



UNIVERSITAS INDONESIA

**REKAYASA GEN FRUKTANSUKRASE VERSI
TERPENGKAL DARI PLASMID REKOMBINAN PEMBAWA
GEN *ftf* LENGKAP DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

SKRIPSI

**NETI TRIWINANTI
0806327931**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**REKAYASA GEN FRUKTANSUKRASE VERSI
TERPENGAL DARI PLASMID REKOMBINAN PEMBAWA
GEN *ftf* LENGKAP DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK
*POLYMERASE CHAIN REACTION***

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**NETI TRIWINANTI
0806327931**

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

ii

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, 9 Juli 2012



Neti Triwinanti

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Neti Triwinanti

NPM : 0806327931

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

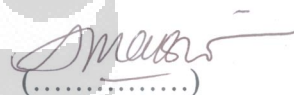
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Neti Triwinanti
NPM : 0806327931
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Rekayasa Gen Fruktansukrase Versi Terpenggal dari Plasmid Rekombinan Pembawa Gen *ftf* Lengkap dengan Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*

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

DEWAN PENGUJI

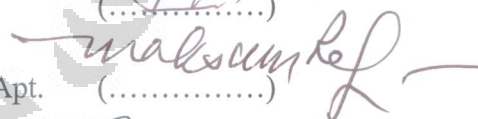
Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, M.Si., Apt.


(.....)

Pembimbing II : Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si., M.Eng.


(.....)

Penguji I : Prof. Maksun Radji, M.Biomed., Ph.D., Apt.


(.....)

Penguji II : Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt.


(.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 17 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil'alamin, puji syukur kepada Allah SWT atas segala karunia, nikmat, dan kasih sayangNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

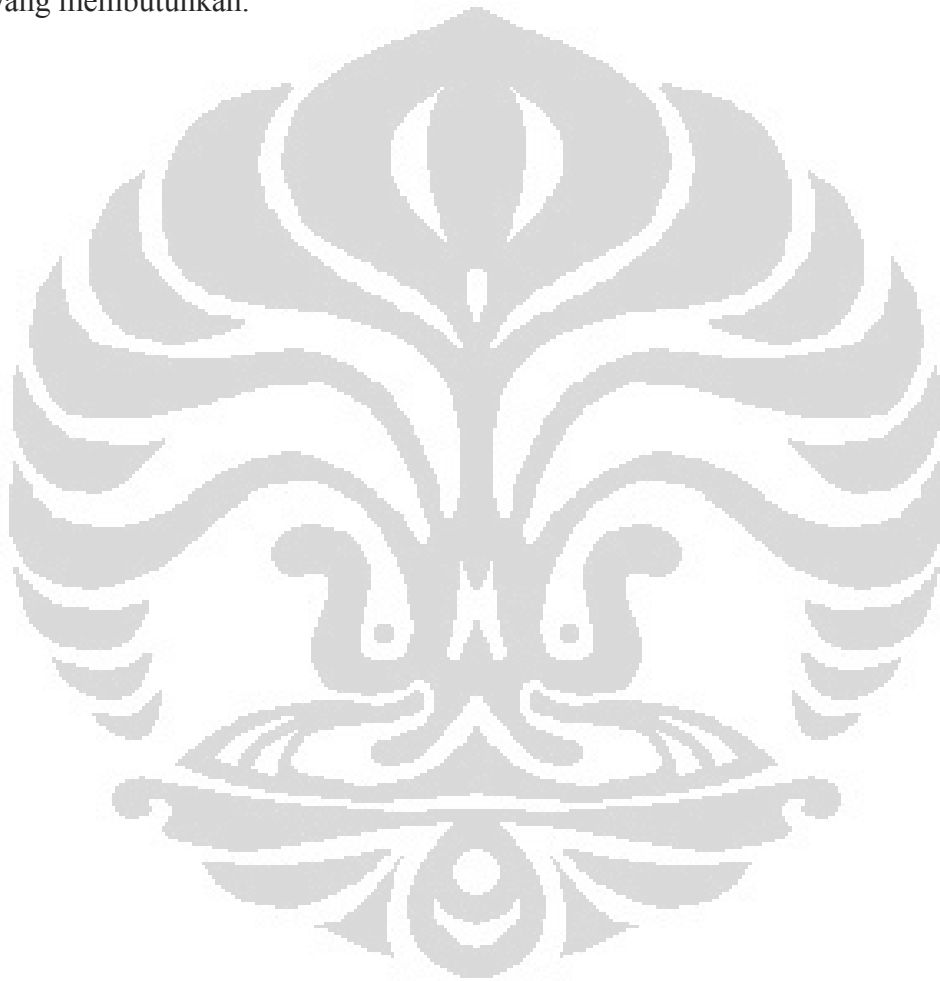
Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak, skripsi ini sulit untuk diselesaikan. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang setulus-tulusnya kepada:

1. Dr. Amarila Malik, M.Si., Apt sebagai pembimbing I dan Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si., M. Eng sebagai pembimbing II atas bimbingan, ilmu, semangat, perhatian, serta dukungan yang sangat bermanfaat bagi penulis selama penelitian.
2. Dr. Amarila Malik, M.Si., Apt atas bantuan dana dan inspirasi luar biasa yang diberikan kepada penulis selama masa penelitian.
3. Prof. Yahdiana Harahap selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis selama masa pendidikan dan penelitian berlangsung.
4. Prof. Effionora Anwar selaku pembimbing akademik yang selalu bersedia memberikan nasihat dan bimbingan selama masa pendidikan.
5. Orang tua tercinta dan kakak-kakak yang selalu memberikan dukungan baik moral maupun material, doa, perhatian, dan kasih sayang.
6. Teman-teman Farmasi 2008; Nisa, Dian, Evelina, Editha, Furqon, Basyar, Ola, Lisa, Meiyani, dan Rahmi yang telah banyak memberikan bantuan selama penelitian.
7. Seluruh staf pengajar, karyawan, dan laboran Departemen Farmasi yang telah banyak sekali membantu penulis selama menyelesaikan masa pendidikan dan penelitian.

8. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan doa hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam skripsi ini, leh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun guna perbaikan di masa mendatang.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang membutuhkan.



Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Neti Triwinanti
NPM : 0806327931
Program Studi : 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 :

Rekayasa Gen Fruktansukrase Versi Terpenggal dari Plasmid Rekombinan Pembawa Gen *fff* Lengkap dengan Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia / formatkan, 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: 9 Juli 2012
Yang menyatakan



(Neti Triwinanti)

ABSTRAK

Nama : Neti Triwinanti
Program Studi : Farmasi
Judul : Rekayasa Gen Fruktansukrase Versi Terpenggal dari Plasmid Rekombinan Pembawa Gen *ftf* Lengkap dengan Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*

Sebagian besar bakteri asam laktat (BAL) menghasilkan eksopolisakarida (biopolimer fruktan) yang mempunyai banyak manfaat dalam industri makanan, kosmetik, kesehatan dan farmasi. Sintesis biopolimer ini melibatkan peran enzim fruktansukrase atau fruktosiltransferase (*ftf*). Rekayasa genetika dapat dilakukan untuk mendapatkan biopolimer yang berkriteria unggul, yaitu biopolimer inulin yang mempunyai derajat polimerisasi tinggi. *Weissella confusa* galur MBFCNC-2(1) telah menjadi sumber gen fruktansukrase yang dikloning lengkap di inang *E. coli* BL21 StarTM. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan klon versi terpenggal dari gen fruktansukrase karena klon gen lengkap dilaporkan mempunyai masalah dalam ekspresinya. Sebagai template untuk kloning digunakan plasmid dari *E. coli* BL21 StarTM rekombinan, plasmid rekombinan pO_*ftf*NS pembawa gen lengkap, dan DNA genomik. PCR dilakukan menggunakan primer FTFdel_Fw dan FTFdel_Rv. Hasil PCR disekuensing dan dianalisis menggunakan BLAST. Sebagai hasil, gen fruktansukrase versi terpenggal didapatkan dari plasmid rekombinan pO_*ftf*NS pembawa gen *ftf* lengkap.

Kata kunci: gen fruktansukrase, biopolimer inulin, PCR, plasmid rekombinan, sekuensing, BLAST.

xiv+88 halaman; 10 gambar; 15 lampiran
Daftar Pustaka : 43 (1983-2012)

ABSTRACT

Name : Neti Triwinanti
Study Program : Pharmacy
Title : Engineering of Truncated Fructansucrase Gene from
Recombinant Plasmid carrying full-length *ftf* Gene by using
Polymerase Chain Reaction Technique

Most of Lactic Acid Bacteria (LAB) produce exopolysaccharide (fructan biopolymer) that has many advantages in food, cosmetic, health, and pharmacy industries. Synthesis of this biopolymer involves the role of fructansucrase enzyme of fructosyltransferase (*ftf*). Genetic engineering could be done to obtain biopolymer with excellence characteristics, that is inulin with high degree of polymerization. *Weisella confusa* strain MBFCNC-2(1) has been used as a source of fructansucrase gene which is full-length cloned at *E. coli* BL21 StarTM. The aim of this study was to obtain truncated gene of fructansucrase because full-length clone has problem on its expression. The PCR template used in this study were plasmid of Recombinant *E. coli* BL21 StarTM, recombinant plasmid pO_*ftf*NS carrying full-length gene, and genomic DNA. PCR was carried out by FTFdel_Fw and FTFdel_Rv primer. The PCR product was sequenced and analyzed by using BLAST. Result revealed that truncated fructansucrase gene was obtained from plasmid recombinant pO_*ftf*NS carrying full-length gene.

Keywords: fructansucrase gene, inulin biopolymer, PCR, recombinan plasmid, sequencing, BLAST.

xiv+88 pages ; 10 pictures; 15 appendixes
Bibliography : 43 (1983-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bakteri Asam Laktat.....	4
2.2 Enzim Fruktansukrase.....	6
2.3 Isolasi Plasmid Metode Alkalin Lisis	8
2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i>	10
2.5 Elektroforesis Gel Agarosa	14
2.6 Kloning Gen.....	16
2.7 Vektor pET Champion™	17
2.8 Teknik Sekuensing DNA.....	18
2.9 Program BLAST	20
3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	22
3.2. Bahan	22
3.2.1 Sampel	22
3.2.2 Medium dan Pembuatan Medium.....	22
3.2.3 Pembuatan Larutan Dapar dan Pereaksi	23
3.2.4 Bahan Kimia.....	26
3.3. Alat	27
3.4. Cara Kerja.....	28
3.4.1. Peremajaan <i>E. coli</i> BL 21 Star™ Rekombinan Pembawa Gen Ukuran Lengkap <i>ftfCNC-2(1)</i>	29
3.4.2. Isolasi DNA Plasmid pAM_ <i>ftfCNC-2(1)</i> dari <i>E. coli</i> BL 21 Star™ Rekombinan dengan Menggunakan <i>Plasmid</i> <i>Isolation Kit PrepEase®</i> MiniSpin.....	29
3.4.3. Peremajaan <i>Weissella confusa</i> MBFCNC-2(1) dari Stok Beku	31
3.4.4. Isolasi DNA Genomik dari <i>Weissella confusa</i> MBFCNC- 2(1)	31
3.4.5. Retransformasi plasmid pO_ <i>ftfNS</i> 1-4	32

