepatan Taq polimerase memerlukan magnesium untuk aktivitasnya. Enzim ini membutuhkan magnesium bebas agar dapat berikatan dengan DNA cetakan, primer dan dNTP. Sebaiknya pada proses PCR mengandung konsentrasi magnesium antara 0,5 sampai 2,5 mM di atas konsentrasi total dNTP (Innis dan Gelfand; 1990).

3. Komponen reaksi lain

Dapar yang direkomendasikan untuk PCR adalah 10-50 mM Tris-HCl (antara pH 8,3-8,8) jika diukur pada suhu 20°C. KCl dengan konsentrasi sampai 50 mM dapat ditambahkan ke dalam campuran reaksi untuk membantu proses pelekatan primer. NaCl dengan konsentrasi 50 mM atau KCl dengan konsentrasi di atas 50 mM, akan menghambat aktivitas Taq-DNA polimerase (Innis dan Gelfand; 1990).

4. Pelekatan primer

Temperatur dan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk pelekatan primer tergantung dari komposisi basa, panjang, dan konsentrasi dari primer. Aplikasi temperatur *annealing* adalah 5°C di bawah titik lebur dari primer.

5. Pemanjangan primer

Waktu pemanjangan tergantung dari panjang dan konsentrasi sekuen target, serta temperatur. Waktu pemanjangan selama 1 menit pada temperatur 72°C dianggap cukup untuk menghasilkan ampikon dengan panjang sampai 2 kb. Namun, waktu pemanjangan yang lebih lama dapat berguna pada siklus-siklus awal jika konsentrasi substrat sangat rendah, dan pada

siklus-siklus akhir jika konsentrasi ampikon melebihi konsentrasi enzim (Innis dan Gelfand; 1990).

6. Waktu dan temperatur denaturasi

Hal yang biasanya menjadi penyebab kegagalan proses PCR adalah proses denaturasi yang tidak lengkap dari DNA target dan/atau ampikon. Kondisi denaturasi yang umum digunakan adalah 95°C selama 30 detik, atau 97°C selama 25 detik. Namun temperatur yang lebih tinggi mungkin akan lebih tepat, khususnya jika target banyak mengandung G + C (Innis dan Gelfand; 1990).

7. Jumlah siklus

Jumlah optimum siklus terutama bergantung pada konsentrasi awal DNA target yang akan diamplifikasi. Siklus yang terlalu banyak dapat meningkatkan jumlah dan kompleksitas dari ampikon yang tidak spesifik. Namun siklus yang terlalu sedikit akan menghasilkan ampikon yang sedikit pula (Innis dan Gelfand; 1990). Pada umumnya siklus pada proses PCR dilakukan sebanyak 20-30 siklus (Yuwono, 2006).

8. Primer

Konsentrasi primer yang optimal umumnya berkisar antara 0,1 - 0,5  $\mu\text{M}$ . Konsentrasi yang lebih tinggi dapat menyebabkan *mispriming* dan akumulasi ampikon yang tidak spesifik. Panjang nukleotida yang digunakan sebagai primer umumnya 18-28 nukleotida dan mempunyai kandungan G+C sebesar 50-60%. Rancangan primer yang mempunyai nukleotida C dan G secara berurutan sebanyak tiga kali atau lebih pada ujung 3' sebaiknya dihindari karena dapat menyebabkan *mispriming* terutama pada daerah yang kaya akan sekuen G + C (Innis dan Gelfand, 1990; Yuwono, 2006).

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 (Yuwono, 2006 ; Compton, 1990).

Primer semacam ini juga berguna jika ingin melakukan amplifikasi suatu gen yang belum diketahui urutan nukleotidanya tetapi gen tersebut termasuk dalam kelompok famili gen tertentu. Dengan menggunakan informasi mengenai urutan nukleotida gen lain yang termasuk ke dalam famili yang sama, maka dapat dirancang dan disintesis primer *degenerate* untuk mengamplifikasi gen yang belum diketahui urutannya tersebut (Yuwono, 2006 ; Compton, 1990).

### **2.13. Elektroforesis Gel Agarosa**

Elektroforesis gel agarosa adalah metode standar yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA. Elektroforesis gel agarosa sering digunakan untuk memisahkan fragmen karena cukup mudah, cepat dilakukan dan dapat menjadi solusi untuk pemisahan fragmen DNA yang tidak dapat dipisahkan dengan baik dengan prosedur yang lain. Disamping itu elektroforesis gel agarosa memiliki jangkauan pemisahan yang besar. Gel agarosa dapat memisahkan DNA dengan ukuran mulai dari beberapa ratus bp sampai 50 kb (Sambrook dan Russel, 2001).

Teknik elektroforesis didasarkan pada sifat DNA yang memiliki muatan negatif pada pH netral karena mengandung gugus fosfat. Oleh karena itu, jika DNA diberikan potensial listrik maka DNA akan bergerak menuju kutub positif. Laju pergerakan DNA menuju kutub positif diperlambat dengan melewatkan DNA pada gel agarosa (Winfrey, Rott, dan Wortman, 1997).

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 dapat lebih mudah melewati kisi (Winfrey, Rott, dan Wortman, 1997).

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 gel yang rendah akan meningkatkan mobilitas molekul DNA sehingga berguna untuk memisahkan molekul DNA yang besar (Sambrook dan Russel, 2001).

Cara yang paling umum digunakan untuk melihat DNA hasil elektroforesis gel adalah melalui pewarnaan dengan etidium bromide. Etidium bromide akan berinterkalasi di antara basa-basa DNA untai ganda yang dapat diamati pada UV transiluminator melalui fluoresensi oranye yang dihasilkannya (Sambrook dan Russel, 2001).

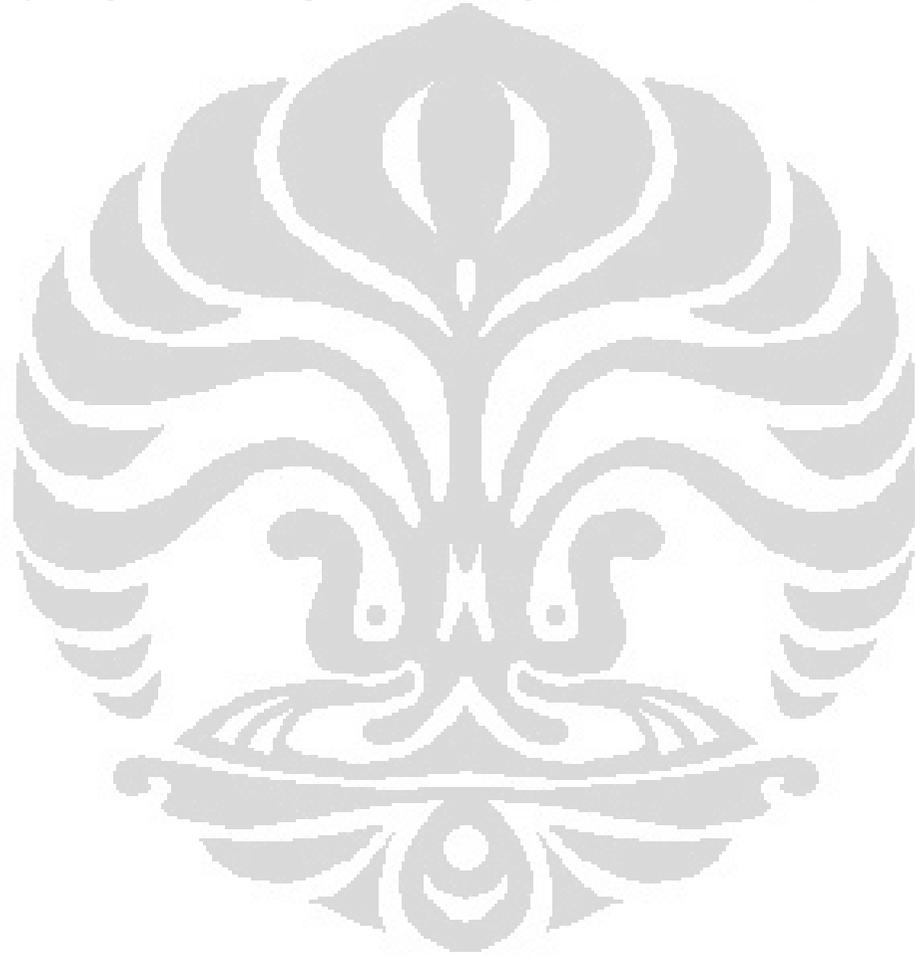
Gel agarosa biasanya dilakukan dengan konfigurasi horizontal dalam medan listrik dengan kekuatan dan arah yang konstan. Pada elektroforesis gel agarosa biasanya ditambahkan pula penanda ukuran molekul DNA yaitu sebuah set fragmen DNA yang ukurannya telah diketahui. Penanda ini berfungsi sebagai standar untuk menentukan ukuran DNA dari suatu fragmen yang tidak diketahui (Winfrey, Rott, dan Wortman, 1997).

#### 2.14. Sekuensing

Sekuensing DNA pada dasarnya adalah versi modifikasi dari replikasi DNA yang didalam kontrol kondisi *in vitro*. Terdapat dua metode sekuensing DNA yaitu metode enzimatik (biasa dikenal sebagai dideoxy sekuensing) dan metode kimia (metode Maxam-Gilbert). Metode enzimatik diperkenalkan oleh F.Sanger, oleh karena itu sering juga disebut metode Sanger. Metode ini menggunakan dideoksiribonukleotida (ddNTPs) dalam reaksinya. Dideoksinukleotida berbeda dengan deoksiribonukleotida normal karena ketiadaan dari grup 3'-OH yang penting bagi DNA polimerase untuk memperpanjang rantai. Ketika (ddNTP) diinkorporasikan pada DNA, sintesis akan terhenti, oleh karena itu dikenal juga dengan terminasi sekuensing (Ausubel et al., 2003).

Metode Maxam-Gilbert melibatkan proses degradasi secara kimia pada DNA asal. Pada metode ini, fragemn DNA diberi label radioaktif pada salah satu ujungnya, kemudian dipotong secara acak dalam empat reaksi kimia terpisah, yang masing-masing spesifik untuk basa tertentu. Metode sekuensing ini didasarkan pada kemampuan hidrazin, dimetil sulfat (DMS), ataupun asam format

dalam memodifikasi basa dalam molekul DNA secara spesifik. DMS akan bereaksi dengan basa guanin, asam format akan bereaksi dengan basa adenin dan guanin, dan hidrazin akan bereaksi dengan basa sitosin dan timin. Kemudian piperidin ditambahkan sebagai katalis pemutusan untai pada nukleotida yang telah termodifikasi ini. Pada keempat reaksi tersebut, piperidin juga mengkatalis pemutusan ikatan fosfodiester pada posisi dimana basa termodifikasi telah digantikan oleh piperidin. Dalam praktiknya, metode Sanger Coulson yang lebih banyak digunakan dalam proses sekuensing (Ausubel et al., 2003).



## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan mulai bulan Januari sampai bulan Mei 2012.

#### 3.2. Bahan

##### 3.2.1. Sampel dan Bakteri

DNA genomik diekstraksi dari bakteri asam laktat *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 yang berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi Universitas Indonesia. Sebagai inang transformasi digunakan One Shot® TOP 10 *Chemically Competent E.coli* [Invitrogen].

##### 3.2.2. Medium

Medium yang digunakan pada penelitian ini adalah medium *de Man Rogosa Sharpe* Broth (MRS) [Oxoid], *Bacto* Agar [Difco], medium LB Broth [Usb].

##### 3.2.3. Bahan Kimia

Asam klorida [Merck], NaOH [Merck], dapar STET (Sukrosa [Wako], Tris base [Usb], Na<sub>2</sub>EDTA [Merck], dan Triton X-100 [Merck]), Lisozim [Sigma], SDS (Natrium Dodesil Sulfat) [Sigma], Proteinase K [Usb], Natrium klorida [Oxoid], CTAB (*Cethyltrimethylammonium Bromide*) [Sigma], Kloroform [Mallinckrodt], Isoamil alkohol [Sigma], Isopropanol [Aldrich], asam asetat glasial [Aldrich], Etanol absolut [Merck], Enzim *Sau3A1* [NEB], Enzim *BamHI* [NEB], dapar NE 1 [NEB], dapar NE 3 [NEB], BSA [NEB], Enzim T4 DNA Ligase [NEB], dapar ligasi [NEB], Enzim *HindIII* [Invitrogen], Enzim *EcoRI* [Invitrogen], *reaction buffer 2* [Invitrogen], *reaction buffer 3* [Invitrogen], *buffer*

tanggo [Fermentas], Plasmid pUC19 [Invitrogen], Agarosa NA [GE Health care], EtBr (etidium bromida), DNA *marker* [Solis Biodyne], IPTG [Usb], X-gal [Wako], DMF [Aldrich] Prep Ease<sup>®</sup> *Minispin Plasmid kit* [Affymetrix], Prep Ease<sup>®</sup> *Gel Extraction kit* [Affymetrix], CaCl<sub>2</sub> [Sigma], primer *degenerate* yaitu Bac Fw 5'-GGW GGW AAG TAT TAT GGK AAY GG-3' dan Bac Rv 5'-CAR AAW CCA TTT CCA CCA TTK GC-3' [Cybergene], primer universal yaitu M13 Fw 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' dan M13 Rv 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' [Cybergene], KAPA 2G Robust Hotstart [Biosystem].

### 3.3. Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah : autoklaf [Hirayama], oven [Lab-line dan WTC Binder], timbangan analitik [Scout dan Acculab], pemanas dengan pengaduk magnetik [Torrey Pines Scientific], inkubator [Orbital Shaker Incubator], filter bakteri [Millex], pH meter [Eutech], *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF) [Esco], lemari pendingin [Sansio], *Ultra Low Temperature Freezer* -80°C [New Brunswick Scientific], *freezer* -20°C [Gea], sentrifus [Sorvall-fresco, Eppendorf], alat elektroforesis gel mini [Mupid-Ex], *Thermal Cycler* [MJ Mini BioRad], *UV transiluminator* dengan pelindung dan kamera digital yang terhubung dengan komputer [BDA Biometra TI 1], dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

### 3.4. Cara Kerja

#### 3.4.1. Pembuatan Medium

##### 3.4.1.1. Medium MRS Agar

Sebanyak 7,8 g kaldu MRS dan 2,25 g bakto agar dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam aquabides secukupnya dengan pengaduk magnetik. Larutan medium ini diatur pH-nya sebesar pH 6,2 ± 0,2 dengan pH meter dengan menggunakan larutan NaOH 1N atau HCl 1N. Setelah itu medium dicukupkan hingga 150 mL dengan aquabides dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan pengaduk magnetik hingga mendidih. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Di dalam

LAF, medium yang masih hangat dituang secara aseptis ke cawan petri. Setelah membeku, cawan petri dibalik dan dibiarkan semalam dalam inkubator.

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

Sebanyak 5,2 g kaldu MRS, 0,5 g  $\text{CaCO}_3$ , dan 1,5 g agar bakto dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam aquabides secukupnya dengan pengaduk magnetik. Larutan medium ini diatur pH-nya sebesar  $6,2 \pm 0,2$  dengan pH meter dengan menggunakan larutan NaOH 1N atau HCl 1N. Setelah itu medium dicukupkan hingga 100 mL dengan aquabides dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan pengaduk magnetik hingga mendidih. Sambil diaduk dengan pengaduk magnetik, medium tersebut dipipet sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi. Kemudian seluruh tabung reaksi disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 2 atm, selama 15 menit. Tabung reaksi dimiringkan hingga membeku dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu  $4^\circ\text{C}$ .

#### **3.4.1.3. Medium MRS Cair**

Sebanyak 7,8 gram kaldu MRS ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam aquabides secukupnya. Larutan medium ini diatur pH-nya sebesar  $6,2 \pm 0,2$  dengan pH meter dengan menggunakan larutan NaOH 1N atau HCl 1N. Setelah itu medium dicukupkan hingga 100 mL dengan aquabides dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan pengaduk magnetik hingga mendidih. Medium MRS cair yang telah jadi dipipet sebanyak 7 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 2 atm, selama 15 menit. Medium MRS cair yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin pada temperature  $4^\circ\text{C}$  dan dapat digunakan untuk stok MRS cair.

#### **3.4.1.4. Medium LB Agar-Ampisilin**

Sebanyak 2 gram LB broth dan 1,5 g bakto agar ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu bulat. Kemudian ditambahkan aquabides secukupnya sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dan diatur pH-nya sebesar  $7 \pm 0,2$  dengan pH meter dengan menggunakan larutan NaOH 1 N atau HCl 1N. Setelah

itu medium dicukupkan volumenya hingga 100 mL dengan aquabides dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan pengaduk magnetik hingga mendidih. Media yang telah jadi disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium dibiarkan sejenak hingga tidak terlalu panas baru kemudian ditambahkan larutan ampisilin 50 mg/mL secara aseptis sebanyak 100 µL. Medium agar yang masih cair diaduk dengan menggoyang-goyangkan labu bulat kemudian dituang pada petri steril secara aseptis dan dibiarkan dingin dan mengeras. Medium yang sudah mengeras disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C.