3.4.6. Analisis DNA Plasmid Hasil Isolasi dengan Elektroforesis Gel Agarosa.....	33
3.4.7. Polymerase Chain Reaction.....	34
3.4.8. Analisis Amplikon Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa.....	34
3.4.9. Kloning Produk PCR pada vektor pET Champion® 100.....	35
3.4.10. Transformasi ke <i>E. coli</i> BL 21 Star™.....	35
3.4.11. Seleksi Koloni.....	35
3.4.12. PCR Koloni.....	36
3.4.13. Isolasi Plasmid Rekombinan.....	36
3.4.14. Analisis Hasil Kloning dengan Sekuensing.....	37
3.4.13. Analisis Sekuensing DNA dengan BLAST.....	38
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1. Peremajaan <i>E. coli</i> BL21 Star™ Rekombinan Pembawa gen <i>ffnCNC-2(1)</i>	39
4.2. Hasil Isolasi DNA Plasmid pAM_ <i>ffnCNC-2(1)</i>	39
4.3. Hasil Isolasi DNA Genomik <i>Weissella confusa</i> MBFCNC-2(1).....	41
4.4. Hasil Retransformasi Plasmid Rekombinan Pembawa Gen Lengkap	43
4.5. Hasil Pengamatan Plasmid dan DNA Pada Elektroforesis Gel Agarosa.....	45
4.6. Hasil PCR dan Analisis Amplikon Hasil PCR	46
4.7. Hasil Purifikasi Amplikon Hasil PCR.....	48
4.8. Kloning Amplikon Hasil PCR dan Transformasi Plasmid Rekombinan.....	50
4.9. PCR Koloni.....	51
4.10. Sekuensing dan Analisis Hasil Sekuensing dengan BLAST	53
5. KESIMPULAN DAN SARAN	62
5.1. Kesimpulan.....	62
5.2. Saran	62
DAFTAR ACUAN	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Skema Enzim Fruktansukrase	7
Gambar 2.2.	Skema Enzim <i>fffCNC-2(1)</i> dari <i>Weissella confusa</i> MBFCNC-2(1)	7
Gambar 2.3.	Macam-Macam Vektor pET Champion™	17
Gambar 4.1.	<i>E. coli</i> TOP10 Rekombinan hasil retransformasi	44
Gambar 4.2.	Hasil Identifikasi plasmid dan DNA Genomik	46
Gambar 4.3.	Hasil identifikasi gen <i>fff</i> versi terpenggal	48
Gambar 4.4.	Hasil Purifikasi Amplikon PCR dengan menggunakan PrepEase Gel Extraction Kit.....	50
Gambar 4.5.	Hasil identifikasi gen <i>fffCNC-2(1)</i> versi terpenggal pada PCR koloni 1, 3, 4 dan 6 dari cawan B.....	52
Gambar 4.6.	Elektroferogram sampel 1 dengan menggunakan primer universal T7 Forward	54
Gambar 4.7.	Perbandingan sekuens plasmid (sampel 1)-T7Forward dengan sekuens pada <i>GenBank</i>	56
Gambar 4.8.	Perbandingan sekuens plasmid (sampel 1)-T7Forward dengan sekuens pada <i>GenBank</i>	57
Gambar 4.9.	Elektroferogram sampel 3 dengan menggunakan primer FTFdel_Rv	60
Gambar 4.10	Perbandingan sekuens sampel 3 (produk PCR pO_fffNS-4)-FTFdel_Rv dengan sekuens pada <i>GenBank</i>	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Gambar	66
Lampiran 2	<i>Technical Data Sheet</i> KAPA 2G™ Robust HotStart	70
Lampiran 3	OneStep DNA Ladder	71
Lampiran 4	Pembuatan Reagen	73
Lampiran 5	<i>Certificate of Analysis</i> One Shot® <i>Chemically Competent E. coli</i>	77
Lampiran 6	<i>Product Specification</i> FTFdel_Fw	78
Lampiran 7	<i>Product Specification</i> FTFdel_Rv	79
Lampiran 8	<i>Product Specification</i> T7 Forward	80
Lampiran 9	<i>Product Specification</i> T7 Reverse	81
Lampiran 10	Peta Vektor Champion™ pET 100	82
Lampiran 11	Elektroferogram sampel 1 (plasmid) dengan menggunakan primer T7 Reverse	83
Lampiran 12	Elektroferogram sampel 2 dengan menggunakan primer T7 Forward	84
Lampiran 13	Elektroferogram sampel 2 dengan menggunakan primer FTFdel_Rv	85
Lampiran 14	Sekuens gen <i>ftf</i> Lengkap dan terpenggal.....	86
Lampiran 15	Perbandingan sekuens amplikon PCR pO_ <i>ftf</i> NS-4 dengan sekuens pada Gen Bank	77

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sebagian besar bakteri asam laktat (BAL) dapat menghasilkan eksopolisakarida (EPS). Pada umumnya, eksopolisakarida ini dimanfaatkan sebagai agen pengental, emulgator, pemanis, pembentuk gel atau agen pengikat air baik dalam industri makanan maupun dalam bidang kesehatan, kosmetik, dan farmasi. Beberapa oligosakarida tertentu seperti fruktooligosakarida dimanfaatkan sebagai prebiotik (van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen, van Geel-Schutten, 2006).

Eksopolisakarida atau biopolimer fruktan yang mempunyai banyak manfaat adalah levan dan inulin. Sintesis kedua jenis biopolimer fruktan ini merupakan peran dari enzim levansukrase dan inulosukrase yang secara kolektif disebut fruktansukrase (FS) atau fruktosiltransferase (FTFase). Pada industri makanan, inulin digunakan sebagai pengganti lemak dan agen penstabil dalam berbagai produk seperti susu fermentasi, makanan panggang, dan formula bayi. Polimer inulin juga mempunyai potensi sebagai surfaktan (Anwar, Kralj, van der Maarel, Dijkhuizen, 2008).

Potensi lain dari fruktan tipe inulin adalah sebagai penurun kolesterol. Serangkaian studi menunjukkan bahwa inulin mempengaruhi metabolisme lemak terutama melalui mekanisme penurunan kadar trigliserida baik dalam keadaan puasa maupun *postprandial*, serta penurunan kadar triasil gliserol dan kolesterol. Penggunaan inulin sebagai bahan tambahan pada makanan memungkinkan terjadinya penurunan tingkat lipogenesis hati karena adanya penurunan ekspresi gen pengkode enzim lipogenik (Roberfroid, 2005).

Fruktan tipe inulin atau inulin dengan derajat polimerisasi tinggi banyak mendapat perhatian karena efek prebiotik *in vitro*-nya. Selain itu, inulin dengan derajat polimerisasi tinggi ini juga mempunyai sifat fisikokimia yang bisa dijadikan sebagai protektan protein rekombinan. Sifat fisiko kimia ini antara lain: temperatur *glass transition* yang tinggi, tidak higroskopik, mempunyai laju

kristalisasi yang rendah, dan tidak mengandung gugus pereduksi (Hinrich, Prinsen, Frijlink, 2000).

Dari penelitian sebelumnya telah berhasil diklon gen *fff* tipe inulosukrase berukuran lengkap ke dalam inang *E. coli* yang diisolasi dari bakteri asam laktat lokal *Weissella confusa* MBFCNC-2(1). Namun setelah dipelajari ekspresi dan karakterisasinya, protein rekombinan fruktansukrase ini bersifat tidak stabil dan hanya mempunyai aktivitas yang rendah terhadap substrat rafinosa tetapi tidak mempunyai aktifitas terhadap substrat sukrosa (Malik, 2012). Pada penelitian lain juga dilaporkan bahwa kloning gen *fff* versi lengkap dari *Lactobacillus reuteri* 121 pada inang *E. coli* mengalami masalah pada ekspresi (Anwar, Kralj, van der Maarel, Dijkhuizen, 2008).

Berdasarkan informasi tersebut maka dalam penelitian ini akan dilakukan kloning gen *fff* versi terpenggal. Pada penelitian sebelumnya, kloning gen versi terpenggal dari *Lactobacillus reuteri* galur 121 berhasil diekspresikan pada *E. coli* (van Hijum, van Geel-Schutten, Rahaoui, van der Maarel, Dijkhuizen, 2002). Kloning gen versi terpenggal dari *inuJ* (gen *fff* dari *Lactobacillus johnsonii*) juga mempunyai level ekspresi yang tinggi pada *E. coli* (Anwar, Kralj, van der Maarel, Dijkhuizen, 2008).

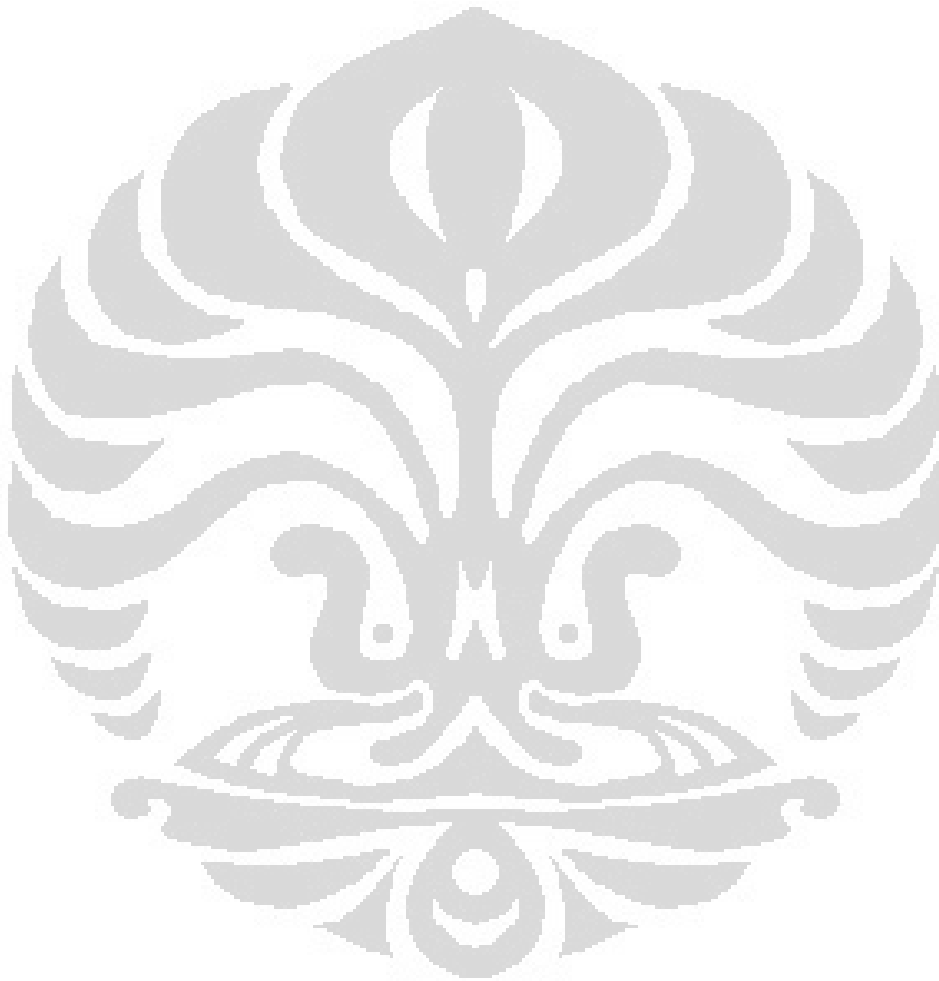
Pada penelitian ini, sumber gen yang digunakan adalah plasmid pAM_fffCNC-2(1) dari *E. coli* BL21 StarTM rekombinan yang disimpan sebagai stok beku, DNA genomik *Weissella confusa* MBFCNC-2(1), serta plasmid pO_fffNS yang diretransformasikan ke inang *E. coli* TOP10. Metode kloning dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer yang dirancang sedemikian rupa sehingga hanya mengkode asam amino awal sampai dengan bagian tanpa sekuens *LPXTG-motif cell wall anchor domain*. Sehingga secara keseluruhan asam amino yang dikode meliputi daerah *signal sequence*, variabel ujung-N, seluruh ranah katalitik lengkap, dan sepenggal ranah ujung-C. Gen *fff* yang digunakan berasal dari hasil penelitian sebelumnya dengan panjang total 3.534 bp (Malik, komunikasi pribadi, 2012).