#### **3.4.1.5. Medium LB Agar untuk Transformasi**

Sebanyak 2 g LB broth dan 1,5 g bakto agar ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu bulat. Kemudian ditambahkan aquabides secukupnya sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dan diatur pH-nya sebesar  $7 \pm 0,2$  dengan pH meter dengan menggunakan larutan NaOH 1 N atau HCl 1N. Setelah itu medium dicukupkan volumenya hingga 100 mL dengan aquabides dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan pengaduk magnetik hingga mendidih. Media yang telah jadi disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Setelah disterilisasi, medium dibiarkan sejenak hingga tidak terlalu panas baru kemudian ditambahkan larutan ampisilin 50 mg/mL sebanyak 100 µL, larutan X-gal 20 mg/mL sebanyak 160 µL dan IPTG 0,1 M sebanyak 28 µL secara aseptis. Medium agar yang masih cair diaduk dengan menggoyang-goyangkan labu bulat kemudian dituang pada cawan petri steril secara aseptis dan dibiarkan dingin dan mengeras. Medium yang sudah mengeras disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C.

#### **3.4.1.6. Medium LB Cair**

Sebanyak 2 g LB broth ditimbang dan dimasukkan dalam labu bulat. Kemudian ditambahkan aquabides secukupnya sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dan diatur pH-nya sebesar  $7 \pm 0,2$  dengan pH meter dengan menggunakan larutan NaOH 1 N atau HCl 1N. Setelah itu medium dicukupkan volumenya hingga 100 mL dengan aquabides dan dipanaskan di atas *hotplate*

sambil diaduk dengan pengaduk magnetik hingga mendidih. Media yang telah jadi dipipet masing-masing sebanyak 5 mL ke dalam tabung-tabung reaksi steril. Medium kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Medium LB cair yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C dan dapat digunakan untuk stok LB cair.

#### **3.4.1.7. Medium LB Cair dengan Penambahan Ampisilin**

Sebanyak 2 g LB broth ditimbang dan dimasukkan dalam labu bulat. Kemudian ditambahkan aquabides secukupnya sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dan diatur pH-nya sebesar  $7 \pm 0,2$  dengan pH meter dengan menggunakan larutan NaOH 1N atau HCl 1N. Setelah itu medium dicukupkan volumenya hingga 100 mL dengan aquabides dan dipanaskan di atas *hotplate* sambil diaduk dengan pengaduk magnetik hingga mendidih. Media yang telah jadi dipipet masing-masing sebanyak 5 mL ke dalam tabung-tabung reaksi steril. Medium kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. Apabila medium akan digunakan, ditambahkan Ampisilin 50 mg/ml sebanyak 5 µL secara aseptis.

#### **3.4.2. Pembuatan Larutan Dapar dan Pereaksi**

##### **3.4.2.1 Dapar STET**

Sebanyak 32 g sukrosa, 2,42 g tris base, dan 7,4448 g Na<sub>2</sub>EDTA dilarutkan dalam sejumlah aquabides. Lalu ditambahkan 0,4 mL Triton X-100 ke dalam larutan tersebut, kocok hingga homogen. pH larutan disesuaikan hingga 8,0. Kemudian ditambahkan aquabides hingga tepat 400 mL dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

##### **3.4.2.2 SDS (Natrium dodesil sulfat) 10%**

Sebanyak 10 g SDS dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 100 mL.

##### **3.4.2.3 Proteinase K 25 mg/mL**

Sebanyak 25 mg Proteinase K dilarutkan dalam 1 mL aquabides sambil dikocok dengan vortex. Larutan disimpan dalam *freezer* -20°C.

#### 3.4.2.4 CTAB (*Cethyltrimethylammonium bromide*)

Sebanyak 2,925 g natrium klorida dilarutkan dalam aquabides secukupnya. Sebanyak 5 g CTAB dilarutkan dalam aquabides dengan cara memasukkan CTAB sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetik dan dipanaskan di atas *hotplate*. Kemudian ditambahkan larutan natrium klorida yang telah dibuat sebelumnya ke dalam larutan CTAB dan ditambahkan aquabides hingga tepat 100 mL. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

#### 3.4.2.5 Tris base 1 M

Sebanyak 24,228 g tris base dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 200 mL. Kemudian larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit

#### 3.4.2.6 Tris HCl 10 mM pH 8

Sebanyak 0,4 mL tris base 1M dilarutkan dalam sedikit aquabides. pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan HCl 1N. lalu dicukupkan dengan aquabides hingga tepat 40 mL. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

#### 3.4.2.7 Lisozim 10 mg/mL

Sebanyak 10 mg lisozim dilarutkan dalam 1 mL Tris HCl 10 mM, pH 8,0. Larutan disimpan dalam *freezer* -20°C.

#### 3.4.2.8 Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M

Sebanyak 18,6 g Na<sub>2</sub>EDTA dilarutkan dalam sedikit aquabides. Larutan ditambahkan natrium hidroksida hingga larut dan hingga pH 8,0. Lalu ditambahkan aquabides hingga tepat 100 mL. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

#### **3.4.2.9 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 aquabides. Kemudian pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan asam asetat 1 N dan tambahkan dengan aquabides hingga 100 mL. Kemudian larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

#### **3.4.2.10 Dapar TAE 1 X**

Sebanyak 5 mL dapar TAE 50 X dilarutkan dengan aquabides hingga tepat 250 mL. Kemudian larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

#### **3.4.2.11 X-Gal 20 mg/mL**

Sebanyak 20 mg X-Gal dilarutkan dalam 1 mL DMF (dimetilformamida).

#### **3.4.2.12 IPTG 0,1 M**

Sebanyak 24 mg IPTG dilarutkan dalam 1 mL aquabides, kemudian larutan disterilkan dengan filter bakteri.

#### **3.4.3. Proses Peremajaan dan Pemiakan Kultur**

Satu sengkeli isolat kultur stok bakteri yang disimpan pada *freezer* -80°C digoreskan pada medium MRS agar di cawan petri secara aseptis kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 32°C. Setelah diperoleh koloni tunggal, isolat ditanam kembali pada media MRS agar miring sebagai kultur kerja dan kultur stok peremajaan. Peremajaan bakteri dilakukan setiap dua minggu sekali dengan cara memindahkan kembali kultur stok peremajaan ke media di cawan petri. Untuk isolat BAL yang akan diekstraksi sebelumnya dikultur dalam medium MRS cair kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 32°C.

#### 3.4.4. Ekstraksi DNA Genomik BAL

Ekstraksi DNA genomik dilakukan dengan metode modifikasi Murray dan Thompsom [1980] menggunakan *Cethyltrimethylammonium Bromide* (CTAB). Isolat BAL yang akan diekstraksi, sebelumnya dikultur dalam 7 mL medium cair MRS, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 32°C. Kemudian sel bakteri tadi dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL steril dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada suhu 20°C selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Lalu supernatan dibuang, dilakukan beberapa kali hingga total sel bakteri yang diambil berjumlah 12 mL. Pelet sel yang didapat disuspensikan kembali ke dalam 557 µL dapar STET dan dikocok dengan vortex. Setelah itu sebanyak 10 µL larutan lisozim 10 mg/mL, 30 µL SDS 10%, dan 4 µL proteinase-K 25 mg/mL ditambahkan ke dalam suspensi tersebut. Suspensi dihomogenkan dengan cara membalikkan tabung mikro 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, lalu dikocok 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 µL kloroform dan 26 µL isoamilalkohol). Campuran tersebut kemudian dikocok dengan vortex dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada suhu 20°C, selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 x g. Kemudian supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro yang baru dan steril dengan menggunakan mikropipet. Supernatan ini diekstraksi kembali dengan kloroform dan isoamilalkohol. Setelah itu supernatan tadi ditambahkan dengan isopropanol dingin 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 kemudian ditambahkan larutan etanol 70% dingin sebanyak 1 mL dan bolak balik tabung tabung mikro beberapa kali secara perlahan-lahan. Larutan tersebut selanjutnya disentrifus 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 dalam 25  $\mu\text{L}$  aquabides dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Kemudian DNA yang dihasilkan dielektroforesis pada gel agarosa. Sedangkan sisanya dapat disimpan di dalam *freezer* -20°C.

### 3.4.5. Isolasi DNA Plasmid

Isolasi DNA plasmid pUC19 dilakukan dengan menggunakan PrepEase<sup>®</sup> MiniSpin Plasmid Kit

Kultur bakteri *E.coli* yang membawa plasmid pUC19 diinokulasikan dalam media LB cair yang mengandung Ampisilin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  selama 16-18 jam. Kemudian sebanyak 5 mL inokulum dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL dan disentrifus menggunakan mikrosentrifus pada kecepatan 11.000 x g selama 30 detik pada suhu ruang. Supernatan dibuang. Tahap berikutnya dilakukan resuspensi pelet sel bakteri dengan 250  $\mu\text{L}$  dapar RNase A-A1. Selanjutnya dilakukan lisis dengan menggunakan 250  $\mu\text{L}$  dapar A2. Campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang 20°C selama 3 menit. Kemudian dilakukan netralisasi dengan menambahkan 300  $\mu\text{L}$  dapar A3 dan dihomogenkan.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan penjernihan lisat dengan disentrifus pada kecepatan 11.000 x g pada suhu 4°C selama 10 menit. Kemudian plasmid yang didapat diikat pada kolom PrepEase<sup>®</sup> Minispin dan disentrifus dengan kecepatan 11.000 x g selama 1 menit. Filtrat yang terdapat pada tabung penampung dibuang. Kolom dicuci menggunakan 500  $\mu\text{L}$  dapar AW yang telah dipanaskan pada suhu 50°C kemudian disentrifus pada kecepatan 11.000 x g selama 1 menit. Filtrat yang terdapat pada tabung penampung dibuang. Selanjutnya kolom dicuci kembali dengan menggunakan dapar A4 dan disentrifus pada kecepatan 11.000 x g selama 1 menit. Filtrat dibuang serta dilakukan pengeringan kolom dengan disentrifus kembali pada kecepatan 11.000 x g selama 2 menit.

Tahap terakhir adalah elusi kolom untuk melepaskan ikatan plasmid pada kolom. Kolom diletakkan dalam tabung mikro 1,5 mL kemudian ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  dapar AE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Selanjutnya

disentrifus dengan kecepatan 11.000 x g selama 1 menit. Filtrat yang didapat di simpan dalam *freezer* suhu -20°C (protokol Affymetrix).

#### **3.4.6. Digesti DNA Genomik menggunakan Endonuklease Restriksi *Sau3AI***

Komposisi dengan total total 40 µL yang terdiri dari aquabides bebas nuklease, 10 x Dapar NE 1, BSA 100 X, DNA genomik serta endonuklease restriksi *Sau3AI* 4000 u/mL masing-masing sebanyak 3 µL, 5 µL, 1 µL, 40 µL, 1 µL dimasukkan ke dalam tabung mikro. Dihomogenkan perlahan dengan tangan kemudian disentrifus beberapa detik. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 2 hingga 3 jam pada suhu 37°C. Digesti DNA genomik dihentikan dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit (*Sau3AI*, n.d.).

#### **3.4.7. Digesti DNA Plasmid menggunakan Endonuklease Restriksi *BamHI***

Komposisi dengan total 20 µL yang terdiri dari aquabides bebas nuklease, 10 x Dapar NE 3, BSA 100 x, DNA plasmid serta endonuklease restriksi *BamHI* 20.000 u/mL masing-masing sebanyak 6 µL, 2 µL, 1 µL, 10 µL, 1 µL dimasukkan ke dalam tabung mikro. Dihomogenkan perlahan dengan pipet kemudian disentrifus beberapa detik. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah proses digesti selesai, DNA plasmid dimurnikan dengan purifikasi dalam gel agarosa (*BamHI*, n.d.).

#### **3.4.8. Analisis Fragmen DNA dengan Elektroforesis Gel Mini**

Dibuat gel agarosa dengan konsentrasi 2 % dengan komposisi :

0,4 gram agarosa dan 20 mL dapar TAE 1 X. Setelah mendidih, agar dituang ke dalam cetakan gel dan dimasukkan Etidium Bromida 100 µg/mL sebanyak 2 µL dan dihomogenkan dengan sisir cetakan. Kemudian agar ditunggu 20 menit hingga mengeras.

Tahapan elektroforesis adalah sebagai berikut :

Dicampurkan sampel sebanyak 2 µL *loading dye* dengan 5 µL DNA dan dihomogenkan dengan *pipeting*. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel yang berbeda untuk masing-masing sampel. Dimasukkan *marker* DNA sebanyak 2 µL pada sumur yang berbeda. Kemudian dilakukan elektroforesis

selama 30 menit. Agar hasil elektroforesis kemudian difoto dengan kamera dalam *hood*.

#### **3.4.9. Purifikasi Fragmen DNA dari Gel Elektroforesis**

Hasil elektroforesis gel agarosa 1,5% dipotong pada daerah 0,5-2 kb dengan menggunakan pisau silet baru dan steril. Irisan gel dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL baru dan steril kemudian berat potongan gel tersebut ditimbang. Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dapar NT ditambahkan ke dalam tabung mikro tersebut kemudian dikocok dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 55-60°C selama 15 menit hingga irisan gel terlarut sempurna. Selama inkubasi tabung mikro dibolak-balik setiap 3 menit. Kemudian campuran tersebut didiamkan dingin pada suhu kamar.

Campuran tersebut dipipet ke dalam kolom *Prep Ease<sup>®</sup> Cleanup* yang terpasang pada tabung penampung kemudian disentrifus pada kecepatan 11.000 x g selama 1 menit. Cairan yang tertampung pada tabung penampung dibuang dan kolom ditempatkan kembali pada tabung penampung. Sebanyak 600  $\mu\text{L}$  dapar NT3 yang telah dicampur dengan etanol di tambahkan ke dalam kolom dan disentrifus kembali pada 11.000 x g selama 1 menit. Cairan yang terkumpul dibuang dan kolom ditempatkan kembali dalam tabung penampung serta disentrifus kembali pada kecepatan 11.000 x g selama 2 menit hingga membran kolom mengering.

Kolom yang telah kering dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang baru dan steril. Sebanyak 15  $\mu\text{L}$  dapar NE ditambahkan ke bagian tengah dari membran kolom agar pengendapan pada dinding kolom dapat dihindari dan dibiarkan selama 1 menit hingga dapar NE terserap dalam membran. Selanjutnya tabung mikro tersebut disentrifus kembali pada 11.000 x g selama 1 menit untuk mendapatkan DNA murni. DNA yang didapatkan disimpan pada *freezer* suhu -20°C (protokol Affymetrix).

#### **3.4.10. Ligasi Fragmen DNA ke dalam Vektor pUC19**

Untuk ligasi digunakan rasio insert terhadap vektor 20:1. Komposisi dengan total reaksi 20  $\mu\text{L}$  yang terdiri dari DNA insert, vektor pUC19 terdigesti,

dapar ligasi, T4 DNA Ligase, dan aquabides masing-masing sebanyak 12  $\mu\text{L}$ ; 0,6  $\mu\text{L}$ ; 2  $\mu\text{L}$ ; 1  $\mu\text{L}$ ; 4,4  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam tabung mikro baru dan steril. Kemudian campuran tersebut dihomogenkan perlahan dengan tangan. Proses ligasi dilakukan dilakukan pada suhu 14°C selama 24 jam (*T4 DNA Ligase*, n.d.).

#### **3.4.11. Transformasi Hasil Ligasi ke dalam One Shot® TOP 10 Chemically Competent *E.coli* dengan Menggunakan Heat Shock**

Hasil ligasi fragmen DNA serta kontrolnya berupa pUC19 yang telah terdigesti dengan *Bam*HI masing-masing dicampur dengan 100  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  dingin. Sel *E.coli* TOP 10 yang telah kompeten (50  $\mu\text{L}$ ), ditambahkan campuran ligasi dengan  $\text{CaCl}_2$  dan diinkubasi dalam penangas es selama 30 menit. Inkubasi dilanjutkan dalam waterbath suhu 42°C selama tepat 90 detik. Dengan segera hasil inkubasi tersebut dipindahkan ke dalam penangas es kembali dan diinkubasi selama 1 hingga 2 menit. Ke dalam masing-masing tube ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  medium LB broth. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit pada kecepatan 200 rpm. Hasil kultur dipipet sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dengan tip baru dan steril ke dalam LB agar untuk transformasi dan disebar dengan bantuan *beads* steril. Hal ini dilakukan pada 5 petri. Sisa kultur kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 x g selama 5 menit. Supernatan dibuang sebanyak 350  $\mu\text{L}$  dan pelet sel diresuspensi dalam 50  $\mu\text{L}$  medium LB broth. Hasilnya dituang ke dalam medium LB agar untuk transformasi, disebar dengan bantuan *beads* steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12-16 jam. Transformasi dilakukan disertai dengan kontrol media dan kontrol plasmid terdigesti (Sambrook dan Russell, 2001).

#### **3.4.12. Seleksi Koloni Putih Biru**

Koloni putih diambil kemudian dimurnikan ke medium LB agar yang telah mengandung Ampisilin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diinkubasi selama 16 jam pada temperatur 37°C (Sambrook dan Russell, 2001).

#### **3.4.13. PCR Koloni**

Diambil masing-masing koloni putih yang telah dipurifikasi dengan menggunakan ujung tip kuning yang baru dan steril kemudian dicelupkan ke

dalam tabung mikro baru dan steril yang telah berisi aquabides 100  $\mu\text{L}$ . Campuran tersebut dipanaskan pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  kemudian disentrifus. Bagian supernatan akan digunakan sebagai cetakan pada PCR.

Untuk campuran PCR dibuat campuran dari 5X KAPA2G Dapar B 5,0  $\mu\text{L}$ , dNTP (10 mM) 0,50  $\mu\text{L}$ , primer *forward* berupa primer universal yang terdapat pada pUC19 yaitu M13 Fw dan primer *reverse* menggunakan primer *degenerate* untuk gen-gen bakteriosin yaitu deg Bac Rv masing-masing sebanyak 2  $\mu\text{L}$ , dan cetakan DNA sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . Selanjutnya ditambahkan aquabides sebanyak 14,3  $\mu\text{L}$ . Baru ditambahkan KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase sebanyak 0,2  $\mu\text{L}$ . sehingga diperoleh volume total 25  $\mu\text{L}$ , kemudian larutan dihomogenkan. Larutan tersebut disentrifus selama beberapa detik dan siap digunakan untuk proses PCR.

Disamping itu juga dilakukan proses PCR dengan tahapan yang sama dengan menggunakan primer *reverse* berupa primer universal yang terdapat pada pUC19 yaitu M13 dan primer deg Bac Fw.

Proses PCR dilakukan dengan pengaturan siklus dilakukan dengan mengatur kondisi sebagai berikut :

- |                   |   |   |
|-------------------|---|---|
| a) Pra Siklus     | : | $95^{\circ}\text{C}$ , 30 detik                     |
| b) Siklus 30 kali | : | Tahapan denaturasi : $95^{\circ}\text{C}/30$ detik  |
|                   | : | Tahapan pelekatan : $56^{\circ}\text{C}/30$ detik   |
|                   | : | Tahapan perpanjangan : $72^{\circ}\text{C}/1$ menit |
| c) Pasca-siklus   | : | Pasca perpanjangan : $72^{\circ}\text{C}$ , 3 menit |

Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 2 %.

#### 3.4.14. Sekuensing Produk PCR

Hasil positif PCR koloni kemudian dipurifikasi melalui ekstraksi gel. Dan hasilnya disekuensing dengan menggunakan primer penghasilnya yang dilakukan pada Yayasan Genneka Eijkman.

#### 3.4.15. Analisis Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing yang diperoleh dianalisis menggunakan metode BLAST secara *online* yang terhubung dengan server *National Center for Biotechnology*

*Information, Bethesda, MD* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Dengan metode ini gen yang terkloning akan dibandingkan dengan gen lainnya yang mirip dan diharapkan mirip dengan gen-gen bakteriosin yang sudah ada di database GenBank.

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan metode BLAST untuk membuktikan gen yang terkloning adalah gen bakteriosin.

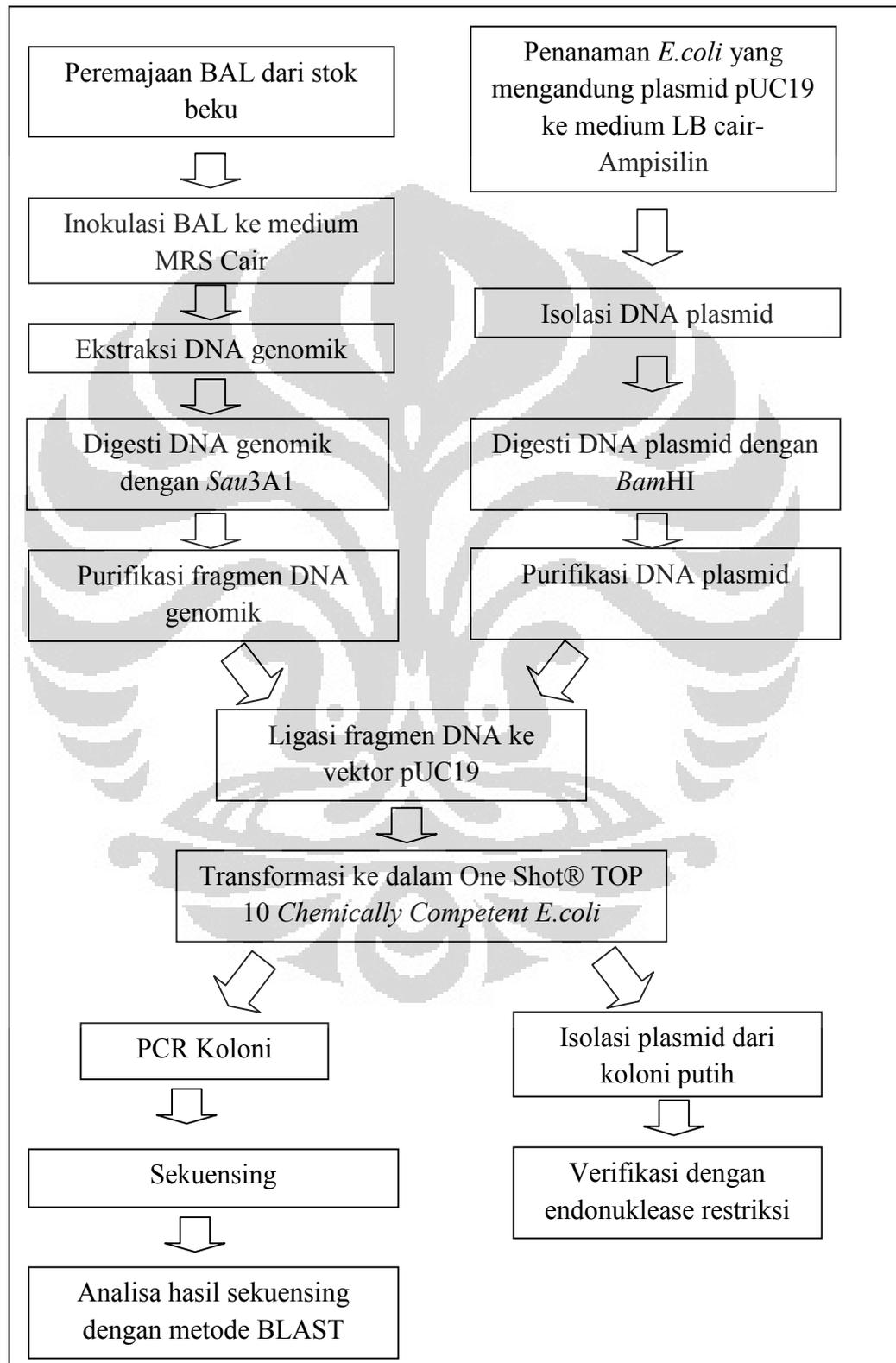
#### **3.4.16. Verifikasi Rekombinan dengan Endonuklease Restriksi**

Semua plasmid dari koloni putih yang dihasilkan diisolasi dengan PrepEase<sup>®</sup> MiniSpin Plasmid Kit. Kemudian dilakukan digesti dengan menggunakan endonuklease restriksi *Hind*III, *Eco*RI, serta kombinasi keduanya dalam berbagai *reaction buffer*. Komposisi dengan total volume 20  $\mu$ L untuk digesti tunggal yang terdiri dari aquabides bebas nuklease, 10 x *reaction buffer*, DNA rekombinan serta endonuklease restriksi masing-masing sebanyak 16  $\mu$ L, 2  $\mu$ L, 1  $\mu$ L, 1  $\mu$ L dimasukkan ke dalam tabung mikro. Dihomogenkan perlahan dengan tangan kemudian disentrifus beberapa detik. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C.

Komposisi dengan total volume 20  $\mu$ L untuk *double digest* yang terdiri dari aquabides bebas nuklease, 10 x *reaction buffer*, DNA rekombinan serta endonuklease restriksi pertama dan endonuklease restriksi kedua masing-masing sebanyak 15  $\mu$ L, 2  $\mu$ L, 1  $\mu$ L, 1  $\mu$ L, 1  $\mu$ L dimasukkan ke dalam tabung mikro. Dihomogenkan perlahan dengan tangan kemudian disentrifus beberapa detik. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C.

### 3.5. Skema Kerja

Langkah-langkah penelitian ini dapat dirangkum dalam diagram berikut :



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Isolasi DNA Genomik

Sampel-sampel BAL yang dipilih diambil dari stok beku di *freezer*  $-80^{\circ}\text{C}$  kemudian diremajakan pada medium MRS agar pada cawan petri dan diinkubasi pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Waktu inkubasi 24 jam dianggap cukup bagi bakteri untuk mencapai fase akhir pertumbuhan atau fase stasionernya. Pada fase ini sebagian besar bakteri telah dewasa dan mampu menunjukkan sifat fenotip dan genotip yang sempurna (Reimer dan Carrol, 1993). Setelah proses peremajaan, BAL disimpan pada temperatur  $4^{\circ}\text{C}$ . Koloni tunggal yang didapat kemudian ditanam pada medium agar MRS miring yang akan digunakan sebagai kultur kerja dan kultur stok. Kultur stok berguna khusus untuk peremajaan bakteri yang dilakukan setiap dua minggu sekali, sedangkan kultur kerja digunakan sebagai kultur yang digunakan dalam bekerja selama menunggu waktu peremajaan kembali.

Setelah proses peremajaan kultur, dilakukan ekstraksi DNA. Kultur yang akan diekstraksi terlebih dahulu diinokulasikan ke dalam medium MRS cair, kemudian diinkubasi pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam sebelum digunakan untuk ekstraksi DNA genomik. Kultur sel BAL dari medium MRS cair disentrifus terlebih dahulu untuk mengumpulkan pelet selnya yang selanjutnya akan digunakan untuk ekstraksi DNA. Metode ekstraksi DNA yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode modifikasi Murray dan Thompson [1980] dengan menggunakan CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*). Metode ini dipilih karena metodenya cukup mudah dan hasil ekstraksi DNA yang dihasilkan juga dinilai cukup bersih (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, dan Yanuar, 2008). Pelet sel yang didapat disuspensikan dengan dapar STET untuk membersihkan pelet sel dari sisa-sisa medium MRS yang mungkin terbawa. Dapar STET mengandung sukrosa, tris base,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan triton X-100. Sukrosa dapat melisiskan sel melalui mekanisme kejutan osmotik,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  memiliki efek penghambatan terhadap DNase dengan mengkhelat ion  $\text{Mg}^{2+}$  yang dibutuhkan oleh DNase dari lapisan lipopolisakarida. Triton X-100 merupakan detergen non-ionik yang dapat

membantu dalam proses lisis sel secara kimia. Aktivitas penghambatan DNase juga disebabkan oleh pH dari dapar STET 8,0, dimana pada di bawah kondisi tersebut DNase tidak dapat bekerja secara optimum dalam menghidrolisis DNA (Winfrey, Rott dan Wortman, 1997). Proses lisis terhadap dinding sel BAL tidak mudah terjadi karena bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif yang mempunyai dinding sel yang terdiri dari lapisan peptidoglikan yang sangat tebal. Peptidoglikan merupakan polimer rigid terdiri atas subunit asam N-asetilmuramat dan N-asetilglukosamin. Oleh karena itu diperlukan penambahan enzim lisozim yang membantu proses lisis dengan menghidrolisis ikatan glikosidik  $\beta$ -(1,4) diantara asam N-asetilmuramat dan N-asetilglukosamin tersebut (Black, 1999). SDS merupakan golongan detergen (surfaktan) ditambahkan untuk merusak membran sel pada tahap berikutnya. SDS juga membantu disosiasi kompleks DNA-protein. Sedangkan penambahan enzim Proteinase-K dapat membantu kerja dari SDS dalam mendegradasi protein (Winfrey, Rott dan Wortman, 1997).

Penambahan CTAB dalam proses selanjutnya bertujuan untuk memisahkan DNA dari debris sel, protein, dan polisakarida. CTAB sebagai surfaktan kationik akan berikatan membentuk kompleks dengan DNA yang bermuatan negatif. Dengan adanya konsentrasi garam yang tinggi yaitu NaCl 4 M, kompleks DNA-CTAB yang terbentuk akan larut (Ausubel et al., 2003). DNA yang telah terpisah kemudian diekstraksi dengan penambahan kloroform dan isoamilalkohol. Kloroform memiliki mekanisme kerja mendenaturasi protein dan memfasilitasi pemisahan fase organik dan nonorganik sehingga dapat membersihkan protein dari larutan. Isoamilalkohol memiliki mekanisme kerja mengurangi gelembung udara yang terbentuk pada saat ekstraksi. Setelah disentrifus nampak ada tiga lapisan yang terbentuk yaitu lapisan bawah (kloroform), lapisan tengah (debris sel dan protein), dan lapisan atas (DNA) (Ausubel et al., 2003). Lapisan yang mengandung DNA dipipet secara seksama dimasukkan ke dalam tabung mikro baru dan steril dan dilakukan ekstraksi ulang dengan kloroform dan isoamilalkohol untuk memperoleh DNA yang bersih dari debris sel dan protein.

Supernatan yang mengandung DNA ditambahkan dengan isopropanol dingin untuk mengendapkan DNA dari lapisan air. Pada tahapan ini jumlah DNA

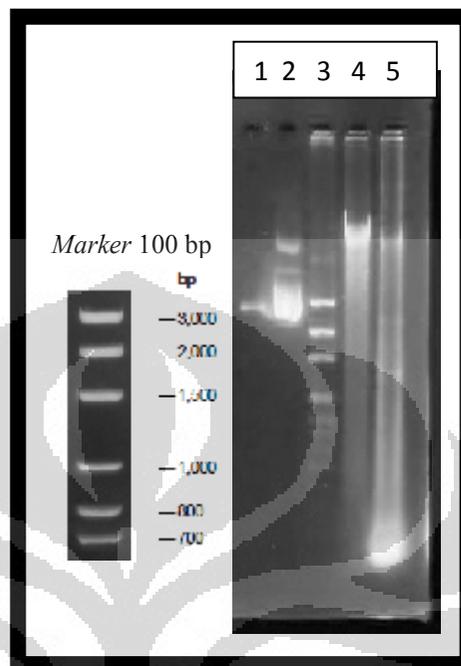
yang terekstraksi belum banyak sehingga hanya terlihat berupa endapan putih pada dasar tabung mikro. Endapan yang terbentuk dicuci dari kandungan garam yang masih tercampur dengan penambahan etanol 70% dingin (Ausubel et al., 2003). Dalam prosedur ini DNA menjadi lebih pekat karena dapat terpisah dari larutannya sebagai pelet DNA yang tidak larut. DNA yang diperoleh kemudian dikeringkan selama 3 jam pada suhu ruang untuk menghilangkan sisa alkohol. Kemudian pelet DNA dilarutkan dalam 25  $\mu$ L aquabides dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit untuk membantu proses pelarutan. Larutan DNA disimpan pada *freezer* -20°C untuk mencegah terjadinya kerusakan DNA.

Adanya pita pada gel agarosa 1,5 % dalam pengujian dengan elektroforesis gel mengindikasikan terekstraksinya DNA genomik BAL, seperti tampak pada Gambar 4.1. DNA genomik yang dihasilkan dapat digunakan untuk reaksi digesti menggunakan enzim *Sau3A1*.

#### 4.2. Isolasi Plasmid pUC19

Tahapan selanjutnya adalah melakukan isolasi DNA plasmid menggunakan PrepEase® MiniSpin Plasmid kit. Prinsip isolasi dari kit ini menggunakan prosedur *alkaline lysis* dan membran filter *spin-columns anion exchange* terpatenkan. Pada tahapan awal isolasi plasmid ini, pelet sel diresuspensi dalam dapar A1 yang telah mengandung RNase. Fungsi dari RNase sendiri adalah untuk menghilangkan kontaminan RNA yang ada dan dapar A1 itu sendiri untuk menjaga agar kondisi pemurnian ini berada dalam pH basa. Kemudian hasil resuspensi tersebut ditambahkan dapar A2 yang mengandung SDS untuk melisis sel. Tahap ini harus dilakukan dengan hati-hati agar DNA genomik tidak ikut keluar dari debris sel ke dalam suspensi. Setelah proses lisis dilakukan maka lisat yang ada dinetralisasi dengan menambahkan dapar A3. Tujuan netralisasi ini adalah untuk mengendapkan kompleks protein-SDS serta debris sel. Tahapan ini dibantu juga dengan sentrifugasi. Kemudian lisat jernih yang mengandung DNA plasmid dimasukkan ke dalam kolom dan dibilas dengan dapar pencuci untuk menghilangkan nukelase yang ada. Tahapan paling akhir adalah dilakukan pengelusan DNA plasmid yang terikat pada kolom dengan menggunakan dapar pengelusi. Hasil isolasi plasmid pUC19 tampak pada

Gambar 4.1. Nampak 3 pita pada gel agarosa karena adanya perbedaan bentuk konformasi plasmid pUC19 ( linear, nicked, supercoiled).