E. coli rekombinan pembawa gen *fff* versi terpenggal ini kemudian dapat dipelajari ekspresinya, dikarakterisasi, serta dianalisis terhadap protein

rekombinannya. Klon gen *fff* terpenggal diharapkan dapat diperoleh dan kemudian dapat diekspresikan sebagai protein aktif pada penelitian selanjutnya.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan gen fruktansukrase versi terpenggal dari plasmid rekombinan pembawa gen *fff* lengkap dengan menggunakan teknik PCR.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) termasuk dalam kelompok bakteri gram positif. Karakteristiknya antara lain: tidak membentuk spora, nonaerobik tetapi aerotoleran, katalase negatif, toleran terhadap asam, berbentuk kokus atau batang, serta memproduksi asam laktat sebagai produk akhir utama selama fermentasi karbohidrat (Salminen Ed, 1998).

Produksi eksopolisakarida oleh bakteri asam laktat telah dipelajari secara ekstensif pada beberapa dekade terakhir. Berdasarkan sifat bakteri asam laktat yang non patogen dan mempunyai status GRAS (Generally Recognized as Safe) maka mungkin dilakukan produksi eksopolisakarida secara *in situ* pada berbagai produk makanan (misal keju dan *yoghurt*). Meningkatnya perhatian industri makanan pada hal tersebut menyebabkan peningkatan permintaan eksopolisakarida yang *tailor made* (Meulen et al., 2007).

Spesies bakteri asam laktat antara lain *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, dan *Leuconostoc*. Berdasarkan perspektif biokimia, bakteri asam laktat tergolong baik dalam homofermenter maupun heterofermenter. Homofermenter karena bakteri ini terutama menghasilkan asam laktat, dan heterofermenter karena juga menghasilkan berbagai produk fermentasi seperti asam asetat, etanol, karbon dioksida, dan asam formiat (Mozzi, Raya, Vignolo Ed, 2010).

Bakteri asam laktat ditemukan dalam berbagai lingkungan kaya makanan seperti susu dan produk ternak, sayur-sayuran, tanaman, sereal, dan daging serta produknya. Banyak spesies bakteri ini digunakan untuk manufaktur dan pengawet pada makanan fermentasi dan makanan yang berasal dari bahan mentah, dimana bakteri ini muncul sebagai kontaminan atau secara sengaja ditambahkan sebagai starter untuk mengontrol fermentasi. Aktivitas enzimatik dari bakteri asam laktat berkontribusi dalam sifat akhir produk fermentasi, baik secara organoleptis, reologis, dan nutrisi. Spesies bakteri asam laktat biasanya ditemukan sebagai mikrobiota tetap pada saluran gastrointestinal manusia dan hewan. Pada

lingkungan ini, bakteri asam laktat mempunyai peran yang esensial, diantaranya adalah sebagai imunomodulator, penguat intestin, dan daya tahan terhadap patogen. Karena hal inilah beberapa galur bakteri asam laktat secara tradisional digunakan sebagai prebiotik dan ditambahkan sebagai bakteri fungsional pada komoditi makanan (Mozzi, Raya, Vignolo Ed, 2010).

Gula merupakan karbon primer dan sumber energi bagi bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada substrat untuk makanan fermentasi seperti halnya pada media di laboratorium. Berbagai sistem transpor yang berbeda terlibat dalam pengambilan karbohidrat, termasuk sistem PTS (*Phospo Transferase*), ABC (*ATP-Binding Cassette*), dan transporter Glikosida-Pentosida. Sebelum pengambilan, polisakarida harus dihidrolisis dahulu. Misalnya, tepung dihidrolisis oleh amilase menjadi dekstrin, yang kemudian dihidrolisis lagi oleh aktivitas ekstraseluler menjadi maltosa. Monosakarida yang memasuki sel atau yang dibebaskan di sitoplasma oleh hidrolisis disakarida memasuki proses glikolisis pada level glukosa-6P (G6P) atau diproses oleh jalur Leloir. Pada banyak galur *Streptococcus thermophilus*, hanya separuh laktosa yang difermentasi, sedangkan separuh galaktosa diekskresikan ke media sebagai hasil transkripsi yang lemah dari promoter *gal* atau mutasi pada gen Leloir. Pada *Lactobacillus lactis*, laktosa yang ditransportasikan oleh sistem PTS dihidrolisis dan separuh galaktosa -6P ditransformasikan oleh jalur tagatosa, memasuki glikolisis pada level triosa fosfat (Mozzi, Raya, Vignolo Ed, 2010).

Bakteri asam laktat homofermentatif (*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, dan beberapa spesies *Lactobacillus*) memfermentasi gula melalui jalur EMP (Embden-Meyerhoff-Parnas) menjadi piruvat, yang dikonversi menjadi asam laktat oleh laktat dehidrogenase. Di bawah kondisi tertentu misalnya keterbatasan karbon, metabolisme homolaktat dapat berubah menjadi metabolisme campuran-asam. Tipe heterofermentasi ini ditandai oleh produksi asam formiat, asetat, etanol, dan atau karbon dioksida disamping asam laktat (Mozzi, Raya, Vignolo Ed, 2010).

2.2. Enzim Fruktansukrase

Enzim levansukrase dan inulosukrase secara kolektif disebut enzim fruktansukrase (FS) atau fruktosiltransferase (FTFase). Enzim ini mempolimerisasi separuh fruktosa dari substrat sukrosa menjadi fruktan yang mempunyai struktur levan atau inulin dengan ikatan $\beta(2-6)$ dan $\beta(2-1)$ secara berturut-turut (Anwar, Kralj, Pique, Leemhuis, van der Maarel, Dijkhuizen, 2010).

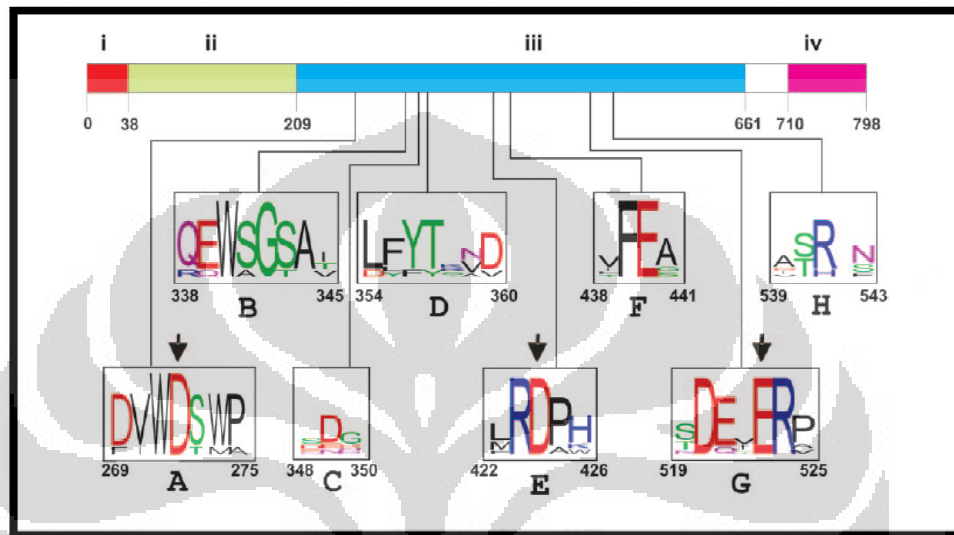
Enzim inulosukrase dihasilkan secara eksklusif oleh bakteri asam laktat (BAL), sedangkan levansukrase tersebar luas pada bakteri gram positif dan gram negatif. Contoh bakteri penghasil levan adalah streptococci, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus reuteri* 121, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, dan *Weissella confusa*. Sedangkan bakteri penghasil inulin antara lain *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, dan *Lactobacillus reuteri* (van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen, van Geel-Schutten, 2006; Monsan, Bozonnet, Albenne, Joucle, Willemot, Remaud-Simeon, 2001).

Enzim fruktansukrase mempunyai dua aktivitas yaitu hidrolase dan transferase. Aktivitas hidrolase menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, sedangkan aktivitas transferase mengkatalisis transfer sebagian fruktosa dari sukrosa ke akseptor fruktosil untuk menghasilkan FOS atau fruktan dengan berat molekul tinggi (Tieking et al., 2005). Enzim fruktansukrase memotong ikatan glikosidik dari substrat sukrosa (dan beberapa dari raffinosa) dan menggunakan energi yang dilepaskan untuk menggabungkan satu unit fruktosa ke rantai fruktan yang berkembang (transfruktosilasi), ke sukrosa, ke air (hidrolisis), atau ke akseptor lain seperti raffinosa (van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen, van Geel-Schutten, 2006).

Masa molekul dari fruktan yang diproduksi menunjukkan variasi yang cukup besar, dari 2×10^4 hingga 50×10^6 Da. Ada beberapa laporan bahwa masa molekul fruktan bergantung pada kondisi pertumbuhan dan inkubasi seperti temperatur, salinitas, dan konsentrasi sukrosa yang digunakan (van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen, van Geel-Schutten, 2006).

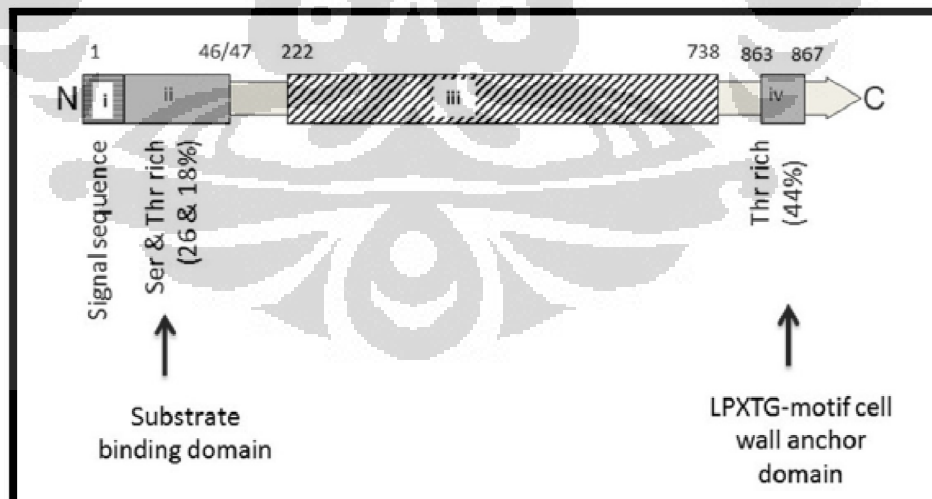
Berdasarkan sekuen rantai asam amino, keseluruhan struktur dari fruktansukrase dibagi menjadi empat bagian, yaitu: (i) *signal peptide* atau *signal*

sequence (ii) terminal-N yang panjangnya bervariasi, (iii) inti katalitik, (iv) terminal-C yang panjangnya bervariasi (van Hijum et al., 2006). Skema enzim fruktansukrase dari bakteri asam laktat secara umum dapat dilihat pada gambar 2.1, sedangkan skema enzim fruktansukrase yang berasal dari *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) dapat dilihat pada gambar 2.2.



Sumber: Microbiology and Molecular Biology Reviews, hal 168

Gambar 2.1. Skema enzim Fruktansukrase



Sumber: AsPac J. Mol. Biomol. Biotechnol. 2012

Gambar 2.2. Skema enzim *ffc*CNC-2(1) dari *Weissella confusa* MBFCNC-2(1)

Bagian (i) merupakan *signal sequence* yang digunakan untuk ekskresi enzim karena fruktansukrase merupakan enzim ekstraseluler. Bagian (ii) merupakan terminal-N yang kaya akan asam amino Serin dan Threonin (berturut-turut 26 dan 18%). Bagian ini berfungsi sebagai tempat ikatan enzim dengan substrat. Bagian (iii) merupakan ranah katalitik (domain aktif), dan bagian (iv) merupakan terminal-C yang berikatan dengan domain *cell wall anchor*.

2.3. Isolasi Plasmid Metode Alkalin Lisis

Ekstraksi plasmid DNA dengan menggunakan metode alkalin lisis relatif sederhana dan mampu menghasilkan plasmid yang cukup murni untuk didigesti menggunakan enzim restriksi. Prinsip metode ini adalah alkalin selektif dari denaturasi DNA kromosomal berbobot molekul tinggi, sedangkan *covalently closed circular* DNA tetap berbentuk untai ganda (tidak terdenaturasi) (Doly, Bimboim, 1979). Secara umum, metode ini terdiri atas 5 langkah, yaitu kultur sel dan pemanenan; resuspensi; lisis; netralisasi; serta pembersihan.

Pengkulturan sel merupakan langkah pertama dalam isolasi plasmid. Ketika pertumbuhan bakteri yang cukup sudah tercapai, pellet sel diambil dengan cara sentrifugasi sehingga terpisah dari mediumnya (Nick, 2007).

Resuspensi pellet sel dilakukan dengan larutan (biasanya disebut larutan 1, atau sejenisnya dalam kit) yang mengandung Tris, EDTA, glukosa, dan RNase A. kation divalen seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} sangat penting untuk aktivitas DNase dan integritas dinding sel bakteri. EDTA mengkelat ion divalen dalam larutan sehingga mencegah DNase dari kerusakan plasmid dan juga membantu mendestabilisasi dinding sel. Glukosa menjaga tekanan osmosis sehingga sel tidak pecah, sedangkan RNase A berfungsi untuk mendegradasi RNA seluler ketika lisis (Nick, 2007).

Buffer lisis sering disebut dengan larutan 2 mengandung NaOH dan detergen SDS (Sodium Dodesil Sulfat). SDS berfungsi untuk melarutkan membran sel. NaOH membantu memecah dinding sel. Namun yang lebih penting, NaOH ini mengganggu ikatan hidrogen antara basa-basa DNA, mengubah untai ganda DNA (dsDNA); baik DNA genomik (DNA kromosomal) maupun plasmid, menjadi untai tunggal DNA (ssDNA) dalam sel. Proses ini disebut dengan

denaturasi dan merupakan bagian sentral dari prosedur secara keseluruhan, sehingga metode ini disebut alkalin lisis. SDS juga mendenaturasi sebagian besar protein sel, yang membantu proses pemisahan protein dari plasmid pada langkah selanjutnya (Nick, 2007).

Netralisasi dilakukan dengan penambahan Kalium Asetat (larutan 3). Penambahan larutan ini akan menurunkan tingkat kebasaaan campuran. Dibawah kondisi tersebut, ikatan hidrogen antara basa-basa pada untai tunggal DNA dapat kembali terbentuk, sehingga ssDNA dapat berenaturasi menjadi dsDNA. Tahap ini adalah bagian yang selektif. Renaturasi mudah terjadi pada plasmid DNA yang kecil dan sirkular, sedangkan DNA genomik berukuran sangat besar sehingga tidak mungkin melekat kembali secara tepat. Oleh karena itu, pencampuran secara hati-hati sangatlah penting. Pengocokan dengan vortex akan menyebabkan DNA genomik patah dan menghasilkan patahan-patahan yang lebih pendek yang dapat terenaturasi sehingga mengkontaminasi plasmid (Nick, 2007).

Plasmid untai ganda mudah terlarut dalam larutan, sedangkan untai tunggal DNA genomik, SDS, dan protein sel yang terdenaturasi melekat bersama melalui interaksi hidrofobik untuk membentuk flokulat putih. Flokulat ini dapat dengan mudah dipisahkan dari larutan plasmid DNA dengan sentrifugasi (Nick, 2007).

Plasmid telah dipisahkan dari sebagian besar debris sel tetapi terdapat pada larutan yang mengandung banyak garam, EDTA, RNase, dan residu protein sel sehingga tidak dapat langsung digunakan. Langkah selanjutnya adalah membersihkan larutan dan mengkonsentrasikan plasmid DNA.

Pada kit isolasi plasmid, cara umum yang digunakan adalah dengan menggunakan kolom silika. Metode ini menawarkan proses yang mudah untuk membersihkan DNA plasmid. Prinsipnya adalah penambahan garam *chaotropic* ke dalam sampel untuk mendenaturasi untai ganda DNA dengan cara mengganggu ikatan hidrogen antar basa. Dibawah kondisi ini, DNA akan secara selektif terikat pada resin silika pada kolom, yang memungkinkan DNA tersebut terpisah dari sisa sampel. Setelah pencucian, DNA dielusikan dari kolom dengan larutan rendah garam yang memungkinkan terjadinya renaturasi DNA, menyebabkan DNA tersebut kehilangan afinitas terhadap silika (Nick, 2007).

Keuntungan metode ini terdapat pada segi kenyamanan, relatif cepat, dan pengguna dapat memproses sampel dalam jumlah besar. Sedangkan kekurangannya adalah cukup mahal dan terkadang garam *chaotropic* masih terbawa pada plasmid (Nick, 2007).

2.4. Polymerase Chain Reaction

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan suatu metode *in vitro* untuk mengamplifikasi DNA yang diperkenalkan sejak tahun 1985. PCR dapat dianggap sebagai versi sederhana dari proses replikasi DNA yang terjadi pada saat pembelahan sel. Teknik PCR dasar terdiri dari tiga tahapan, yaitu: denaturasi, *annealing*, dan perpanjangan (*extension*). Siklus tiga tahap ini dapat diulang hingga berkali-kali (Lo Ed, 1998).

Proses denaturasi akan memisahkan DNA cetakan yang berutas ganda menjadi utas tunggal. Semakin panjang molekul DNA, waktu denaturasi yang diperlukan semakin lama. Proses denaturasi dilakukan dengan cara pemanasan DNA pada temperatur 90° - 95° C selama sekitar 1 menit (Sambrook et al., 1998).

Temperatur pada tahap *annealing* sangatlah kritis. Jika temperatur terlalu tinggi, pelekatan primer oligonukleotida akan buruk. Sedangkan jika temperatur terlalu rendah, pelekatan primer yang tidak spesifik mungkin terjadi, sehingga muncul amplifikasi sekuens yang tidak diinginkan (Sambrook et al., 1989). Temperatur dan jangka waktu yang dibutuhkan untuk *annealing* bergantung pada komposisi basa, serta panjang dan konsentrasi primer. Untuk primer dengan 18-30 basa yang sekitar 50%-nya mengandung GC, *annealing* baik dilakukan pada temperatur 55° C selama 1-2 menit (Lo Ed, 1998).

Tahap perpanjangan primer biasanya dilakukan pada suhu 72° C. Suhu ini mendekati temperatur optimum dari enzim *Taq Polymerase*. Jangka waktu 1 menit pada umumnya cukup untuk produk dengan panjang mencapai 2 kb (Lo Ed, 1998).

Komponen dasar yang penting dalam proses PCR antara lain (Sambrook et al., 1989) :

- a. Enzim DNA polimerase yang termostabil, yang berfungsi untuk mengkatalisis sintesis DNA yang bergantung pada *template*. Pada saat ini

terdapat banyak pilihan enzim yang tersedia dalam berbagai variasi *fidelity*, efisiensi, dan kemampuan untuk menghasilkan produk DNA ukuran besar. Hingga saat ini enzim *Taq Polymerase* masih menjadi pilihan untuk PCR pada umumnya.

- b. Sepasang Primer oligonukleotida, yaitu segmen DNA utas tunggal yang menentukan bagian awal dan akhir daerah yang diamplifikasi. Desain primer ini merupakan faktor yang sangat menentukan efisiensi dan spesifitas reaksi amplifikasi. Desain yang tepat diperlukan untuk mendapatkan produk yang diinginkan, menekan amplifikasi sekuens yang tidak diinginkan, dan memfasilitasi manipulasi subsekuens dari produk amplifikasi.
- c. Deoksinukleosida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP. dNTP ini digunakan untuk membentuk DNA baru.
- d. Larutan buffer untuk menjaga pH.
- e. DNA cetakan (*template DNA*), yaitu fragmen DNA yang mengandung sekuens target yang akan diamplifikasi.

PCR sangat sensitif dan tidak diragukan lagi bahwa tidak ada satu protokol pun yang sesuai untuk semua kondisi. Oleh karena itu, setiap aplikasi PCR membutuhkan optimasi. Beberapa masalah yang mungkin dijumpai dalam PCR antara lain: produk tidak terdeteksi atau hasil yang rendah; munculnya pita yang tidak spesifik karena *mispriming* atau *misextension* dari primer; pembentukan dimer primer sehingga terjadi kompetisi untuk amplifikasi dengan produk yang diinginkan; dan mutasi karena *misincorporation* (Innis, Michael A., Gelfand, David H., 1990).

Beberapa parameter yang dapat dioptimasi adalah sebagai berikut (Innis, Michael A., Gelfand, David H., 1990):

2.4.1. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim *Taq* Polimerase yang disarankan berkisar antara 1 hingga 2,5 unit per 100 μ L reaksi ketika parameter lain sudah optimum. Akan tetapi kebutuhan enzim mungkin bervariasi sehubungan dengan cetakan target dan primer. Jika konsentrasi enzim terlalu tinggi, mungkin terbentuk *background* non spesifik, sedangkan jika terlalu rendah produk yang dihasilkan akan sangat sedikit.

2.4.2. Deoksinukleotida Trifosfat

Larutan deoksinukleotida trifosfat (dNTP) harus dinetralkan hingga pH 7,0 dan konsentrasinya harus ditentukan secara spektrofotometri. Stok primer dilarutkan hingga 10 mM dan disimpan dalam suhu -20°C . Stok kerja yang mengandung 1 mM dari tiap dNTP cukup direkomendasikan.

Empat jenis dNTP harus digunakan dalam konsentrasi yang seimbang untuk meminimalkan eror (*misincorporation*). Spesifitas dan ketepatan PCR ditingkatkan dengan menggunakan konsentrasi dNTP yang lebih rendah. Konsentrasi dNTP yang rendah meminimalisasi *mispriming* pada situs non target. Seseorang harus menentukan batas terendah konsentrasi dNTP yang sesuai untuk panjang dan komposisi sekuens target, misalnya 20 μM tiap dNTP pada 100 μL reaksi secara teoritis cukup untuk mensintesis 2,6 μg DNA atau 10 pmol sekuens berukuran 400 bp. Belakangan ini penggunaan dNTP konsentrasi rendah dan seragam (masing-masing 2 μM) memungkinkan amplifikasi yang sangat sensitif dan spesifik.

2.4.3. Konsentrasi Magnesium

Konsentrasi ion magnesium sangat penting untuk dioptimasi. Konsentrasi magnesium dapat berpengaruh pada: pelekatan primer, spesifitas produk, dan aktivitas enzim serta ketelitiannya. Perlu diingat bahwa keberadaan EDTA atau agen pengkelat lainnya pada stok primer atau cetakan DNA dapat mengganggu keberadaan magnesium optimal.

2.4.4. Komponen Reaksi Lain

Buffer PCR yang direkomendasikan adalah Tris HCl 10-50 mM pH berkisar antara 8,3 dan 8,8 ketika diukur pada suhu 20°C ; tetapi survey terhadap buffer secara ekstensif belum pernah dilaporkan.

KCl hingga konsentrasi 50 mM dapat dimasukkan ke dalam reaksi untuk memfasilitasi pelekatan primer. NaCl 50 mM atau KCl diatas 50 mM akan menghambat aktivitas *Taq* DNA Polimerase.