Keterangan : 1. Plasmid pUC19 terdigesti *Bam*HI; 2. Plasmid pUC 19 utuh; 3. *Marker* 100bp; 4. DNA genomik *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2; 4. DNA genomik *Weissella confusa* MBF 8-1

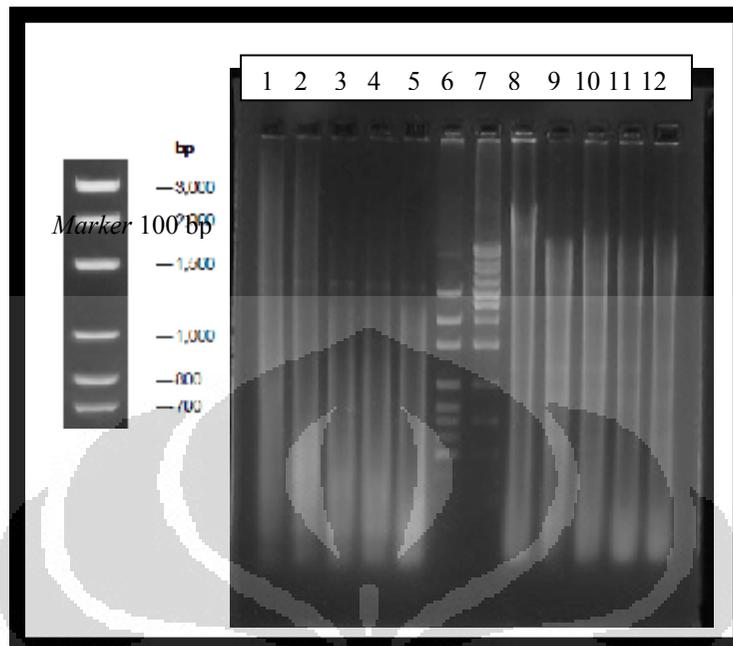
**Gambar 4.1.** Hasil isolasi DNA.

#### 4.3. Kloning DNA Genomik BAL ke dalam Plasmid pUC19

Pada penelitian ini dilakukan kloning dengan metode *genomic library*. Penggunaan metode ini diharapkan dapat mengidentifikasi gen bakteriosin dibandingkan metode amplifikasi langsung dari DNA genomik dengan menggunakan PCR. Metode amplifikasi langsung dari DNA genomik dengan menggunakan PCR sudah pernah dicobakan dan tidak memberikan hasil yang baik, dimana gen bakteriosin yang ada tidak dapat teramplifikasi. Hal ini dimungkinkan karena ukuran DNA genomik yang begitu besar sehingga lebih sulit bagi primer untuk melekat pada situs yang sesuai. Pada teknik *genomic library* ukuran DNA rekombinan yang didapat lebih kecil sehingga diharapkan

lebih memudahkan dalam proses pengidentifikasian gen bakteriosin yang diinginkan.

Setelah didapatkan DNA genomik dan DNA plasmid dilakukan proses digesti menggunakan endonuklease restriksi. Untuk DNA genomik dilakukan proses digesti menggunakan endonuklease restriksi *Sau3AI* yang mengenali situs pemotongan pada urutan basa GATC. Enzim *Sau3AI* dipilih karena sekuens pengenalannya adalah tetranukleotida (pemotong sering) dimana dengan pemotongan yang dilakukan secara parsial diharapkan dapat memenuhi sebaran ukuran fragmen DNA yang dapat mewakili populasinya. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C sesuai dengan suhu kerja optimal enzim tersebut. Waktu inkubasi yang dibutuhkan adalah 2 jam agar potongan DNA yang dihasilkan memiliki variasi ukuran yang mencukupi, sekitar 0,5 hingga 2 kb seperti dapat diamati pada Gambar 4.2. Setelah inkubasi dilakukan inaktivasi enzim *Sau3AI* dengan pemanasan pada suhu 65°C selama 20 menit. Kemudian seluruh produk digesti tersebut dimurnikan dengan ekstraksi dari gel agarosa dan diambil hasil pemotongan yang berukuran 0,5 hingga 2 kb. Sedangkan untuk DNA plasmid dilakukan proses digesti menggunakan enzim *BamHI* yang mengenali situs pemotongan pada urutan basa GGATCC. Penggunaan enzim *BamHI* untuk plasmid dipilih selain karena terdapatnya situs pengenalan *BamHI* pada MCS vektor juga dikarenakan sekuens pengenalan dari *BamHI* adalah heksanukleotida (pemotong jarang) sehingga plasmid hanya terpotong menjadi satu plasmid linear. Proses inkubasi ini dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam untuk memastikan semua plasmid terpotong sempurna. Hasil digesti plasmid tersebut kemudian dimurnikan melalui proses ekstraksi dari gel agarosa.



Keterangan: 1. Digesti MBF 8-1 selama ½ jam; 2. Digesti MBF 8-1 selama 1 jam; 3. Digesti MBF 8-1 selama 1,5 jam; 4. Digesti MBF 8-1 selama 2 jam; 5. Digesti MBF 8-1 selama 2,5 jam; 6. *Marker* 100 bp; 7. *Marker* 1 kb; 8. Digesti MBF 10-2 selama ½ jam; 9. Digesti MBF 10-2 selama 1 jam; 10. Digesti MBF 10-2 selama 1,5 jam; 11. Digesti MBF 10-2 selama 2 jam; 12. Digesti MBF 10-2 selama 2,5 jam

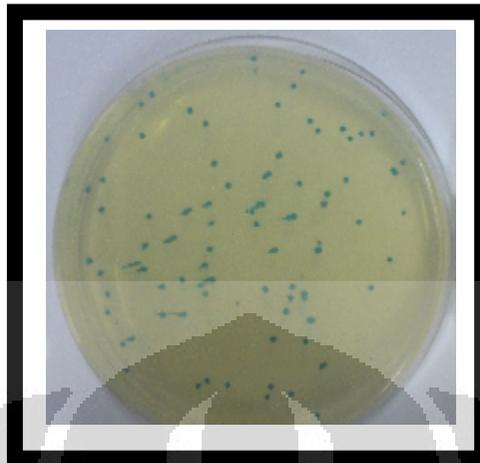
**Gambar 4.2.** Hasil orientasi digesti DNA genomik *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 dengan enzim *Sau3A1*

Hasil potongan DNA genomik diligasikan dengan plasmid pUC19 terdigesti menggunakan enzim T4 DNA ligase. Pada awalnya reaksi dilakukan pada suhu 4°C selama 24 jam. Namun setelah dilakukan transformasi dan ditumbuhkan pada LB Agar untuk transformasi yang nampak hanya koloni biru. Nampaknya pada suhu 4°C plasmid pUC19 terdigesti lebih cenderung melakukan religasi sendiri sebelum bertemu dengan potongan dari DNA genomik. Oleh karena itu dilakukan percobaan kedua pada suhu 14°C selama 24 jam. Hasil ligasi kemudian ditransformasikan ke dalam sel One Shot® TOP 10 *Chemically Competent E.coli*. Proses transformasi dilakukan dengan metode *heat shock*. Hasil ligasi dicampurkan dengan CaCl<sub>2</sub> dingin agar berada dalam kondisi yang sama dengan sel *E.coli* yang telah kompeten. Secara teoritis, ion Ca<sup>2+</sup> dari CaCl<sub>2</sub> dapat berinteraksi dengan muatan negatif sehingga menciptakan suasana netral secara

elektrostatik. Ketika DNA ditambahkan ke dalam sel kompeten, DNA hanya menempel pada bagian sel terluar dan belum dimasukkan ke dalam sitoplasma. Perpindahan sebenarnya dari DNA ke dalam sel kompeten dipicu oleh *heat shock* dimana suhu lingkungan ditingkatkan dari 0°C ke suhu 42 °C (Brown, 2010).

Setelah dilakukan transformasi dan ditumbuhkan pada LB Agar untuk transformasi tampak 3 koloni putih untuk rekombinan *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan 1 koloni putih untuk rekombinan *Weissella confusa* MBF 8-1. Sedangkan pada kontrol media dan kontrol plasmid terdigesti tidak nampak adanya pertumbuhan bakteri. Reaksi ligasi yang ideal dengan T4 DNA ligase sebenarnya dilakukan pada suhu 16°C sesuai dengan protokol dari enzim penghasilnya. Namun terdapat kendala dimana tidak tersedianya inkubator yang mencapai kapasitas suhu 16°C. Selain itu, sedikitnya jumlah koloni putih yang didapat dikarenakan tidak diaplikasikannya alkaline fosfatase pada plasmid yang terdigesti guna mencegah terjadinya religasi plasmid yang telah terdigesti. Pada penelitian kali ini sempat dicobakan memakai alkaline fosfatase yang tersedia di laboratorium namun alkaline fosfatase tersebut ternyata sudah tidak aktif. Hal ini ditunjukkan dengan hasil transformasi yang tetap didominasi oleh koloni berwarna biru.

Koloni berwarna putih menunjukkan bahwa adanya interupsi pada gen LacZ dari pUC19 oleh fragmen DNA insert. Interupsi ini mengakibatkan tidak dihasilkannya enzim  $\beta$ -galaktosidase oleh plasmid pUC19 sehingga substrat X-gal tidak diubah menjadi senyawa galaktosa dan 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo yang berwarna biru (Karcher, 1995). Sedangkan koloni berwarna biru menunjukkan tidak terjadinya interupsi pada gen LacZ sehingga masih dihasilkan enzim  $\beta$ -galaktosidase yang dapat mengurai X-Gal seperti nampak pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3.** Koloni biru putih dari rekombinan pUC19-*Weissella confusa* MBF 8-1 yang telah diambil koloni putihnya.

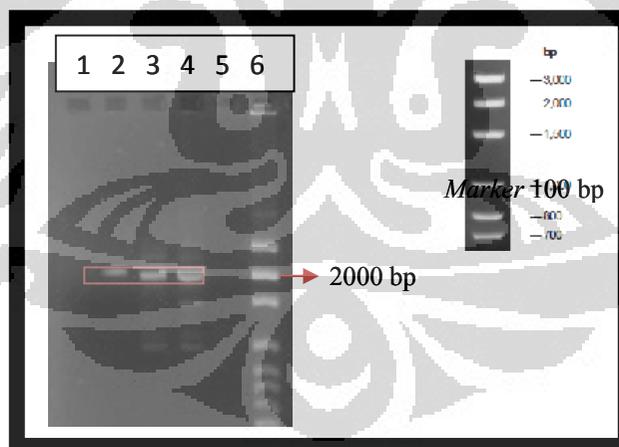
#### 4.4. PCR Koloni

Dari koloni putih tersebut diperiksa dengan PCR koloni. Primer oligonukleotida yang digunakan pada penelitian ini yaitu primer *degenerate* Bac Fw dan Bac Rv serta primer universal M13 Fw dan M13 Rv. Target dari primer universal adalah daerah pelekatan primer universal yang terdapat pada konstruksi plasmid pUC19. Sedangkan target dari primer *degenerate* yang digunakan pada penelitian ini adalah daerah yang mengandung gen bakteriosin pada rekombinan *E.coli* TOP 10. Primer *degenerate* berguna dalam PCR untuk mengamplifikasi suatu fragmen DNA yang belum banyak diketahui urutan nukleotidanya sehingga primer yang spesifik tidak dapat dibuat. Primer semacam ini juga berguna untuk melakukan amplifikasi suatu gen yang belum diketahui urutan nukleotidanya tetapi gen tersebut masuk dalam kelompok famili gen tertentu (Innis dan Gelfand; 1990). Primer *degenerate* yang digunakan dalam penelitian ini dirancang dari daerah lestari pada bakteriosin yang dihasilkan oleh spesies lain.

Pada penelitian ini, PCR koloni dilakukan dengan menggunakan kombinasi primer universal M13 Fw dan deg Bac Rv serta kombinasi primer universal M13 Rv dan deg Bac Fw. Kondisi awal PCR yang dipakai adalah dengan menggunakan suhu *annealing* 55°C yang diperkirakan berdasarkan  $T_m$

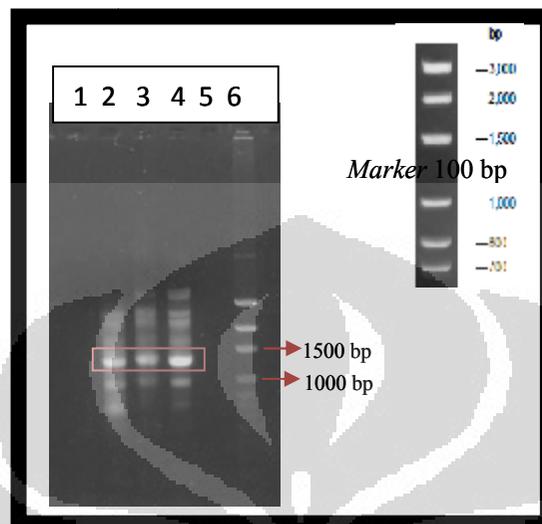
dari masing-masing primer yang dipakai. Primer deg Bac memiliki  $T_m$  pada suhu  $59^\circ\text{C}$  dan primer universal M13 memiliki  $T_m$   $49^\circ\text{C}$ . Menurut protokol penghasil enzim yang dipakai suhu *annealing* yang cocok adalah pada kisaran  $3^\circ\text{C}$  hingga  $5^\circ\text{C}$  diantara  $T_m$  (KAPA2G<sup>TM</sup> *Robust HotStart*, n.d.). Hasil yang didapatkan adalah banyak multiple band yang muncul. Kemudian suhu *annealing* dinaikkan ke suhu  $56^\circ\text{C}$  masih belum nampak pita tunggal namun tidak terlalu banyak pita pengganggu. Ketika suhu *annealing* dinaikkan menjadi  $57^\circ\text{C}$  sudah tidak nampak pita sama sekali. Maka dari itu suhu *annealing* yang dipilih adalah  $56^\circ\text{C}$ .

Dari ketiga koloni putih dari rekombinan *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 ternyata dua koloni, yaitu klon A2 dan klon A5, yang menunjukkan hasil positif ketika dilakukan amplifikasi dengan PCR koloni, seperti terlihat pada Gambar 4.4 dan Gambar 4.5. Satu koloni putih dari rekombinan *Weissella confusa* MBF 8-1 menunjukkan hasil PCR koloni yang positif juga. Ukuran produk PCR koloni dari kombinasi pertama yaitu 2000 bp. Sedangkan produk PCR yang dihasilkan dari kombinasi primer kedua menunjukkan produk utama di ukuran 1200 bp.



Keterangan : 1.Klon A4; 2. Klon A5; 3. Klon A2; 4. Klon B2; 5. Kontrol negatif (aquabides) ; 6. Marker 100 bp

**Gambar 4.4.** Hasil PCR koloni dengan menggunakan kombinasi primer Bac Fw dan M13 Rv.



Keterangan : 1. Klon A4; 2. Klon A5; 3. Klon A2; 4. Klon B2; 5. Kontrol negatif ; 6. *Marker* 100bp

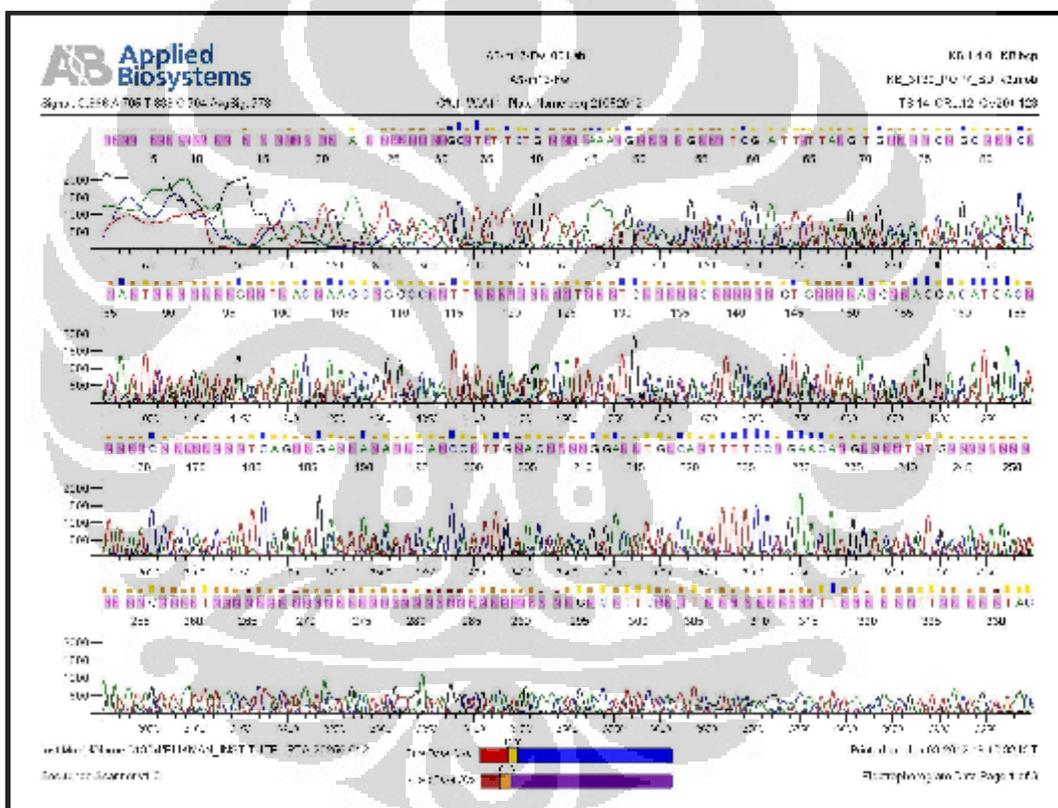
**Gambar 4.5.** Hasil PCR koloni menggunakan kombinasi primer M13 Fw dan Bac Rv.