2.4.5. Pelekatan Primer

Suhu dan jangka waktu yang dibutuhkan untuk pelekatan primer bergantung pada komposisi dasar, panjang, dan konsentrasi primer. Suhu pelekatan pada kisaran 55-72⁰C biasanya menunjukkan hasil yang terbaik. Kenaikan suhu pelekatan akan mempertinggi spesifitas tempat penempelan primer sehingga mengurangi kesalahan perpanjangan. Untuk spesifitas maksimum pada siklus awal, *taq* DNA polimerase dapat ditambahkan setelah tahap denaturasi pertama selama tahap pelekatan.

2.4.6. Perpanjangan primer

Waktu perpanjangan bergantung pada panjang dan konsentrasi sekuens target dan temperatur. Perpanjangan primer pada umumnya dilakukan pada suhu 72⁰C. Perkiraan laju penggabungan nukleotida bervariasi dari 35-100 nukleotida per detik bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan sifat cetakan DNA. Waktu perpanjangan selama 1 menit pada suhu 72⁰C dianggap cukup untuk menghasilkan produk dengan panjang hingga 2 kbp. Tetapi, waktu perpanjangan yang lebih lama mungkin akan membantu pada siklus awal jika konsentrasi substrat sangat rendah, dan pada siklus akhir jika konsentrasi produk melebihi konsentrasi enzim.

2.4.7. Suhu dan Waktu Denaturasi

Penyebab paling umum kegagalan PCR adalah denaturasi yang tidak lengkap dari cetakan target dan/ atau produk PCR. Kondisi denaturasi yang khas adalah 95⁰C selama 30 detik atau 97⁰C selama 15 detik; tetapi, suhu yang lebih tinggi bisa sesuai, khususnya untuk target yang kaya GC. Proses denaturasi yang tidak lengkap atau tidak sempurna akan menyebabkan untai DNA kembalimelekat sehingga mengurangi produk. Sebaliknya, tahap denaturasi yang terlalu panjang akan menyebabkan penghilangan aktivitas enzim. Waktu paruh aktivitas enzim *taq* polimerase secara berturut-turut pada suhu 92,5; 95; dan 97,5⁰C adalah >2 jam; 40 menit; dan 5 menit.

2.4.8. Jumlah Siklus

Jumlah siklus optimum bergantung terutama pada konsentrasi awal target DNA ketika parameter-parameter lain sudah dioptimasi. Kesalahan umum yang sering dilakukan adalah terlalu banyak jumlah siklus. Jumlah siklus berlebih dapat meningkatkan jumlah dan kompleksitas dari produk *background* nonspesifik. Sedangkan jumlah siklus yang terlalu sedikit memberikan produk yang sedikit juga.

2.4.9. Primer

Konsentrasi optimal primer biasanya berkisar antara 0,1 hingga 0,5 μL . Konsentrasi primer yang lebih tinggi mungkin menyebabkan *mispriming* dan akumulasi produk yang tidak spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuknya dimer. Produk nonspesifik dan dimer primer itu sendiri merupakan substrat untuk PCR dan berkompetisi dengan produk yang diinginkan untuk mendapatkan enzim, dNTP, dan primer, sehingga produk PCR yang diinginkan lebih sedikit.

2.5. Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis merupakan metode standar untuk menganalisis, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA atau RNA yang berbeda ukuran, muatan, atau konformasi. Ketika ditempatkan pada daerah bermuatan listrik, molekul yang bermuatan akan bermigrasi menuju kutub positif atau negatif bergantung pada muatannya. Berbeda dengan protein yang bisa memiliki baik muatan positif maupun negatif, asam nukleat mempunyai muatan negatif yang konstan sehubungan dengan rantai fosfat yang dimiliki pada *backbone*. Asam nukleat ini akan bermigrasi menuju anoda (Allison, 2007).

Agarosa adalah polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut (Allison, 2007). Agarosa mempunyai kemurnian tinggi dan tersedia dalam berbagai *grade* dengan variasi level elektroendosmosis, temperatur leleh, kekuatan gel, dan kejernihan (Amersham Biosciences, 1998). Agarosa membentuk gel karena adanya ikatan hidrogen ketika berada dalam larutan dingin. Ukuran pori gel ini bergantung pada konsentrasi agarosa.

Elektroforesis gel agarosa mampu memisahkan molekul DNA berdasarkan ukuran dan menjadikan molekul DNA ini tampak dengan menggunakan pewarna fluoresensi yaitu etidium bromida. Metode ini cepat dan sederhana, mempunyai resolusi tinggi, dan sensitif sehingga sampel yang diperlukan hanya sedikit (Walker Ed, 1984).

Ketika molekul DNA digerakkan melalui gel dengan adanya gaya elektrik yang stabil, kecepatan pergerakan molekul ini hampir sepenuhnya bergantung pada ukuran molekul. Ukuran molekul terkecil akan mempunyai mobilitas paling tinggi, dan molekul besar secara virtual *immobile* pada konsentrasi gel yang tinggi. Oleh karena itu konsentrasi gel harus disesuaikan dengan *range* ukuran molekul yang akan dipisahkan. Gel yang mengandung 0.3% agarosa akan memisahkan DNA untai ganda linear yang berukuran antara 5 hingga 60 kb (Walker Ed, 1984).

Laju migrasi molekul DNA pada gel agarosa dipengaruhi oleh faktor-faktor berikut (Sambrook et al., 1989):

- a. Ukuran molekul DNA, dimana molekul DNA yang lebih besar akan bergerak lebih lambat dibanding molekul DNA yang lebih kecil. Hal ini disebabkan karena gaya friksi yang lebih tinggi pada molekul DNA yang besar.
- b. Konsentrasi agarosa, dimana terdapat hubungan linear antara log dari mobilitas elektroforesis DNA dengan konsentrasi gel.
- c. Konformasi DNA, dimana terdapat perbedaan kecepatan migrasi antara bentuk DNA sirkular superhelik, sirkular nick, dan linear. Pada beberapa kondisi, bentuk DNA sirkular superhelik bermigrasi lebih cepat dibandingkan bentuk linear, tetapi pada kondisi lain, keadaan ini bisa berbalik.
- d. Adanya Etidium Bromida, dimana peningkatan etidium bromida akan menyebabkan penurunan muatan negatif dari DNA untai ganda dan meningkatkan kekakuan serta panjang DNA tersebut.
- e. Tegangan yang digunakan, dimana pada tegangan rendah migrasi fragmen DNA yang linear proporsional terhadap tegangan yang digunakan. Namun ketika kekuatan medan elektrik dinaikkan, mobilitas fragmen yang mempunyai bobot molekul tinggi akan meningkat. Oleh karena itu, efektivitas pemisahan gel agarosa menurun ketika tegangan dinaikkan.

- f. Tipe agarosa, dimana terdapat dua kelas utama agarosa, yaitu agarosa standar dan agarosa bertitik leleh rendah.
- g. Buffer elektroforesis, dimana mobilitas DNA dipengaruhi oleh komposisi dan kekuatan ion pada buffer elektroforesis.

2.6. Kloning Gen

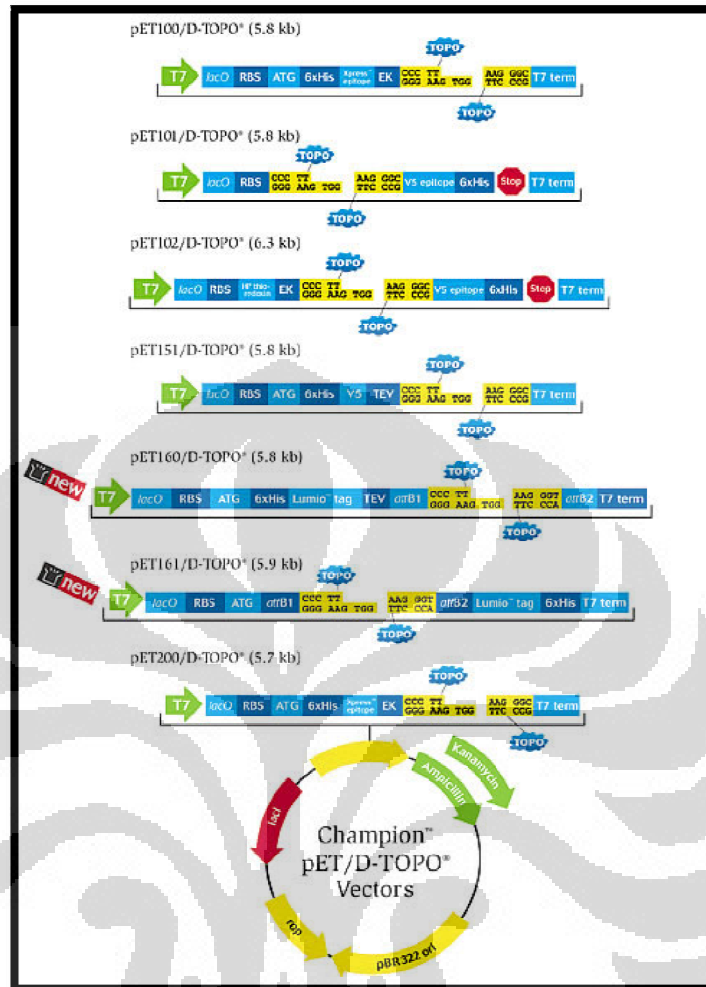
Kloning gen pada dasarnya merupakan penyisipan potongan DNA asing yang spesifik ke dalam sel sehingga DNA yang disisipkan direplikasi dan diturunkan kepada sel anak selama pembelahan sel. Langkah utama dari kloning gen ini adalah sebagai berikut (Trevan, 1987):

- a. Isolasi gen (atau bagian DNA lain) yang akan dikloning.
- b. Penyisipan gen ke dalam bagian DNA lain yang disebut dengan vektor. Vektor yang digunakan dapat berupa plasmid, DNA viral, atau cosmid.
- c. Transfer vektor rekombinan ke dalam sel bakteri, baik melalui transformasi atau infeksi menggunakan virus.
- d. Seleksi sel yang mengandung vektor rekombinan.
- e. Penumbuhan bakteri sebanyak yang dibutuhkan.

Isolat DNA/ fragmen DNA yang akan dikloning ini tidak cukup jika hanya ditransfer langsung pada sel bakteri dengan harapan DNA ini akan bereplikasi sejalan dengan DNA asli sel. Oleh karena itu, DNA perlu dilekatkan pada fragmen DNA lain yang mengandung *origin of replication*, contohnya adalah plasmid. Plasmid merupakan molekul sirkular kecil yang terpisah dari DNA kromosomal utama (Trevan, 1987).

Sebelum diperbanyak menggunakan kloning, DNA rekombinan harus dibawa oleh sel bakteri inang yang sesuai. Proses ini disebut dengan transformasi, yaitu proses dimana DNA asing diambil oleh sel inang dan gen yang dikode didalamnya diekspresikan (Li, Anderson, Yang, Lin, Yang, 2007). Pada proses transformasi, biasanya digunakan galur *E. coli* yang kehilangan sistem restriksi. Sel ini harus dibuat kompeten terlebih dahulu. Metode yang sering dilakukan adalah inkubasi dengan CaCl_2 pada temperatur rendah setelah penambahan DNA. *Heat shock* ringan akan menyebabkan pengambilan DNA (Trevan, 1987).

2.7. Vektor pET Champion™



Sumber: Invitrogen

Gambar 2.3. Macam-macam Vektor pET Champion™

Beberapa elemen penyusun yang penting pada vektor pET Champion™ antara lain (Invitrogen, 2006):

- Ampicillin resistance gene* untuk seleksi pada *E. coli*
- pBR322 ori*
- lacI gene* yang mengkode *lac* repressor untuk mengurangi transkripsi basal dari promoter *T7lac* pada vektor dan dari promoter *lacUV5* pada kromosom inang *E. coli*
- promoter transkripsi *T7lac* untuk ekspresi dengan level tinggi dan IPTG-inducible pada *E. coli*.