#### 4.5. Hasil Sekuensing

Masing-masing produk PCR dipurifikasi dari gel agarosa. Hasil purifikasi kemudian menjadi sampel untuk sekuensing. Sampel disekuensing dengan menggunakan primer penghasil produk PCRnya. Hasil sekuensing yang didapat kurang memuaskan sehingga proses pembacaan urutan basa pun menjadi sulit. Dari hasil elektroferogram yang didapat banyak ditemukan puncak yang saling bertumpuk dan jarak antara puncak tidak stabil seperti tampak pada Gambar 4.6 dan Gambar 4.7. Hal ini kemungkinan dikarenakan oleh sampel sekuensing terdiri dari dua cetakan DNA yang berukuran sama sehingga menimbulkan banyak *noise* pada elektroferogram. Dari semua sampel sekuensing, yang memberikan elektroferogram yang cukup untuk dapat dibaca adalah dari hasil *cycle sequencing* menggunakan primer universal M13 baik Fw maupun M13 Rv. Setelah dilakukan koreksi dan pembacaan manual untuk puncak yang teridentifikasi sebagai N selanjutnya sekuens dianalisis dengan BLAST. Hasil BLAST untuk M13 Fw tidak

memberikan kecocokan dengan gen manapun. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh hasil PCR produk dari amplifikasi menggunakan kombinasi M13 Fw dan Bac Rv disertai oleh banyak pita yang tidak spesifik. Walaupun nampak satu pita tebal yang diperkirakan merupakan produk PCR utama nampaknya tidak terdiri dari satu cetakan DNA. Berikut ini adalah hasil sekuens dari salah satu produk PCR klon A5 *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dengan Primer M13 Fw :

ATTTATGCGCAGTGCACACGTGTTATCCTAGGACATGACTTATAACTG  
 CATCATTCAGATGATTAGATTCACCCTTTGTACCACCGGACATGTCAT  
 TTTTCCCGAACATGCACTTGTGCCATAAGTGT

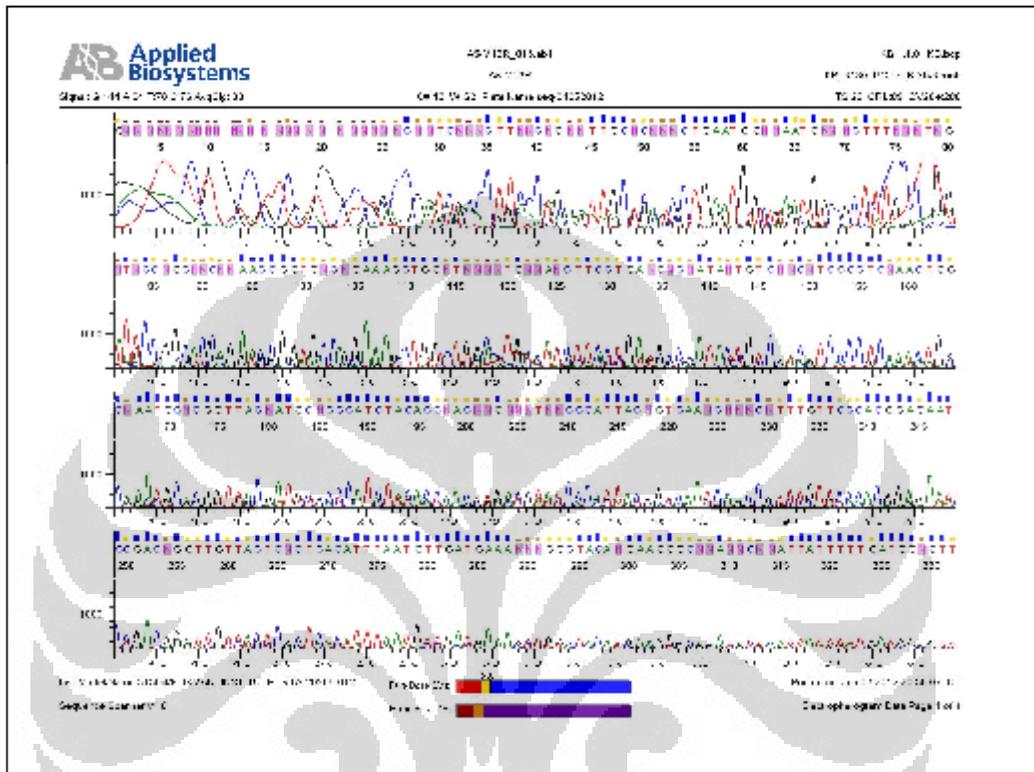


**Gambar 4.6.** Elektroferogram hasil sekuensing Klon A5 dengan primer universal M13 Fw

Sedangkan hasil sekuens dengan M13 Rv untuk hasil PCR dari klon A5 adalah sebagai berikut :

CCGGCACCAGAACCGGTGCCAGAAAGCTGGCTGGCTGCGATCTTCCTG  
 ATGCCTATACTGTCGTCGTCGCCCTCAAAGTGGCAAATGCACGGTTACG  
 ATGCCCCCATCTACACCCACGTGACGTATCCCATTACGGTCAATCCGC

CGTTTGTCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTA  
 ATGTTGATGAAAGCTGGCTACATGAAGGGCAG

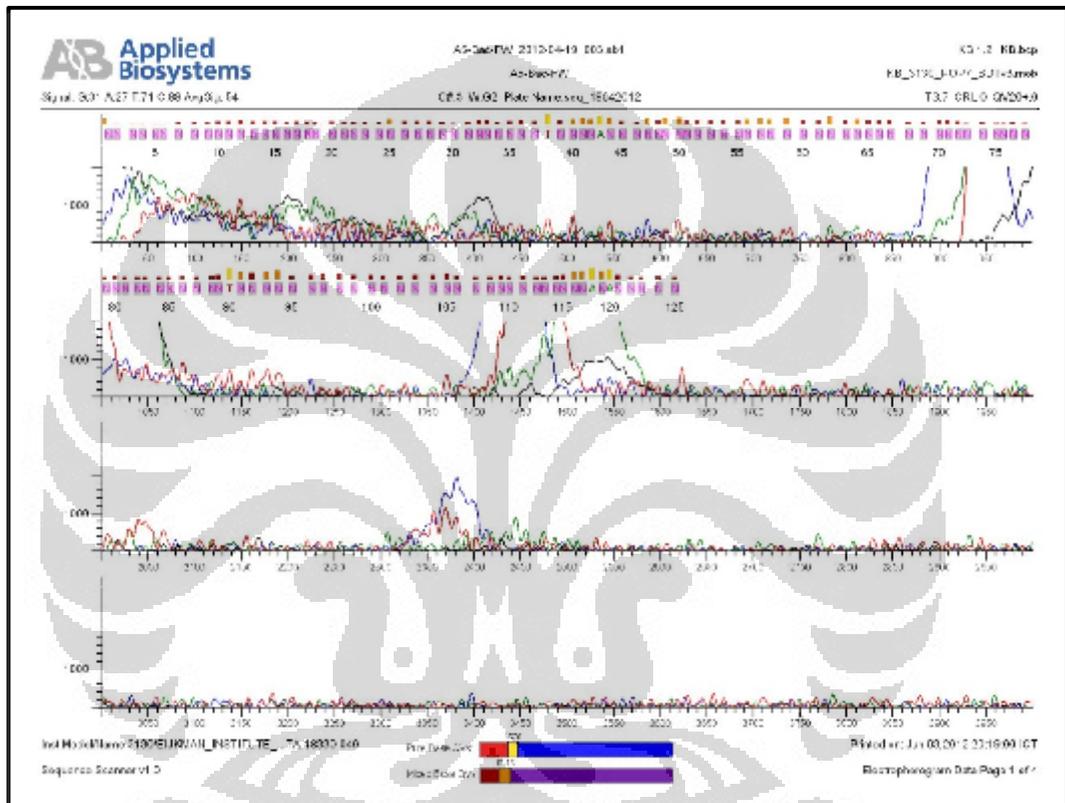


**Gambar 4.7.** Elektroferogram hasil sekuens klon A5 dengan primer universal M13 Rv

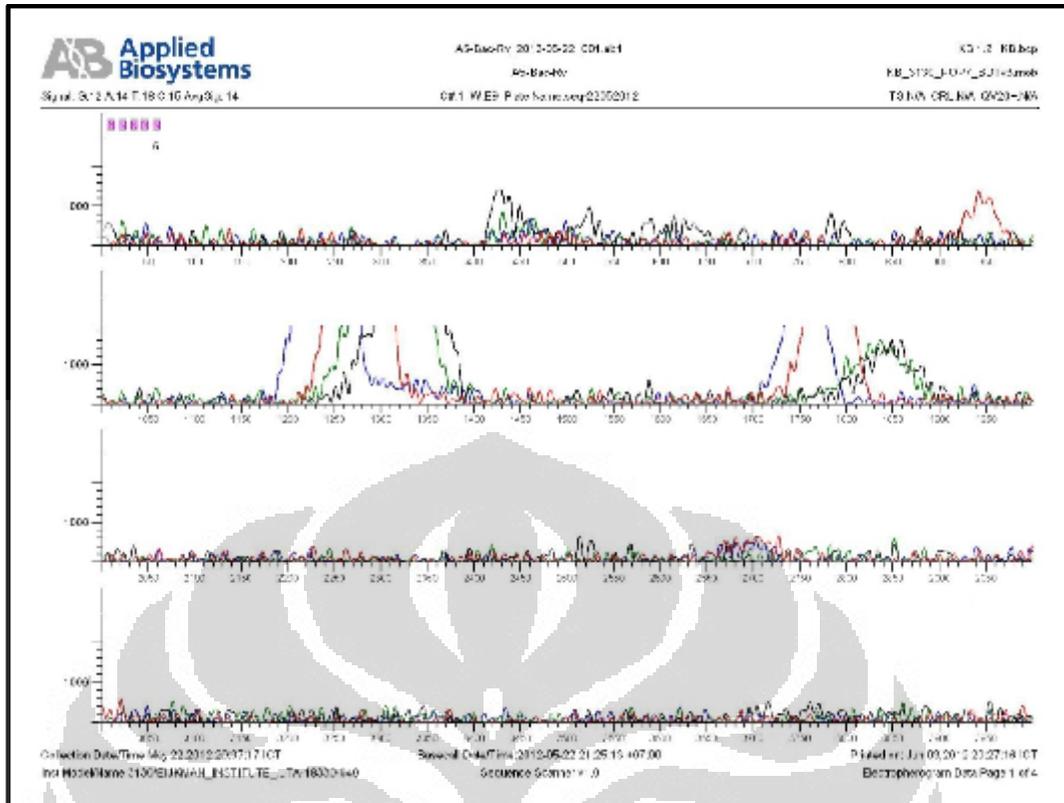
Ketika dilakukan analisis dengan metode BLAST diketahui bahwa gen yang didapatkan memiliki kemiripan dengan gen penyandi beta-galaktosidase. Kemungkinan yang terbaca dari hasil sekuensingnya hanya bagian gen LacZ dari vektor saja.

Disamping itu ada pula kemungkinan dapat terjadi mutasi yang tidak diinginkan. Hal ini sering terjadi pada pembuatan *genomic library* menggunakan plasmid pUC19 untuk DNA genomik dengan persen AT tinggi (60 %-65%). Dimana BAL *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 memiliki persen AT sebesar 62,4 %, dan *Weissella confusa* LBAE C39-2 mengandung AT sebesar 55,3 % (Godiska, Patterson, Schoenfeld, dan Mead, 2005). Sedangkan hasil *cycle*

*sequencing* menggunakan primer *degenerate* bakteriosin tidak memberikan elektroferogram yang dapat ditafsirkan. Kemungkinan hal ini dikarenakan oleh penempelan primer yang tidak spesifik sehingga produk dari *cycle sequencing* menurun kualitasnya menjadi banyak cetakan yang berbeda sehingga elektroferogram yang dihasilkan bertumpuk dan intensitas puncak yang dihasilkan kecil seperti terlihat pada Gambar 4.8 dan Gambar 4.9.



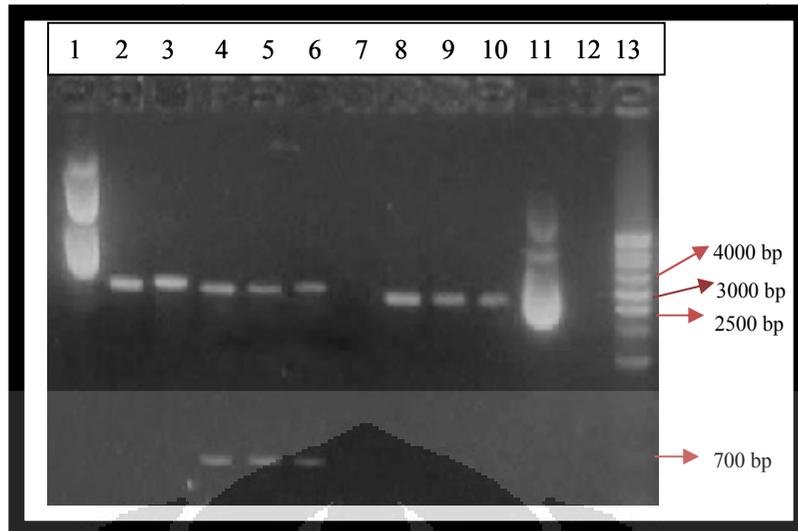
**Gambar 4.8.** Elektroferogram hasil sekuensing klon A5 dengan primer deg Bac Fw.



**Gambar 4.9.** Elektroferogram hasil sekuensing klon A5 dengan primer deg Bac Rv

#### 4.6. Verifikasi dengan Menggunakan Endonuklease Restriksi

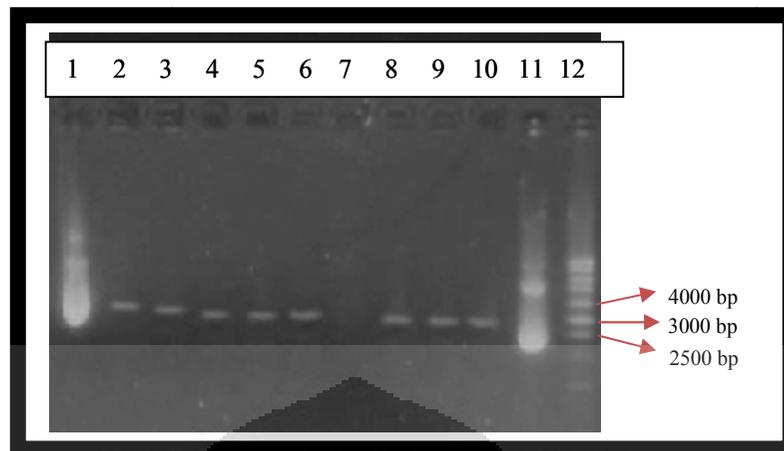
Dari semua koloni putih yang didapat dilakukan isolasi plasmid untuk verifikasi dengan menggunakan endonuklease restriksi. Semua plasmid didigesti dengan menggunakan endonuklease restriksi *EcoRI*, *HindIII*, kombinasi *EcoRI* dan *HindIII*. Plasmid klon A2 dari rekombinan *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 menunjukkan hasil pemotongan seperti nampak pada Gambar 4.10. Ketika didigesti dengan menggunakan enzim *EcoRI* tunggal dan *HindIII* tunggal nampak 1 pita berukuran 3500 bp sedangkan ketika dipotong menggunakan kombinasi *EcoRI* dan *HindIII* menunjukkan adanya 2 pita yang masing-masing berukuran 2700 bp dan 700 bp.



Keterangan : 1. Plasmid utuh klon A2; 2. Plasmid klon A2 terdigesti *HindIII*; 3. Plasmid Klon A2 terdigesti *EcoRI*; 4. Plasmid klon A2 terdigesti *EcoRI- HindIII* dengan *reaction buffer 2*; 5. Plasmid klon A2 terdigesti *EcoRI-HindIII* dengan *reaction buffer 3*; 6. Plasmid klon A2 terdigesti *EcoRI- HindIII* dengan *buffer* tanggo; 7. Kosong; 8. Plasmid pUC19 terdigesti *BamHI*; 9. Plasmid pUC19 terdigesti *EcoRI*; 10. Plasmid pUC 19 terdigesti *HindIII*; 11. Plasmid pUC 19 utuh; 12. Kosong; 13. *Marker* 1 kb

**Gambar 4.10.** Hasil verifikasi dengan endonuklease restriksi dari klon A2.

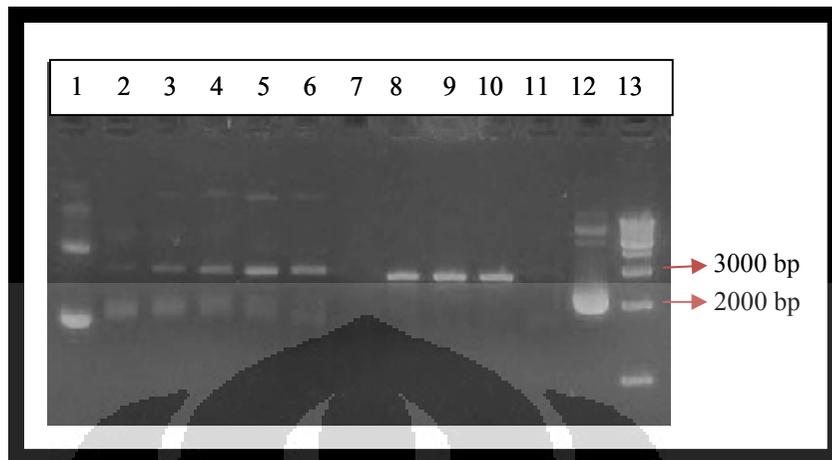
Untuk plasmid klon A4 menunjukkan hasil pemotongan seperti nampak pada Gambar 4.11. Hasil pemotongan baik menggunakan 1 enzim maupun 2 enzim menunjukkan ukuran sekitar 2,6 kb. Pola restriksi seperti ini kemungkinan dikarenakan oleh koloni putih yang dihasilkan berasal dari dua plasmid pUC19 yang saling bereligasi.



Keterangan : 1. Plasmid utuh klon A4; 2. Plasmid klon A4 terdigești *HindIII*; 3. Plasmid Klon A4 terdigești *EcoRI*; 4. Plasmid klon A4 terdigești *EcoRI-HindIII* dengan *reaction buffer 2*; 5. Plasmid klon A4 terdigești *EcoRI-HindIII* dengan *reaction buffer 3*; 6. Plasmid klon A4 terdigești *EcoRI-HindIII* dengan *buffer* tanggo; 7. Kosong; 8. Plasmid pUC19 terdigești *BamHI*; 9. Plasmid pUC19 terdigești *EcoRI*; 10. Plasmid pUC 19 terdigești *HindIII*.; 11. Plasmid pUC19 utuh; 12. *Marker 1kb*

**Gambar 4.11.** Hasil verifikasi dengan endonuklease restriksi dari klon A4.

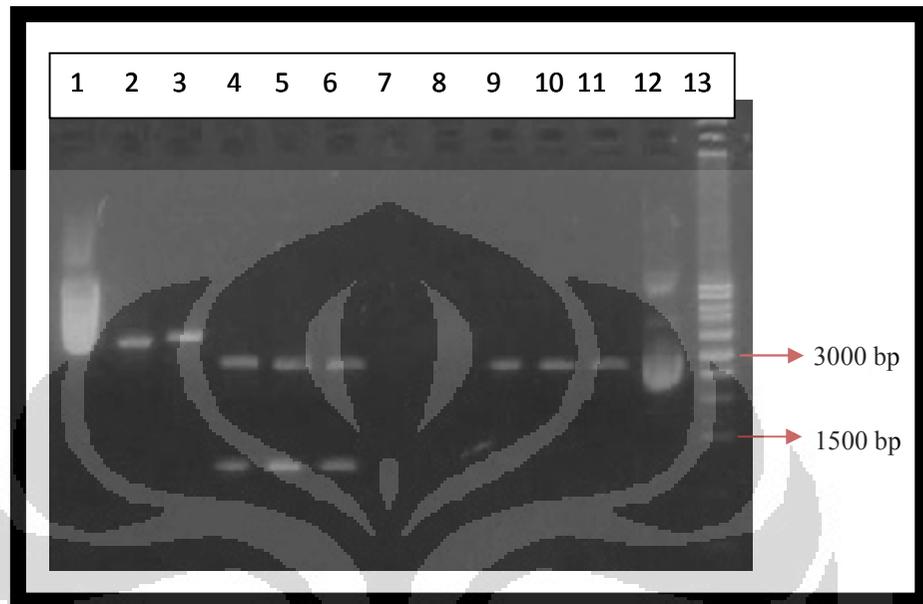
Sedangkan untuk plasmid klon A5 menunjukkan hasil pemotongan seperti tampak pada Gambar 4.12. Hasil pemotongan baik menggunakan satu endonuklease restriksi maupun dua endonuklease restriksi menunjukkan adanya pita pada daerah 2,6 kb. Pita tersebut merupakan pita dari plasmid pUC19 yang terdigești. Disamping itu terdapat pita pada daerah 2000 bp yang kemungkinan merupakan sisipan dari rekombinan klon A5. Terdapatnya pita pada daerah 2000 bp ketika dipotong dengan menggunakan enzim *EcoRI* dan *HindIII* kemungkinan dikarenakan oleh terdapat situ restriksi dari *EcoRI* dan *HindIII* pada bagian DNA insert yang terklon. Sedangkan pita-pita yang nampak berada pada daerah di atas 2,6 kb diduga hasil dari digesti plasmid yang belum sempurna.



Keterangan : 1. Plasmid utuh klon A5; 2. Plasmid klon A4 terdigesti *HindIII*; 3. Plasmid Klon A5 terdigesti *EcoRI*; 4. Plasmid klon A5 terdigesti *EcoRI- HindIII* dengan *reaction buffer 2*; 5. Plasmid klon A5 terdigesti *EcoRI-HindIII* dengan *reaction buffer 3*; 6. Plasmid klon A5 terdigesti *EcoRI- Hind III* dengan *buffer tanggo*; 7. Kosong; 8. Plasmid pUC19 terdigesti *BamHI*; 9. Plasmid pUC19 terdigesti *EcoRI*; 10. Plasmid pUC19 terdigesti *HindIII*; 11. Kosong; 12. Plasmid pUC19 utuh; 13. *Marker 1kb*.

**Gambar 4.12.** Hasil verifikasi dengan endonuklease restriksi dari klon A5.

Untuk rekombinan dari *Weissella confusa* MBF 8-1 yaitu klon B2 menunjukkan hasil pemotongan berupa satu pita pada daerah sekitar 4000 bp ketika dipotong dengan enzim *EcoRI* saja ataupun *HindIII* saja. Sedangkan ketika dipotong dengan menggunakan kombinasi dua enzim tersebut nampak dua pita pada gel agarosa seperti dapat diamati pada Gambar 4.13. Pita pertama terlihat pada daerah 2600 bp sesuai dengan ukuran plasmid pUC19 dan pita kedua muncul pada daerah sekitar 1300 bp yang diduga merupakan pita hasil DNA sisipan MBF 8-1.



Keterangan : 1. Plasmid utuh klon B2; 2. Plasmid klon A4 terdigești *Hind*III; 3. Plasmid Klon B2 terdigești *Eco*RI; 4. Plasmid klon B2 terdigești *Eco*RI- *Hind*III dengan *reaction buffer* 2; 5. Plasmid klon B2 terdigești *Eco*RI-*Hind*III dengan *reaction buffer* 3; 6. Plasmid klon B2 terdigești *Eco*RI- *Hind*III dengan *buffer* tanggo; 7. Kosong; 8. Kosong ; 9. Plasmid pUC19 terdigești *Bam*HI; 10. Plasmid pUC19 terdigești *Eco*RI; 11. Plasmid pUC19 terdigești *Hind*III; 12. Plasmid pUC19 utuh; 13. *Marker* 1kb

**Gambar 4.13.** Hasil verifikasi dengan endonuklease restriksi dari klon B2.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Teknik *genomic library* yang digunakan untuk identifikasi dan kloning DNA genomik *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 dan *Weissella confusa* MBF 8-1 telah berhasil dilakukan yang diindikasikan dengan adanya koloni putih. Meskipun demikian gen bakteriosin belum dapat teridentifikasi dari koloni putih yang didapatkan dengan menggunakan primer deg Bac.

#### 5.2. Saran

1. Penelitian dengan menggunakan rancangan primer *degenerate* lain yang memiliki degenerasi lebih sedikit perlu dilakukan untuk mengidentifikasi gen bakteriosin dengan mempertimbangkan hasil penelitian ini.
2. Alkaline fosfatase dapat dicobakan pada plasmid pUC19 yang telah terdigesti dalam upaya menghindari terjadinya religasi pada saat ligasi sehingga proses ligasi dapat berlangsung dengan efisien dan didapat jumlah klon yang mencukupi untuk skrining menggunakan PCR koloni.

## DAFTAR ACUAN

- Affymetrix. (2011). USB<sup>®</sup> Prep Ease<sup>®</sup> Gel Extraction Kit. USA : Affymetrix Inc.
- Affymetrix. (2010). Prep Ease<sup>®</sup> MiniSpin Plasmid Kit. USA : Affymetrix Inc.
- Anonim. (n.d.). Molecular Cloning pUC18, pUC19 DNA. 1 hlm.  
<http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-cloning/sd005>, 25  
 Februari 2012, pk 20.48
- Ausubel, F. M., et al. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York : John Wiley & Sons, 2.4.1-2.4.5, 5.3.1, 7.0.1-7.0.5, 7.1.1-7.1.5 .
- Bam*HI. (n.d.). US : New England Biolabs Inc.
- Bergey, D.H, dan Boone, D.R. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York : Springer, 655,657,694.
- Black, J.G. (1999). *Microbiology: Principles and Exploration*. New Jersey: Prentice Hall., 238-243.
- Brown, T. (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis an Introduction.*( 5<sup>th</sup> ed.) Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd., 5, 7, 13-16, 47, 53-54, 72-75, 84, 131
- Compton, T. (1990). Degenerate Primers for DNA Amplification. Dalam Innis, Michael A. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. San Diego : Academic Press Inc., 39-45
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen L, dan Prevost, H., (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol R*, 70 (2), 564-582.
- Eijsink, V., Skeie, M., Middelhoven, H., Bruberg, M.B., dan Nes, I.F (1998). Comparative studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3257-3281.
- Eijsink, V., Axelsson, L., Diep, D., Havarstein, L., Holo, H., dan Nes I. (2002). Production of class II bacteriocins by Lactic Acid Bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 639-654.
- Fimland, G., Eijsink, V., dan Meyer, J. (2002). Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* 148 : 3661-3670.
- Fisher, J.F.; Meroueh, S.O., dan Mobashery, S. (2005), Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.*, 105, 395-424.
- Fremaux C., Hechard Y., dan Cenatiempo. (1995). Mesentericin Y105 gene cluster in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*, 141, 1637-1645.
- Godiska R., Patterson M., Schoenfeld T., dan Mead A. D. (2005), Beyond pUC : Vector for Cloning Unstable DNA. Dalam : Kieleczawa J. *DNA*

- Sequencing: Optimizing the Process and Analysis*. Canada : Jones and Bartlett Publishers Canada, 67.
- Innis, M.A., dan Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. Dalam Innis, Michael A. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press Inc., 3-11
- Lipsitch, M., Bergstrom, C. T. dan Levin, B.R. (2000). The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals : paradoxes and prescriptions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1938-1943
- Jack, R., Tagg, J., dan Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59 (2), 71-200
- KAPA2G<sup>TM</sup> Robust Hotstart*. (n.d.). USA : Biosystem
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology*, 12, 39-86.
- Karcher, S.J. (1995). *Molecular Biology: A Project Approach*. California: Academic Press, 77, 247-248.
- Kumar, A. dan Schweiser, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 1486-1513
- Oppegard, C., Emanuelsen, L., Thorbek, L., Fimland, G., dan Nissin, J. (2010). The lactococcin G immunity protein recognizes specific regions in both peptides constituting the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *App Environ Microb*, 76,(4), 1267-1273.
- Malik, A., Ariestanti, D.M., Nurfachtiyani, A., dan Yanuar, A. (2008). Skrining Gen Glukosiltransferase (gtf) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Makara (Seri Sains)*, 12, 1-6.
- Mozzi, F., Raya, R.R., dan Vignolo, G.M. (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria : Novel Applications*. Singapore: Wiley-Blackwell, 89-97.
- Nes, I., Diep, D., dan Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol*, 189 (4), 1189-1198
- Nes, I., Yoon, S.S., dan Diep, D.B. (2007). Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Sci. Biotechnol*, 16 (5) , 675-690
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B., dan Soccol, C.R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Braz Arch Biol Techn* , 50, 521-524
- Primrose, S.B., Twyman, R.M., dan Old, R.W. (2001). *Principles of gene manipulation 6<sup>th</sup> ed*. Australia: Blackwell Science Ltd., 31, 48-49
- Quadri, L.E.N. (2002). Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 133-145.

- Rapley, R., dan Walker, J. (2005). *Molecular Biology and Biotechnology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 24-26.
- Reimer, G., dan Carroll, K.C. Procedures for the storage of microorganism. Dalam: Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: Mayo Foundation, 149-159.
- Sambrook, J., dan Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual, Thrid Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.24, 1.116, 1.119, 5.2-5.11, 8.4-8.14.
- Sari, R., Anita, C., Radji, M., dan Malik, A. (2011). Isolasi dan Karakterisasi Bakteriosin Galur Bakteri Asam Laktat Isolat Lokal Genus *Streptococcus* dan *Weissella*. *Jifl*. 9 (2), 116-121.
- Sau3AI. (n.d.). US : New England Biolabs Inc.
- Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L., Hsiao, K., dan Chen, Y. (2007). Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibara* 110, isolated from plaa-Som, a fermented fish product from Thailand. *App Environ Microb*. 73 (7) : 1-4
- Strachan, T., dan Read, A.P. (1999). *Human Molecular Genetics*. (2<sup>nd</sup> ed). New York: Wiley-Liss. Desember 27, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7579/>
- Struble, J.M., Handke, P, dan Gill, R.T. (2009). Genome sequence databases: Genomic, consruction of libraries. Dalam : Schaechter M. *The Desk Encyclopedia of Microbiologi*. Oxford : Academic Press, 577.
- T4 DNA Ligase. (n.d.). US : New England Biolabs Inc.
- Yoneyama, H. dan Katsumata, R. (2006). Antibiotik Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70. 1060-1075.
- Yuwono, T. (2006) *Teori dan Aplikasi: Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta : Penerbit Andi, 1-4, 17-23, 89-93.
- Winfrey, M.R., Rott, M.A., dan Wortman, A.T. (1997). *Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory*. New Jersey: Prentice Hall Inc., 27-28, 42-43, 285-288

**Lampiran 1.** Gambar alat-alat yang digunakan di laboratorium



**Gambar 1.** Mikrosentrifus berpendingin  
[Sorvall-fresco]



**Gambar 2.** Mikrosentrifus Mini Spin  
[Eppendorf]

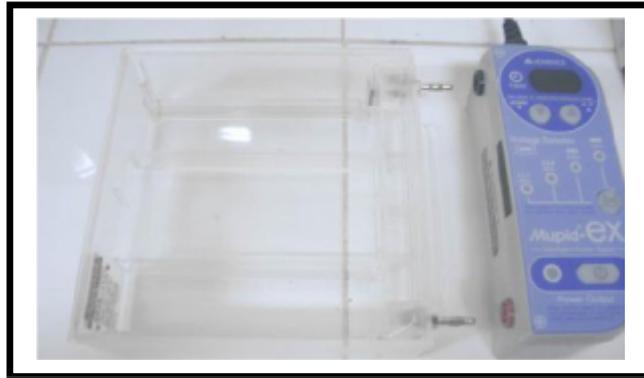


**Gambar 3.** *Orbital Shaker Inkubator*



**Gambar 4.** *Thermal Cyclers*

[MJ Mini Biorad]



**Gambar 5.** Alat elektroforesis gel mini [Mupid-EX]



**Gambar 6.** UV transilluminator [BDA Biometra Tl 1]

## Lampiran 2. Komposisi medium

### Medium de Man Rogosa Sharpe (MRS) [Oxoid]

Setiap 1 L mengandung :

<i>Peptone</i>	10,0	g
<i>'Lab lemco' Powder</i>	8,0	g
<i>Natrium asetat . 3H<sub>2</sub>O</i>	5,0	g
<i>Glukosa</i>	20,0	g
<i>Yeast extract</i>	4,0	g
<i>Dikalium hidrogen fosfate</i>	2,0	g
<i>Sorbitan mono-oleat</i>	1,0	ml
<i>Triammonium citrate</i>	2,0	g
<i>Magnesium sulfat . 7H<sub>2</sub>O</i>	0,2	g
<i>Manganese sulfat . 4H<sub>2</sub>O</i>	0,05	g

### Medium Luria Bertani (LB) Broth [Usb]

Setiap 1 L mengandung :

Casein peptone	10,0	g
Yeast extract	5	g
Natrium klorida	5	g

### Lampiran 3. Certificate of Analysis BamHI [NEB]

**BamHI**

Supplies: 5000 Units (100 µg) in a 0.1 ml (100 µl) of 100 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 500 µg/ml BSA and 50% glycerol.