- e. TOPO[®] *cloning site* yang memungkinkan terjadinya kloning dari produk PCR untuk kemudian diekspresikan pada *E. coli*.
- f. Terminal-N atau terminal-C untuk deteksi dan purifikasi protein rekombinan.
- g. Terminal-N His-Patch thioredoxin untuk meningkatkan efisiensi translasi dan kelarutan protein heterolog (hanya terdapat pada pET 102/ D-TOPO[®])

Sistem ekspresi pET Champion[™] dikontrol oleh promoter bakteriofag T7 yang telah dimodifikasi sehingga mengandung sekuens *lac* operator (Invitrogen, 2005). RNA polimerase T7 secara spesifik mengenali daerah promoter T7 sehingga level transkripsinya tinggi (Blaber, 1998).

RNA Polimerase T7 berasal dari inang *E. coli* BL 21 Star[™]. Ketika produksinya mencukupi, RNA polimerase T7 akan berikatan dengan promoter T7 dan mentranskripsi gen yang diinginkan (*gene of interest*). *E. coli* BL 21 Star[™] membawa *DE3 bacteriophage lambda lysogen* (λ DE3) yang mengandung komponen *lac* yang terdiri dari elemen sebagai berikut: (i) gen *lacI*; (ii) gen RNA polimerase T7; (iii) gen *lacZ* (Invitrogen, 2006).

Sistem kloning menggunakan vektor pET Champion[™] menawarkan banyak kelebihan seperti kemudahan, kecepatan, dan efisiensi kloning. *E. coli* BL21 Star[™] secara genetik dibuat sedemikian rupa sehingga bisa mengurangi permasalahan pada saat transkripsi serta meningkatkan produksi protein yang dihasilkan (Invitrogen, 2005). Plasmid pET Champion[™] mengandung gen pembawa antibodi untuk Ampisilin sehingga bakteri rekombinan dengan vektor ini memiliki kemampuan untuk bisa hidup di medium yang mengandung ampisilin, dimana bakteri lain akan mati. Hal ini bisa dijadikan sebagai metode seleksi keberhasilan proses ligase dan transformasi plasmid ini.

2.8. Teknik Sekuensing DNA

Kandungan informasi pada DNA dikode dalam urutan basa (A, C, G, dan T). Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan (sekuens) basa pada molekul DNA ini. Alasan mendasar mengapa perlu diketahui sekuens DNA adalah untuk memprediksi fungsi sekuens DNA dan memfasilitasi manipulasi molekul (Alphey, 1997). DNA sekuensing dapat dilakukan langsung pada produk PCR atau pada fragmen yang diklon pada vektor plasmid (Kopp, Jameson., 1998).

Pada saat ini, terdapat dua teknik sekuensing yaitu terminasi rantai (*chain termination*) dan degradasi kimia (*chemical degradation*). Dua metode ini secara berturut-turut disebut juga dengan metode Sanger dan Maxam-Gilbert. Metode terminasi rantai bergantung pada sintesis enzimatis dari DNA yang dilabel. Metode ini menggunakan nukleotida khusus yang dimodifikasi yang disebut dideoksinukleotida untuk mengakhiri perpanjangan untai (*strand*). Sedangkan metode degradasi kimia didasarkan pada degradasi kimia spesifik pada basa molekul DNA yang dilabel pada satu ujung. Walaupun ada aplikasi khusus yang menggunakan metode degradasi kimia, sekuen DNA pada saat ini umumnya ditentukan menggunakan terminasi rantai dideoksi (Alphey, 1997).

Pada metode terminasi rantai, DNA polimerase digunakan untuk memperpanjang untai DNA. Semua reagen yang dibutuhkan untuk sintesis DNA *in vitro* dikombinasikan pada reaksi, termasuk DNA polimerase dan 2',3'-dideoksinukleotida (ddNTP). ddNTP, seperti dNTP, dapat digabungkan oleh DNA polimerase menjadi rantai DNA yang berkembang melalui gugus 5' fosfat. Namun ddNTP tidak mempunyai gugus 3-OH' yang penting untuk pembentukan ikatan fosfodiester dan perpanjangan rantai sehingga rantai berakhir tepat pada titik dimana ddNTP digabungkan. Perbandingan dNTP: ddNTP harus dipilih secara hati-hati agar menghasilkan *strand* berlabel yang membentuk sekumpulan molekul hingga ribuan panjang basa, dimana tiap molekul terhenti pada basa yang spesifik. Molekul-molekul ini dipisahkan berdasarkan ukurannya dengan menggunakan *denaturing* gel elektroforesis resolusi tinggi (Alphey, 1997).

Langkah krusial pada metode degradasi kimia atau Maxam-Gilbert adalah pemecahan kimia basa spesifik pada molekul DNA yang ujungnya diberi label (Alphey, 1997; Hindley, 1983). Hal ini bertujuan untuk menghasilkan sekumpulan molekul berlabel, dimana setiap molekulnya berakhir pada basa spesifik. Pada metode ini juga digunakan *denaturing* elektroforesis gel resolusi tinggi dan deteksi fragmen yang dilabel dengan autoradiografi. Sekuens DNA dapat dibaca dari hasil '*ladder*' sekuensing seperti pada metode terminasi rantai. Pemecahan basa spesifik dilakukan dengan menggunakan reagen yang memodifikasi basa tertentu sehingga perlakuan selanjutnya menggunakan piperidin panas akan memecah rantai gula-fosfat pada *site* modifikasi (Alphey, 1997).

Reaksi basa spesifik didesain secara hati-hati agar hanya memodifikasi sebagian kecil basa. Pemecahan pada *site* modifikasi akan menghasilkan molekul yang ujungnya berlabel yang berkisar dari satu hingga ratusan nukleotida. Jika dibandingkan dengan metode terminasi rantai, metode degradasi kimia mempunyai beberapa keuntungan dan kekurangan (Alphey, 1997). Keuntungan tersebut antara lain:

- a. Sekuens dapat ditentukan dari DNA yang tidak diketahui sekuensnya, berdasarkan peta restriksi.
- b. Sekuens dapat diperoleh dari molekul DNA asli

Sedangkan kekurangannya antara lain:

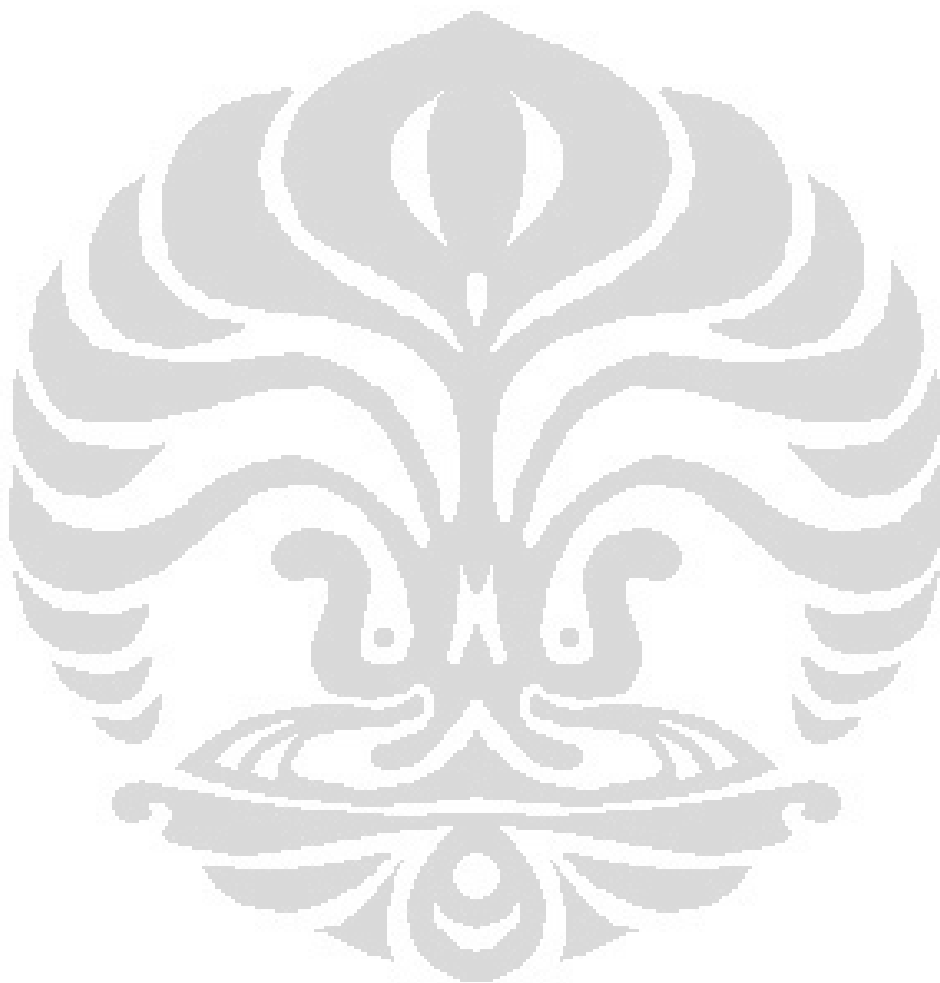
- a. Sekuens yang didapat lebih sedikit
- b. Reaksi biasanya lebih lambat dan kurang dapat dipercaya
- c. Reaksi memerlukan banyak bahan kimia yang berbahaya.

2.9. Program BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) adalah program komputer atau algoritma yang paling sering digunakan untuk membandingkan informasi sekuens biologi dengan sekuens yang terdapat pada data basis. Algoritma BLAST adalah program heuristik, yang berarti bahwa program ini bergantung pada beberapa jalan pintas cerdas untuk melakukan pencarian yang lebih cepat. BLAST menerapkan prinsip *local alignment*. Kebanyakan protein di alam berbentuk modular, dengan domain fungsional yang sering diulang dalam protein yang sama seperti halnya pada protein yang berbeda dari spesies yang berbeda. Algoritma BLAST diset untuk menemukan domain ini. *Local alignment* juga berarti bahwa mRNA dapat diselaraskan dengan sepotong DNA genomik, seperti yang sering dibutuhkan dalam perakitan genom dan analisis.

BLAST dapat diakses secara langsung melalui website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Ada berbagai macam variasi program BLAST untuk perbandingan sekuens yang berbeda. Misalnya *query* DNA ke database DNA, *query* protein ke database protein, dan *query* DNA ke database

sekuens protein. Adaptasi lain dari BLAST antara lain PSI-BLAST (*Position-Specific Iterative BLAST*) dan RPS-BLAST (Madden, 2003).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari hingga Mei 2012.

3.2. Bahan

3.2.1. Sampel

Sampel yang digunakan adalah *E. coli* BL21 StarTM rekombinan yang mengandung plasmid pembawa gen *fftCNC-2(1)* versi lengkap (Malik, 2012); koleksi plasmid *fft* versi lengkap pO_*fftNS* 1-4; serta DNA genomik *Weissella confusa* strain MBFCNC-2(1). Ketiganya berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI yang didapatkan dari penelitian sebelumnya. Sebagai inang transformasi digunakan One Shot[®] TOP10 *Chemically Competent E. coli*.

3.2.2. Medium dan Pembuatan Medium

3.2.2.1. Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian adalah: LB (Luria Bertani) [usb] yang terdiri atas: *yeast extract*, bakto pepton, dan Natrium Klorida; serta de Mann Rogosa Sharpe (MRS) [Oxoid] yang terdiri atas: pepton, 'Lab-Lemco' Powder, *yeast extract*, dikalium hidrogen fosfat, natrium asetat, ammonium sitrat, agar bakto, sukrosa, dan dekstrosa.