**Reagent Supplied with Enzyme:**  
10X NEBuffer 3, 1000 U/50 µl.

**Reaction Conditions:** 10X NEBuffer 3 supplemented with 100 µg/ml BSA, incubated at 37°C.

**1X NEBuffer 3:**  
100 mM NaCl  
50 mM Tris-HCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT  
pH 7.5 @ 25°C

**Unit Definition:** One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of λ-DNA in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 50 µl.

**Substrate Compatibility:** Inset Table A, sites 5'-GGATC-3' and 5'-GGATC-3' (100% activity) and 5'-GGATC-3' (100% activity).

**Quality Control Assays:**

**Ligation:** The 5'-ATG overhangs on BamHI (>95% of the DNA fragments) can be ligated with 10 U/ml Ligase (e.g., 5' terminal concentration of 1–2 µM) at 15°C. Of these ligated fragments, >90% can be recut.

**10-Hour Incubation:** 100 µg of enzyme incubating 1 µg of DNA and 100 units of enzyme incubated for 10 hours result in the same amount of DNA bands as a reaction incubated for 1 hour with 1 unit of enzyme.

**Endonuclease Activity:** Incubation of 100 units of enzyme with 1 µg of substrate DNA (100 copies) for 1 hour at 37°C in 50 µl reaction buffer released < 0.1% undigested substrate.

**Autocleavage Activity:** Incubation of 100 units of enzyme with 1 µg of DNA for 1 hour at 37°C in 50 µl reaction buffer resulted in < 0.1% conversion to PCR II.

**Blue/White Screening Assay:** This enzyme has been tested to determine the integrity of the DNA once produced after digestion with an excess of enzyme. An appropriate vector is digested at a concentration of 100 U/ml for 10–15 minutes in 100 µl of reaction buffer. Successful expression of the plasmid is a function of the amount of proteinase K used in the digestion protocol. Successful expression of the plasmid is a function of the amount of proteinase K used in the digestion protocol. Enzymes must produce fewer than 1% white colonies to be Blue/White Certified.

**Enzyme Properties:**

Activity in HEPES buffer  
SEBulle 1: 71%  
SEBulle 2: 100%  
SEBulle 3: 100%  
SEBulle 4: 112%

**Storage and Stability:** For maximum activity, BamHI for extended storage should be stored at -20°C.

**Host Inactivation:** No.

**Plasmid Cleavage Assay:** The enzyme has been tested to determine the integrity of the DNA once produced after digestion with an excess of enzyme.

Also Available in High-Fidelity (HF) Format

Notes: Not sensitive to dam, dcm or mraIII methylase.  
Conditions of low ionic strength, high enzyme concentration, glycerol concentrations > 5%, or pH > 8.0 may result in star activity.

Companion Products:

BamHI-HF\* 5,000 Units  
#R3136S 50,000 Units  
#R3136L 50,000 Units

\* Time-Saver Quality. (See www.neb.com for details)

Form # R3136C

## Lampiran 4. Certificate of Analysis Sau3AI [NEB]

**Sau3AI**

1-800-424-2799  
info@neb.com  
www.neb.com

**R0169S**

200 units Lot: 0941188 Exp: 6/12  
RECOMBINANT 4,000 U/ml Store at -20°C

**Recognition Site:**  
5'...GATC...3'  
3'...CTAG...5'

**Source:** An *E. coli* strain that carries the cloned Sau3AI gene from *Staphylococcus aureus* 3A (J.S. Sorenson)

**Supplied in:** 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA and 50% glycerol.

**Reagents Supplied with Enzyme:**  
10X NEBuffer 1, 100X BSA

**Reaction Conditions:** 1X NEBuffer 1, supplemented with 100 µg/ml BSA, incubate at 37°C.

**1X NEBuffer 1:**  
10 mM Tris Propylene-Glycol  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT  
pH 7.0 @ 25°C

**Unit Definition:** One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of λ-DNA in 1 hour at 37°C in a total reaction volume of 50 µl.

**Diluent Compatibility:** Lowest buffer A, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA and 50% glycerol (pH 7.4 @ 25°C).

**Quality Control Assays**

**Ligation:** After 20-fold overdigestion with Sau3AI, approximately 75% of the DNA fragments can be ligated with 14 DNA Ligase (at a 5' terminal concentration of 1–2 µM) at 16°C. Of these ligated fragments, > 95% can be recut.

**16-Hour Incubation:** A 50 µl reaction containing 1 µg of DNA and 20 units of Sau3AI incubated for 16 hours resulted in the same pattern of DNA bands as a reaction incubated for 1 hour with 1 unit of enzyme.

**Exonuclease Activity:** Incubation of 20 units of Sau3AI with 1 µg sonicated <sup>32</sup>P DNA (10<sup>6</sup> cpm/µg) for 4 hours at 37°C in 50 µl reaction buffer released < 0.1% radioactivity.

**Endonuclease Activity:** Incubation of 10 units of Sau3AI with 1 µg pT174 RF I DNA for 4 hours at 37°C in 50 µl reaction buffer resulted in < 1% conversion to RF I.

**Enzyme Properties**

**Activity in NEBuffers:**  
NEBuffer 1 100%  
NEBuffer 2 50%  
NEBuffer 3 10%  
NEBuffer 4 100%

When using a buffer other than the optimal (supplied) NEBuffer, it may be necessary to add more enzyme to achieve complete digestion.

**Survival in a Reaction:** A minimum of 0.50 unit is required to digest 1 µg of substrate DNA in 16 hours.

**Heat Inactivation:** 65°C for 20 minutes.

**Note:** Sau3AI and DpnII are isochloamers of MboI.

Unlike DpnII and MboI, Sau3AI is not blocked by *dam* methylation. Cleavage of mammalian genomic DNA is blocked by overlapping *CoD* methylation.

U.S. Patent No. 5,175,131

CERTIFICATE OF ANALYSIS

## Lampiran 5. Certificate of Analysis T4 DNA Ligase [NEB]

**T4 DNA Ligase**

70,000 units 400,000 cohesive end subunit Exp. 1/13

**M0202S**

RECOMMEND Store at -20°C Lot: 0001007

**Description:** Catalyzes the formation of a phosphodiester bond between juxtaposed 5' phosphate and 3' hydroxyl termini in duplex DNA or RNA. This enzyme will join blunt end and cohesive end termini as well as repair single-stranded nicks in duplex DNA, RNA or DNA/RNA hybrids (1).

**Source:** Purified from *E. coli* O100 pol687 pUC29 lig1 (2).

**Applications:**

- Cloning of restriction fragments (3)
- Joining linkers and adaptors to blunt-ended DNA

Supplied in 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT and 50% glycerol.

**Reagents Supplied with Enzyme:**  
10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer

**Reaction Conditions:** 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer; incubate at 16°C.

**1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer**  
50 mM Tris-HCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT  
1 mM ATP  
pH 7.5 @ 25°C

Recommended DNA concentration 0.1 to 1 µg of 5' phosphorylated.

**Unit Definition:** Cohesive End Ligase Unit (U) One NEB unit is defined as the amount of enzyme required to join 90% ligation of HindIII fragments of 1.5 kbp (5' DNA termini concentration of 0.12 µM [300 µg/ml]) in 20 µl of 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer in 30 minutes at 16°C.

**Heat Inactivation:** 65°C for 15 minutes.

**Quality Control Assays**

**Exonuclease Activity:** Incubation of 3,200 units of enzyme with 1 µg sonicated <sup>32</sup>P DNA (2 × 10<sup>6</sup> cpm) for 4 hours at 37°C in 50 µl of reaction buffer released < 0.1% radioactivity.

**Nuclease Activity:** Incubation of 3,200 units for 18 hours in assay buffer with HindIII fragments of 1. DNA yielded a clear and sharp banding pattern on agarose gels.

**Endonuclease Activity:** Incubation of 3,200 units for 4 hours at 37°C in 50 µl of reaction buffer resulted in < 5% conversion to RF II.

**Room Temperature Ligation:** For convenience, ligations may be done at room temperature (20–25°C). For cohesive (sticky) ends, use 1 µl of T4 DNA Ligase in a 20 µl reaction for 10 minutes. For blunt ends, use 1 µl of T4 DNA Ligase in a 20 µl reaction for 2 hours or 1 µl high concentration T4 DNA Ligase for 10 minutes.

**Alternatives:** NEB's **Ultra-Ligase** (U) (NEB #M0205, [30 reactions]) or NEB's **Clonase II** (100 reactions) is uniquely formulated to ligate both blunt and cohesive (sticky) ends in 5 minutes at room temperature.

**Physical Purity:** Purified to > 90% homogeneity as determined by SDS-PAGE analysis using Coomassie blue detection.

**Notes on Use:** ATP is an essential cofactor for the reaction. This cofactor with E. coli DNA Ligase which requires NAD.

To dilute T4 DNA Ligase that will subsequently be stored at -20°C, 50% glycerol storage buffer (Diluent Buffer A, NEB #M9901S) should be used to dilute for immediate use. 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer can be used.

Ligation can also be performed in any of the four restriction endonuclease NEBuffers or in T4 Polynucleotide Kinase Buffer if they are supplemented with 1 mM ATP.

**References:**

1. English M. J. and Richardson C. C. (1982). In P. D. Boyer (Ed.), *The Enzymes* Vol. 5, pp. 35. San Diego: Academic Press.
2. Tempest, E., Tsao, H. and Piers, W. (1983). *Gene* 22, 103-112.
3. Sambrook, J., et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), pp. 1.55-1.73. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

## Lampiran 6. Certificate of Analysis Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder



**Solis BioDyne**  
Certificate of Analysis



### 1 kb DNA Ladder

Ready to Load

Cat. No.

Lot. No.

Dispense No.

Expiry date

Description:

The 1 kb DNA Ladder is a ready-to-use molecular weight marker suitable for DNA fragment size determination on gel electrophoresis. The 1 kb DNA Ladder is formulated to run accurately and to provide sharp band patterns. It contains two dyes: bromophenol blue and xylene cyanole which serve as visual aid to monitor the progress of migration during agarose gel electrophoresis. The 1 kb DNA Ladder contains 15 discrete DNA fragments ranging from 251 bp to 10,210 bp.

Shipping and storage conditions:

Shipping and storage for up to 8 months at room temperature has no detrimental effects on the quality of this reagent. -20°C is recommended for long term storage.

Quality Control

Assay	Result
HPLC	>99% pure
Functional quality (w/ PCR)	passed
Stability at ambient temperature	passed

Safety warnings and precautions:

This product and its components should be handled only by persons trained in laboratory techniques. It is advisable to wear suitable protective clothing, such as laboratory overalls, gloves and safety glasses. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In case of contact with skin or eyes, wash immediately with water.

Some applications this product is used in may require a license which is not provided by the purchaser of this product. Users should obtain the license if required.

FOR RESEARCH USE ONLY

APPROVED BY: Reire Tsaro

Solis BioDyne  
Tõra 135a, 51014 Tartu, Estonia, tel: 372 740 9946, fax: 372 740 2209, e-mail: solis@abd.ee, www.abd.ee

## Lampiran 7. Certificate of Analysis Solis BioDyne 100bp DNA Ladder

**Solis BioDyne**  
Certificate of Analysis

**100 bp DNA Ladder**  
Ready to Load

Cat. No. \_\_\_\_\_

Lot. No. \_\_\_\_\_

Dispense No. \_\_\_\_\_

Expiry date \_\_\_\_\_

**Description:**  
The 100 bp DNA Ladder is a ready-to-use molecular weight marker suitable for DNA fragment size determination on gel electrophoresis. The 100 bp DNA Ladder is formulated to run accurately and to provide crisp band patterns. It contains bromophenol blue dye which serves as visual aid to monitor the progress of migration during agarose gel electrophoresis. The 100 bp DNA Ladder contains 12 discrete DNA fragments ranging from 100 bp to 3,000 bp.

**Shipping and Storage conditions:**  
Shipping and storage for up to 3 months at room temperature has no detrimental effects on the quality of this reagent. +20°C is recommended for long term storage.

**Quality Control**

Assay	Result
HPLC	>99.99%
Functional quality (via PCR)	passed
Stability at ambient temperature	passed

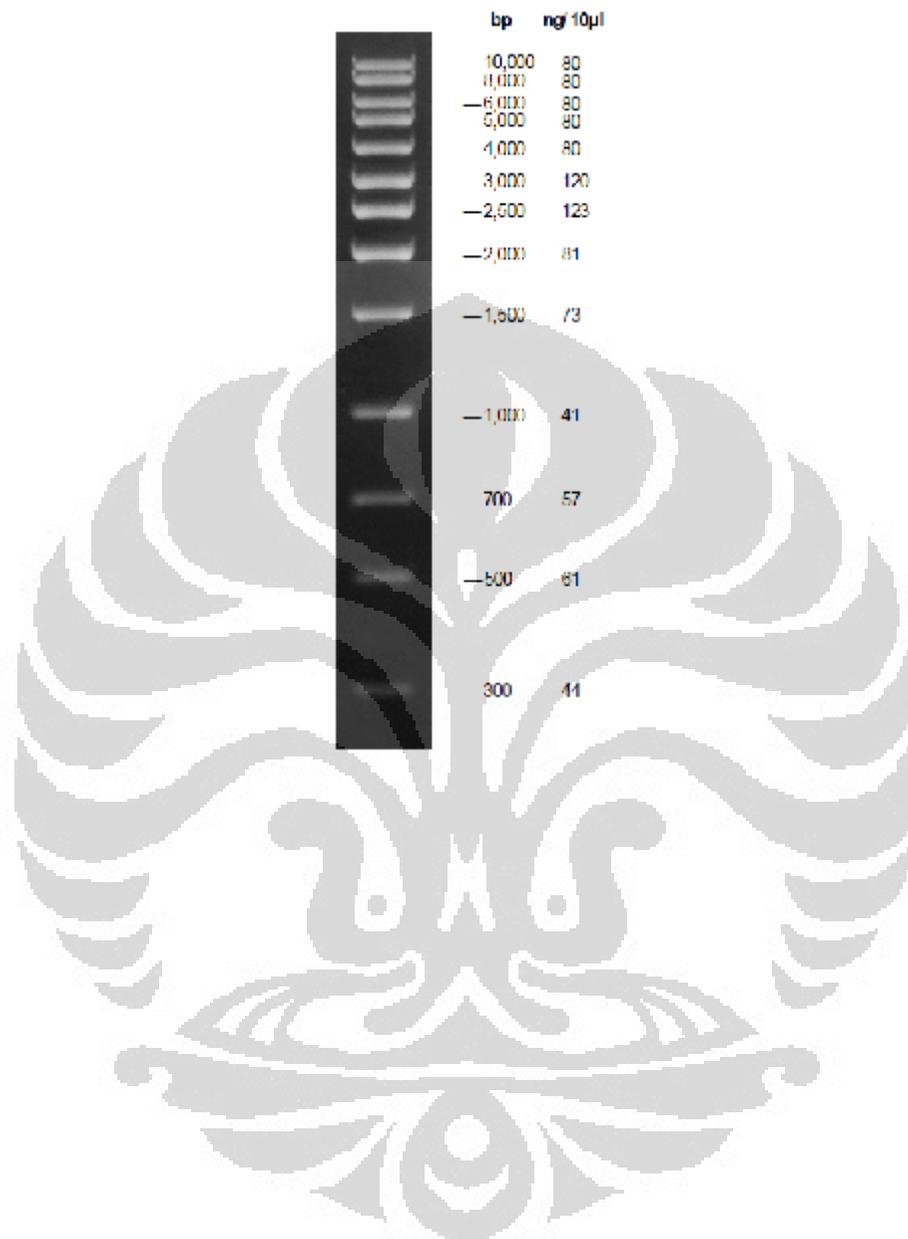
**Safety warnings and precautions:**  
This product and its components should be handled only by persons trained in laboratory techniques. It is advisable to wear suitable protective clothing such as laboratory coat/s, gloves and safety glasses. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In case of contact with skin or eyes, wash immediately with water.

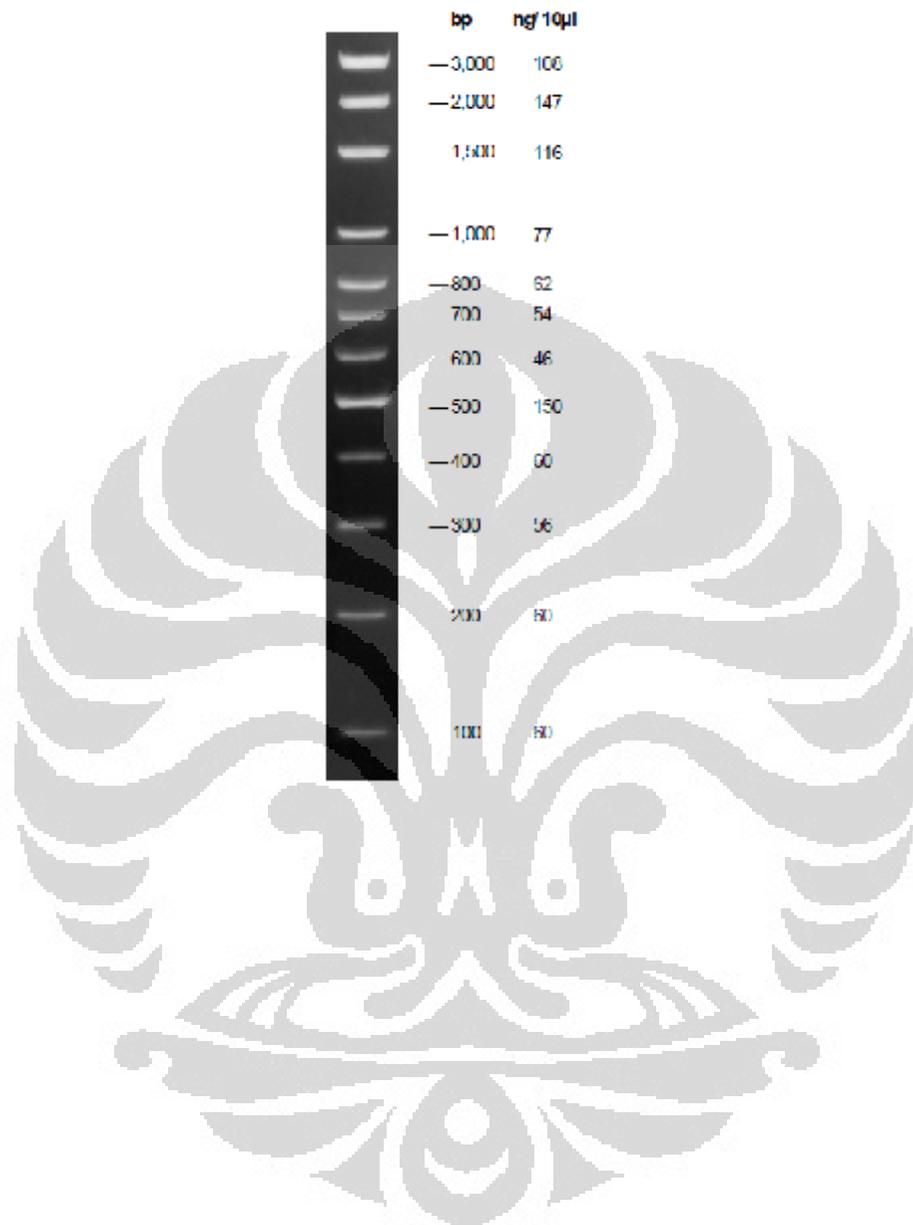
Some applications of this product require special license which is not provided by the package of this product. Users should obtain the license if required.

**FOR RESEARCH USE ONLY**

APPROVED BY: Kalvin Thano

Solis BioDyne  
974-1256, 512141 and Estonia, 941-372 740 (USA), 372 740 2010, e-mail: info@solis.bio www.solis.bio

**Lampiran 8.** Solis Biodyne 1 kb DNA Ladder

**Lampiran 9.** Solis Biodyne 100 bp DNA Ladder

## Lampiran 10. Certificate of Analysis *E.coli* TOP 10 [Invitrogen]



### Certificate of Analysis

**One Shot® TOP10  
Chemically Competent *E. coli*  
10 Reactions**

Part No./Catalog No. C464010  
Lot Number 888535A

#### Transformation Efficiency

50 µl of competent cells are transformed with 10 µg of supercoiled pUC19 plasmid DNA (non-saturating conditions). Test transformations are performed on a minimum of 3 vials per lot. Transformed cultures are plated on LB plates containing 100 µg/ml ampicillin and incubated overnight at 37°C.

Transformation efficiency must be greater than  $1.0 \times 10^8$  cfu/µg pUC19.

#### Antibiotic Sensitivity

Cells must exhibit growth on LB medium plates.

Untransformed cells must show no growth on LB plates containing 100 µg/ml ampicillin, indicating the absence of any ampicillin resistance markers.

Untransformed cells must show no growth on LB plates containing 50 µg/ml kanamycin, indicating the absence of any kanamycin resistance markers.

Untransformed cells must show no growth on LB plates containing 10 µg/ml tetracycline, indicating the absence of any tetracycline resistance markers.

Untransformed cells must show no growth on LB plates containing 10 µg/ml chloramphenicol, indicating the absence of any chloramphenicol resistance markers.

Untransformed cells must show no growth on LB plates containing 50 µg/ml Zeocin™, indicating the absence of any Zeocin™ resistance markers.

Untransformed cells must show growth of no more than 5 colonies on LB plates containing 100 µg/ml spectinomycin, indicating the absence of any spectinomycin resistance markers and a low rate of spontaneous mutation.

Untransformed cells must exhibit growth on LB plates containing 25 µg/ml streptomycin, indicating the presence of streptomycin resistance markers.

#### Absence of Bacteriophage

To verify the absence of phage contamination, 0.5–1.0 ml of TOP10 competent cells are added to LB top agar and poured over LB plates. After overnight incubation at 37°C, no plaques should be detected.

#### Results

Product meets all specifications.

This product is covered by U.S. Patent No. 4,981,737 and foreign equivalents.

## Lampiran 11. Brosur Primer Bac Fw [Cybergene AB]



**Product specification**

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

**Deliver to:** Sentra BD Ruko Cempaka Mas  
 Building C-26 Lajen Suprapto Jakarta 10640  
 Indonesia

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

**General information**  
**Volume:** Your oligo is originally dissolved in distilled water, thereafter the absorbance is measured. Your oligo is lyophilized.

**Storage:** In general oligonucleotides (non-labelled) can be stored for more than a year without 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 5-12. If you prefer storing your oligo freeze dried, please note that too many freeze drying cycles might degrade your oligo. Therefore - make aliquots before you dry 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 concerning your oligo, please do not hesitate to contact us. Good luck with your new oligo!

**Oligo Data**

Order number: 39493  
 Lab number: 160548700142547\_27  
 Order date and time: Mon Feb 6 02:03:46 2012  
 Oligo name: Bac\_Fw  
 Oligo comment: None  
 Sequence:  
 GGW GGW AAG TAT TAT OCK AAY GG  
 Total length: 23  
 Number modifications: 0  
 Unmodified length: 23  
 5' modification: none  
 3' modification: none  
 Internal modification: none  
 Int. mod. positions: Enter pos. (from 5' to 3')  
 Scale: 0.05  
 Purification: Cartridge  
 Delivery: Standard  
 Delivery form: Freeze dried

Unmodified mol weight: 7228.96  
 Modified mol weight: 7228.96  
 Od: 4.7  
 Yield [nmol]: 16.8  
 Yield [micro-gram]: 121.7  
 Vol. [100pmol/µl]: 168  
 T(m): 59.19  
 T(a): 54.19  
 C/G content: 39.13

## Lampiran12. Brosur Primer Bac Rv [Cybergene AB]



**Product specification**

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

*Deliver to:* Sentra DD Ruko Cempaka Mas  
 Building O-26 Lejen Supratik Jakarta 13640  
 Indonesia

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

**General information**  
**Volume:** Your oligo is originally dissolved in distilled water, thereafter the absorbance is measured. Your oligo is lyophilized.  
**Storage:** In general oligonucleotides (non-labelled) can be stored for more than a year with little or no degradation. They can be stored in media (such as water, ammonia, 20% cacotritrile, 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 5-12. If you prefer storing your oligo freeze dried, please note that too many freeze drying cycles might degrade your oligo. Therefore - make aliquots before you dry 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 concerning your oligo, please do not hesitate to contact us. Good luck with your new oligo!

**Oligo Data**

Order number: 39493  
 Lab number: 160549 / 00142547\_28  
 Order date and time: Mon Feb 6 02:03:47 2012  
 Oligo name: Bac\_Rv  
 Oligo comment: None  
 Sequence:  
 CAR AAW CCA TTT CCA CCA TTK GC  
 Total length: 23  
 Number modifications: 0  
 Unmodified length: 23  
 5' modification: none  
 3' modification: none  
 Internal modification: none  
 Int. mod. positions: Enter pos. from 5' to 3'  
 Scale: 0.05  
 Purification: Cartridge  
 Delivery: Standard  
 Delivery form: Freeze dried

Unmodified mol weight: 6928.66  
 Modified mol weight: 6928.66  
 Od: 7,9  
 Yield [nmol]: 31,9  
 Yield [micro gram]: 221,0  
 Vol.f.100pmol/l: 319  
 T(m): 59,19  
 T(a): 54,19  
 C/G content: 39,13

### Lampiran 13. Brosur Primer M13 F [Cybergene AB]



**CYBERGENE AB**

**Product specification**

Customer id: Sentra BD  
 Nancy Kapanow  
 nancy@sentrabd.com  
 Sentra Biosains Dinamika  
 Bioscins

*Deliver to:* Sentra BD Ruko Cempaka Mas  
 Building G-26 Leljen Suprpto Jakarta 10540  
 Indonesia

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

**General information**  
**Volume:** Your oligo is originally dissolved in distilled water, thereafter the absorbance is measured. Your oligo is lyophilized.

**Storage:** In general oligonucleotides (non-labelled) can be stored for more than a year with little or no degradation. They can be stored in media (such as water, ammonia, 20% acetantrile, 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. Therefore - make aliquots before you dry 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 concerning your oligo, please do not hesitate to contact us. Good luck with your new oligo!

**Oligo Data**

Order number: 39649  
 Lab number: 161386 / 00145783\_35  
 Order date and time: Wed Mar 28 08:46:30 2012  
 Oligo name: M13-F( 20)  
 Oligo comment: None  
 Sequence:  
 GTA AAA CGA CGG CCA G  
 Total length: 16  
 Number modifications: 0  
 Unmodified length: 15  
 5' modification: none  
 3' modification: none  
 Internal modification: none  
 Int. mod. positions: Enter pos- from 5' to 3'  
 Scale: 0.05  
 Purification: Cartridge  
 Delivery: Standard  
 Delivery form: Freeze dried

Unmodified mol weight: 4925.28  
 Modified mol weight: 4925.28  
 Od: 3.7  
 Yield [nmol]: 19.6  
 Yield [micro gram]: 96.4  
 Vol.f.100[pmol/ul]: 196 ul  
 T(m): 48.19  
 T(a): 43.19  
 C/G content: 56.25

## Lampiran 14. Brosur Primer M13 R [Cybergene AB]



**Product specification**

Customer id: Sentra-BD  
 Nancy Kapanow  
 nancy@sentrabd.com  
 Sentra Biosains Dinamika  
 Biotains

*Deliver to:* Sentra BD Ruko Cempelan Mas  
 Bu Liting O-26 Lotjen Suprpto Jakarta 10640  
 Indonesia

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

**General information**  
 Volume: Your oligo is originally dissolved in distilled water, thereafter the absorbance is measured. Your oligo is lyophilized.

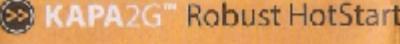
**Storage:** In general oligonucleotides (non-labelled) can be stored for more than a year with little or no degradation. They can be stored in media (such as water, ammonia, 20% acetonitrile, dilute buffer containing EDTA, salt etc.) or as a dry pellet. The most important is to keep them cold to avoid bacterial growth and minimize degradation. Avoid storing oligos in solutions that are mutagenic, oxidizing or outside the pH range of 5-12. If you prefer storing your oligo freeze dried, please note that too many freeze drying cycles might reduce your oligo. Therefore - make aliquots before you dry 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 concerning your oligo, please do not hesitate to contact us. Good luck with your new oligo!

**Oligo Data**

Order number: 39649  
 Lab number: 161387 / 00145783\_36  
 Order date and time: Wed Mar 28 08:46:30 2012  
 Oligo name: M13-R  
 Oligo comment: None  
 Sequence:  
 CAG GAA ACA GCT ATG AC  
 Total length: 17  
 Number modifications: 0  
 Unmodified length: 17  
 5' modification: none  
 3' modification: none  
 Internal modification: none  
 Int. mod. positions: Enter pos. from 5' to 3'  
 Scale: 0.05  
 Purification: Cartridge  
 Delivery: Standard  
 Delivery form: Freeze dried

Unmodified mol weight: 5213.48  
 Modified mol weight: 5213.48  
 Od: 4,7  
 Yield [umol]: 23,1  
 Yield [micro gram]: 120,4  
 Vol. 100pmol/ul: 231 µl  
 T(m): 49,78  
 T(a): 44,78  
 C/G content: 47,05

## Lampiran 15. Technical Data Sheet KAPA 2G Robust Hotstart [Biosystem]



### 1. Product Description

KAPA 2G Robust DNA Polymerase is a high robust, and versatile, accurate and high performing DNA polymerase through a process of molecular evolution. The novel engineered molecule is a KAPA 2G Robust DNA Polymerase after superior performance compared to other of wild-type Taq.

- Robust performance across a wide range of templates, amplicon types and fragment sizes.
- Greatly improved tolerance to a range of common PCR inhibitors.
- Higher yield per unit of enzyme, which often translates into improved sensitivity.

In the hotstart formulation, the enzyme is combined with a proprietary antibody that inactivates the enzyme until the first denaturation step. This eliminates common inhibition problems resulting from non-specific priming events during reaction setup and initiation, and improves overall reaction efficiency.

Three KAPA 2G Buffers and the proprietary additive, KAPA 2G Inhibitor, offer extended optimization options for diverse end applications. Buffer A is specifically formulated for the unique characteristics of the enzyme, and offers increased yield, specificity and sensitivity. Buffer B is recommended for complex containing inhibitors for Colony PCR. The GC Buffer is specifically optimized for GC-rich templates.

KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase has 5' to 3' polymerase and 5' to 3' exonuclease activities, but no 3' to 5' exonuclease (proof-reading) activity. The fidelity of KAPA 2G Robust HotStart is similar to that of wild-type Taq but has an error rate of approximately 1 error per 1.7 x 10<sup>6</sup> nucleotides incorporated.

DNA fragments generated with KAPA 2G Robust HotStart have the same characteristics as those generated with wild-type Taq polymerase and may be used for routine downstream analysis applications including restriction enzyme digestion and sequencing. PCR products generated with KAPA 2G Robust HotStart are A-tailed and may be cloned into TA cloning vectors.

### Technical Data Sheet

Kits components*	Product codes		
	4K	8K	80K
KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase (E-UF-8)	5030	5035	5037
	5832	5816	5818
1x KAPA 2G Buffer A (with MgCl <sub>2</sub> )	1.0 ml	2.0 ml	5.0 ml
1x KAPA 2G Buffer B (with MgCl <sub>2</sub> )	1.0 ml	2.0 ml	5.0 ml
1x KAPA 2G GC Buffer (with MgCl <sub>2</sub> )	0.5 ml	1.0 ml	5.0 ml
2x KAPA Inhibitor (1)	0.5 ml	1.0 ml	5.0 ml
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
dNTP mix (2 mM each)	30 µl	60 µl	100 µl
	100 µl	100 µl	100 µl

\*The kits consist of larger kits possible to be ordered.

### Storage, handling and specifications

Store all components at -20°C for long-term use. Please refer to sections for full details.

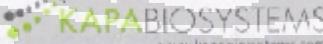
### Quick Notes

- KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase offers robust performance across a wide range of template and amplicon types, increased tolerance to common PCR inhibitors, and higher yields per unit of enzyme.
- Use 30 units of enzyme per 25 µl.
- Use 1.5 units KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase per 25 µl reaction or 1 unit per 25 µl reaction for GC-rich DNA templates.
- The optimized Buffer A, which is without KAPA Inhibitor, is optimized for specificity and sensitivity.
- The Buffer B kit, which contains KAPA Inhibitor, is optimized for Colony PCR.
- The GC Buffer is specifically optimized for GC-rich amplicons and templates.
- The fidelity of KAPA 2G Robust DNA Polymerase is 1.7 errors per 10<sup>6</sup> nucleotides.
- KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase may be used for downstream analysis, e.g., cloning, RFLP, and more sequencing.

### 2. Applications

KAPA 2G Robust HotStart kits are ideal suited for the amplification of DNA fragments up to 5 kb in standard end-point PCR assays from a variety of templates. It is particularly suited for:

- Amplification from templates with high GC or AT content.
- Templates containing common PCR inhibitors, such as SDS or ethanol, or standard inhibitors with long to wild-type Taq.
- Amplification from site templates, e.g., colony PCR.



www.kapabiosystems.com

Version 4.1.1