3.2.2.2. Pembuatan Medium

a. Medium Agar Luria Bertani (LB)

Sebanyak 2 gram Luria Bertani *ultrapure* dan 1,5 gram agar bakto ditimbang, kemudian dilarutkan dalam akuabides secukupnya. Larutan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Volume medium

dicukupkan hingga 100 mL dan selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

b. Medium Cair Luria Bertani (LB)

Sebanyak 20 gram LB ditimbang dan dilarutkan dalam akuabides secukupnya. Larutan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Volume medium dicukupkan hingga 1000 mL. Medium tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL. Medium dalam tabung reaksi ini kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

c. Medium Agar MRS

MRS *broth* dan agar bakto ditimbang masing-masing sebanyak 52 gram dan 15 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat. Medium dilarutkan dengan menggunakan akuades dan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah mendidih, volume dicukupkan hingga 1000 mL dengan akuades. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

d. Medium Cair MRS

Sebanyak 52 gram MRS *broth* ditimbang dan dilarutkan dalam akuabides secukupnya. Larutan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih. Volume dicukupkan hingga 1000 mL. Medium tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL. medium dalam tabung reaksi kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3. Pembuatan Dapar dan Larutan Pereaksi

3.2.3.1. Na_2EDTA 0,5 M

Sebanyak 18,6 g Na_2EDTA dilarutkan dalam sedikit akuabides. Larutan ditambahkan NaOH hingga larut lalu ditambahkan akuabides hingga tepat 100

mL. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3.2. Asam Asetat 1 N

Sebanyak 10 mL larutan asam asetat glasial 12 N ditambahkan dengan akuabides hingga tepat 120 mL.

3.2.3.3. Dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 50X

Sebanyak 24,2 g Tris Base; 5,71 mL asam asetat glasial; dan 10 mL Na_2EDTA 0,5 M dilarutkan dalam akuabides secukupnya. pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan asam asetat 1 N. Setelah nilai pH 8,0 volume dicukupkan dengan akuabides hingga 100 mL. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3.4. Dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 1X

Sebanyak 10 mL dapar TAE 50X dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 500 mL.

3.2.3.5. Natrium Hidroksida 5 N

Sebanyak 20 gram Natrium Hidroksida dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL.

3.2.3.6. Asam Klorida 1 N

Sebanyak 10 mL larutan asam klorida 12 N dilarutkan dalam akuades hingga total volume tepat 120 mL.

3.2.3.7. Dapar STET

Sebanyak 32 gram sukrosa; 2,42 gram Tris base; dan 7,445 gram EDTA dilarutkan dalam sejumlah akuabides. Kemudian sebanyak 0,4 mL triton X-100 ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Larutan dikocok hingga homogen, kemudian pH disesuaikan hingga 8,0. Volume larutan dicukupkan hingga tepat

400 mL. Dapar disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3.8. Lisozim 10 mg/mL

Lisozim sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 1 mL Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Larutan disimpan pada *freezer*.

3.2.3.9. Proteinase K 25 mg/mL

Proteinase K sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 1 mL akuabides steril, kemudian divortex. Larutan disimpan dalam *freezer*.

3.2.3.10. Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10%

Sebanyak 10 gram Sodium Dodesil Sulfat dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL.

3.2.3.11. Natrium Klorida 4 M

Sebanyak 93,6 gram Natrium Klorida dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 400 mL. Larutan kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3.12. *Cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB)

Sebanyak 2,925 gram Natrium Klorida dilarutkan dalam akuabides secukupnya. Sebanyak 5 gram CTAB dilarutkan dalam akuabides dengan cara memasukkan sedikit demi sedikit CTAB sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan di atas *hot plate*. Larutan Natrium Klorida yang telah dibuat kemudian dimasukkan ke dalam larutan CTAB. Volume dicukupkan hingga 100 mL, kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3.13. Dinatrium Edetat 0,5 M

Sebanyak 18,6 gram Dinatrium Edetat dilarutkan dalam sedikit akuabides. Larutan ditambahkan Natrium Hidroksida 5 N hingga larut dan mencapai pH 8,0.

Akuabides kemudian ditambahkan hingga volume larutan 100 mL. larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3.14. Asam Asetat 1 N

Sebanyak 10 mL asam asetat glasial 12 N dilarutkan dalam akuabides hingga volume total 120 mL.

3.2.3.15. Tris Base 1 M

Sebanyak 22,228 gram Tris Base dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 200 mL. Larutan kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.3.16. Tris-HCl 10 mM pH 8,0

Sebanyak 0,4 mL Tris Base 1 M dilarutkan dalam sedikit akuabides. pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan penambahan HCl 1 N. Volume kemudian dicukupkan hingga tepat 40 mL. larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

3.2.4. Bahan Kimia

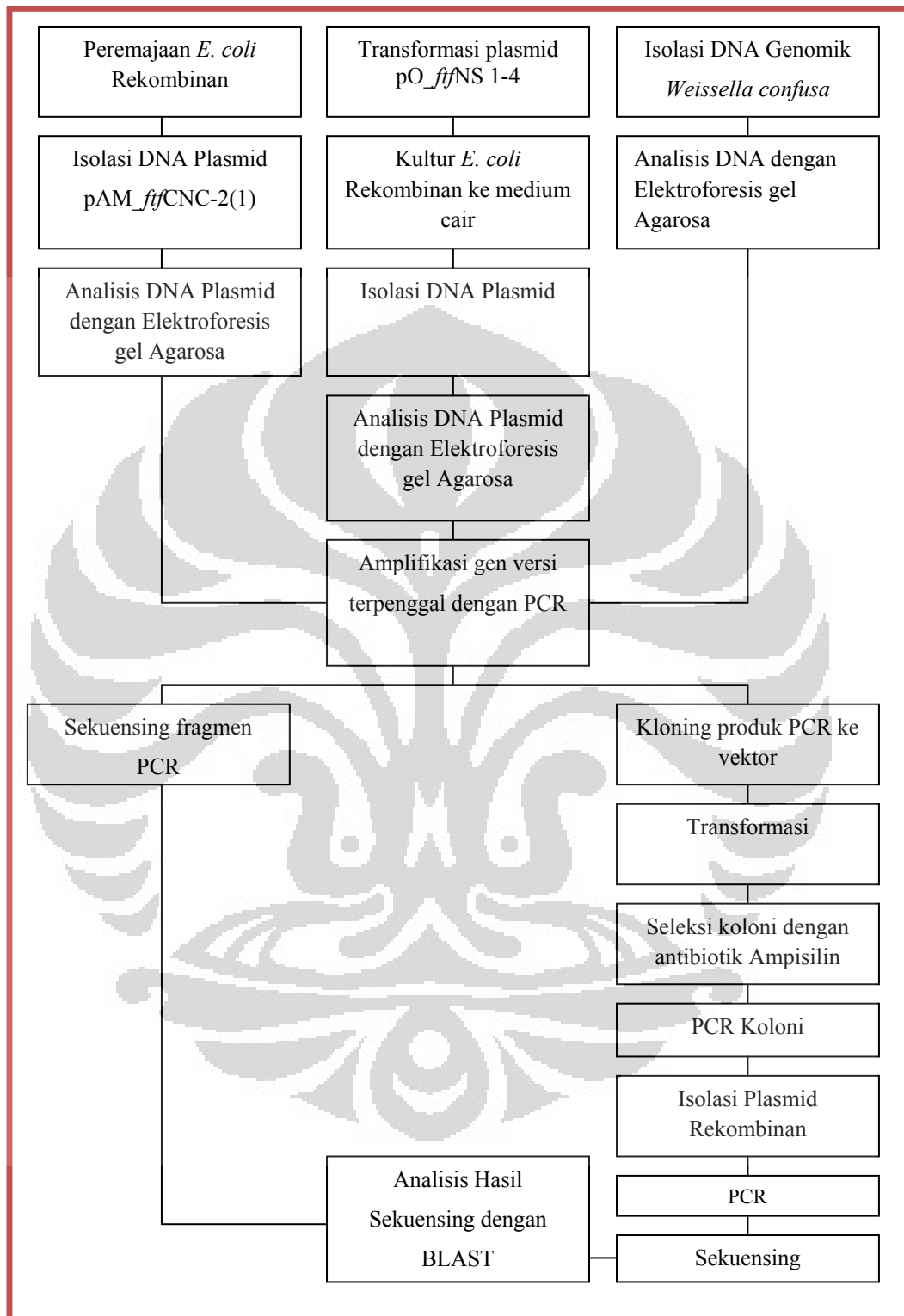
EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat) [Merck]; Tris Base [Merck]; Asam Asetat Glasial [Merck]; *Agarose ultrapure* [Invitrogen]; Etanol 70% [Merck]; Dapar STET (Sukrosa [Merck], Tris Base [Merck], EDTA [Merck], dan Triton X-100 [Merck]); *Lysozyme* [Sigma]; SDS (Sodium Dodesil Sulfat) [Sigma]; proteinase-K [usb]; Kloroform [Mallinckrodt]; Isoamil Alkohol [Merck]; Natrium Klorida [Oxoid]; Asam Klorida [Mallinckrodt]; CTAB (*Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide*) [Sigma]; Isopropanol [Sigma]; dapar TE (Tris Base [Merck], EDTA [Merck]); *Ready-To-Go (RTG) PCR Beads* [Amersham]; *Loading buffer* [Sentra BD]; Etidium Bromida 100 µg/ mL [Sentra BD]; Wako Gene Ladder [Wako]; *High Fidelity enzyme* [Kapa Biosystems]; primer universal T7 [Cybergene]; akuades; akuabides; Tetrasiklin [Sigma, USA]; Kappa 2GTM Robust HotStart [Kapa Biosystems], dNTP [Kapa Biosystems]; MgCl₂ [Kapa Biosystems]; Buffer GC HiFi [Kapa Biosystems]; PrepEase MiniSpin Plasmid Kit

[Affymetrix]; PrepEase Gel Extraction Kit [Affymetryx]; primer FTFdel_Fw (ATG TTA AGG AAT TAT TTT GGA GAG ACT AAA ACG) dan FTFdel_Rv (CTG TGG ATC CAC AAA ATT AGT AAC CGC TGC) [Cybergene]; Primer universal T7_Fw (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) dan Primer universal T7_Rv (GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G) [Cybergene].

3.3. Alat

Peralatan yang digunakan adalah: mikrosentrifus [Minispin Eppendorf dan Sorvall]; inkubator [orbital]; pemanas dengan *magnetic stirrer* [Torrey Pines Scientific]; autoklaf [Hirayama, Japan]; pH-meter [Eutech]; kamera digital [Canon Shot 3.2 megapixel]; timbangan analitik [Scout dan Acculab]; lemari pendingin [Sansio dan Toshiba]; freezer [Gea]; Oven [Memmert dan WTB Binder]; *vortex mixer* [Health; Digisystem]; Inkubator (*Orbital Shaker Incubator*); penangas air [Lab-line]; alat elektroforesis gel mini [Mupid Ex]; UV Transluminator [BDA Biometra TI 1]; PCR *thermal cycler* [MJ Mini BioRad]; *Laminar Air Flow Cabinet* [Esco]; dan alat-alat lain yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

3.4. Cara Kerja



3.4.1. Peremajaan *E. coli* BL 21 StarTM Rekombinan Pembawa Gen Ukuran Lengkap *ffCNC-2(1)*

3.4.1.1. Pembuatan Larutan Antibiotik Tetrasiklin 5 mg/ mL

Sejumlah 25 mg Tetrasiklin ditimbang dan dilarutkan dalam etanol 75% sebanyak 5 mL. Campuran divortex untuk membantu pelarutan. Larutan tetrasiklin dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL yang dilindungi dari cahaya dengan aluminium foil dan disimpan pada *freezer* -20⁰C.

3.4.1.2. Penyiapan Medium Agar Luria Bertani (LB)

Larutan antibiotik Tetrasiklin 5 mg/ mL ditambahkan sebanyak 100 µL ke dalam 100 mL medium. Medium dituangkan ke cawan petri dan dibiarkan membeku. Setelah medium membeku, cawan petri dibalik dan disimpan pada tempat gelap untuk menghindari terurainya antibiotik Tetrasiklin.

3.4.1.3. Penggoresan *E. coli* BL21 StarTM Rekombinan

Isolat *E. coli* BL 21 StarTM rekombinan digoreskan pada medium agar LB pada cawan petri menggunakan ose secara aseptis. Kultur kemudian diinkubasi selama semalam (18-20 jam) pada suhu 37⁰C.

3.4.1.4. Kultur *E. coli* BL 21 StarTM Rekombinan ke Medium Cair Luria Bertani

Satu sengkeli isolat *E. coli* BL 21 StarTM Rekombinan ditambahkan secara aseptis pada 5 mL medium cair Luria Bertani yang telah berisi 5 µL antibiotik Tetrasiklin 5 mg/mL. Kultur diinkubasi semalam pada suhu 37⁰C dengan pengocokan 100 rpm pada *shaking incubator*.

3.4.2. Isolasi DNA Plasmid pAM_{ffCNC-2(1)} dari *E. coli* BL 21 StarTM Rekombinan dengan menggunakan *Plasmid Isolation Kit PrepEase[®] MiniSpin*

3.4.2.1. Persiapan Reagen Kit

a. Larutan RNase A

RNase yang terliofilisasi dilarutkan dengan 1 mL buffer A1 secara langsung dalam botol RNase. Larutan dihomogenkan dengan pemipetan.

Kemudian larutan RNase dimasukkan ke dalam botol buffer dan dicampur hingga homogen. Tanggal pelaksanaan prosedur dituliskan pada botol buffer A1. Buffer disimpan pada suhu 4⁰C.

b. Buffer A2

Buffer A2 disimpan dalam suhu ruang (20-25⁰C) karena mengandung SDS.

c. Buffer A4

Buffer A4 dibuat dengan cara menambahkan etanol 96% ke dalam buffer A4 sebanyak 28 mL dan kemudian dihomogenkan.

3.4.2.2. Isolasi Plasmid

Langkah pertama yang dilakukan adalah pemanenan sel. Kultur yang telah diinkubasi semalaman dipersiapkan. Sebanyak 1,5 mL kultur sel diambil dan dimasukkan ke dalam *tube* sentrifugasi. Kultur sel ini disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 11.000xg. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dibuang. Proses ini dilakukan berulang kali hingga didapatkan pellet.

Selanjutnya dilakukan pelisisan sel. Pellet sel bakteri diresuspensi pada RNase A-buffer A1 sebanyak 250µL. Setelah itu, sebanyak 250µL buffer A2 ditambahkan ke dalam campuran, campuran dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung. Lisat (hasil sentrifugasi) diinkubasi pada temperatur ruang selama 5 menit kemudian dinetralkan dengan buffer A3 sebanyak 300 µL. *Tube* dibolak-balik sampai larutan homogen.

Lisat yang diperoleh dijernihkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 11.000xg pada suhu 4⁰C. Pengikatan plasmid ke kolom dilakukan dengan cara menempatkan kolom PrepEase[®] MiniSpin pada *microtube* 2 mL. Lisat yang sudah jernih dimasukkan ke dalam kolom. kolom disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg.

Kolom ditempatkan kembali pada *microtube* kemudian ditambahkan buffer AW sebanyak 500 µL. Campuran dipanaskan hingga mencapai suhu 50⁰C.

Setelah itu larutan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Air sisa yang tertampung pada tabung dibuang.

Kolom ditempatkan kembali pada *microtube*, kemudian ditambahkan buffer A4 sebanyak 600 μ L. Larutan disentrifus selama satu menit dengan kecepatan 11.000xg. Selanjutnya, kolom dikeringkan. Kolom ditempatkan kembali pada *microtube*, kemudian disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 11.000xg. Residu wash buffer etanol akan hilang pada langkah ini.

Langkah terakhir adalah elusi. Kolom ditempatkan kembali pada *microtube* yang baru dan steril. Sebanyak 50 μ L buffer AE ditambahkan ke dalam kolom, larutan kemudian diinkubasi selama 1 menit. Larutan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Plasmid yang diinginkan terdapat pada cairan hasil elusi pada *microtube*.

3.4.3. Peremajaan *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) dari Stok Beku

Isolat *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) dari stok beku digoreskan pada cawan yang berisi MRS secara aseptis. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama semalam.

Koloni tunggal yang tumbuh kemudian dikultur ulang pada medium cair MRS untuk keperluan isolasi DNA. kultur diinkubasi kembali pada suhu 30⁰C selama semalam.

3.4.4. Isolasi DNA Genomik dari *Weissella confusa* MBFCNC-2(1)

Isolasi DNA genomik *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) dilakukan menggunakan metode modifikasi Murray dan Thompson dengan *Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar, 2008).

Bakteri asam laktat *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) yang telah dikultur pada medium cair MRS dan diinkubasi pada suhu 30⁰C selama semalam dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL steril dan disentrifus dengan kecepatan 10.000xg selama 3 menit pada suhu 20⁰C. Supernatan dibuang, pellet sel kemudian diresuspensikan dengan 557 μ L dapar STET (Sukrosa, Tris, EDTA, Triton) (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar, 2008).

Sebanyak 10 μL larutan lisozim 10 mg/mL, 30 μL SDS 10 %, dan 4 μL proteinase-K dimasukkan ke dalam suspensi. Suspensi kemudian dihomogenkan dengan cara mebolak-balikkan *microtube* beberapa kali. Langkah selanjutnya adalah inkubasi pada suhu 37⁰C selama 60 menit. NaCl 4 M sebanyak 65 μL dan CTAB sebanyak 80 μL ditambahkan ke dalam suspensi yang telah diinkubasi, kemudian suspensi divortex. Inkubasi dilakukan kembali pada suhu 65⁰C selama 60 menit (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar, 2008).

Isolasi DNA dilakukan menggunakan kloroform dan isoamil alkohol (24:1 v/v) dengan volume 650 mL (624 μL kloroform dan 26 μL isoamil alkohol). Kloroform dan isoamil alkohol dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian divortex dan disentrifus pada suhu 20⁰C selama 20 menit dengan kecepatan 10.000xg. supernatannya diambil dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang baru dan steril. Isolasi dengan kloroform dan isoamil alkohol dilakukan sebanyak dua kali untuk menghindari penggunaan fenol yang bersifat toksik (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar, 2008).

Supernatan kemudian ditambah dengan isopropanol dingin sebanyak 400 μL . Larutan dibolak-balik beberapa kali secara perlahan hingga terlihat benang putih halus yang merupakan benang DNA. Larutan tersebut kemudian disentrifus selama 3 menit pada suhu 20⁰C dengan kecepatan 10.000xg. Pellet DNA yang diperoleh ditambah dengan etanol 70% dingin sebanyak 1 mL dan dibolak-balik beberapa kali secara perlahan (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar, 2008).

Larutan kemudian disentrifus selama 2 menit pada suhu 20⁰C dengan kecepatan 10.000xg. Supernatan dibuang dan pellet DNA pada dasar *microtube* dikeringudarkan selama beberapa jam. Setelah kering, pelet DNA direhidrasi pada 40 μL akuabides dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 15 menit agar DNA melarut sempurna. Larutan DNA disimpan pada suhu 4⁰C (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar, 2008).

3.4.5. Retransformasi Plasmid pO_*ftf*NS 1-4

Sebanyak 3 μL plasmid pO_*ftf*NS-1, pO_*ftf*NS-2, pO_*ftf*NS-3, dan pO_*ftf*NS-4 masing-masing dimasukkan ke dalam vial berisi sel One ShotTM

TOP10 *chemically competent E. coli* menggunakan mikropipet. Larutan dicampur, kemudian diinkubasi dalam es selama 30 menit.

Vial dipindahkan ke dalam penangas air yang telah diatur suhunya sebesar 42°C selama 30 detik. Vial tidak boleh dikocok. Kemudian secara cepat, vial dipindahkan ke dalam penangas es. Sel dibiarkan dingin selama 1-2 menit. Kemudian, sebanyak 250 µL medium Luria Bertani ditambahkan. Transforman diinkubasi selama 60 menit pada inkubator dengan suhu 37°C dengan pengocokan 200 rpm.

Bakteri transforman kemudian disebar pada medium Luria Bertani yang telah mengandung antibiotik Tetrasiklin 5 µg/mL dengan menggunakan beads steril. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Koloni yang tumbuh (koloni positif) segera digores kembali pada medium Luria bertani dan tetrasiklin yang baru.

3.4.6. Analisis DNA dan Plasmid Hasil Isolasi dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Agarosa dibuat dengan konsentrasi 1,5% yaitu sebanyak 0,45 g bubuk agarosa *ultrapure* dilarutkan dalam 30 mL dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 1X, kemudian dididihkan. Setelah agak dingin, larutan agarose dituang ke dalam cetakan gel, ditambahkan 2 µL etidium bromida 100 µL/mL kemudian dihomogenkan. Sisir dipasang dan larutan dидiamkan hingga membeku. Setelah beku, sisir diangkat dan nampan dipindahkan ke dalam wadah elektroforesis. Wadah diberi dapar TAE 1X secukupnya hingga terendam.

Loading buffer dipipet sebanyak 5 µL dan ditambahkan dalam 2 µL ekstrak DNA dalam *microtube*, kemudian diresuspensikan dengan pipipetan. Campuran tersebut kemudian dipipet menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumur gel dengan hati-hati. Wadah ditutup dengan pelindung wadah dan elektroforesis dinyalakan. Tegangan diatur sebesar 100 volt. Elektroforesis dijalankan sekitar 45 menit.

Setelah selesai, gel agarosa diambil dan pita DNA plasmid diamati melalui UV transluminator pada panjang gelombang 590 λm. Hasil pengamatan difoto dengan kamera digital yang dihubungkan dengan komputer.

3.4.7. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Sebanyak 10 μL Buffer GC HiFi dimasukkan ke dalam *microtube* 0,5 mL. dNTP, Primer FTFdel_Fw dan primer FTFdel_Rv masing-masing sebanyak 2 μL ditambahkan ke dalam *microtube*. MgCl_2 25 mM sebanyak 3 μL ditambahkan, kemudian dihomogenkan. Enzim HiFi sebanyak 1 μL dimasukkan ke dalam *microtube*. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan vortex singkat. Seluruh campuran kemudian dibagi ke dalam 2 *microtube* sehingga masing-masing berisi 24 μL . Cetakan plasmid ditambahkan sebanyak 1 μL ke masing-masing *microtube*. Seluruh preparasi PCR dilakukan dalam ruang LAF (*Laminar Air Flow*).

Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: pra siklus dilakukan pada suhu 95°C selama 5 menit; siklus dilakukan sebanyak 3 kali, terdiri dari proses denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, pelekatan pada suhu 58°C selama 45 detik, dan perpanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit. Pasca siklus dilakukan pada suhu 72°C selama 2 menit. PCR dapat dioptimasi hingga didapat pita yang diharapkan sesuai ukuran dan konsentrasinya.

3.4.8. Analisis Amplikon Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Agarosa dibuat dengan konsentrasi 2% yaitu sebanyak 0,4 g bubuk agarosa *ultrapure* dilarutkan dalam 20 mL dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 1X, kemudian dididihkan. Setelah agak dingin, larutan agarose dituang ke dalam cetakan gel, ditambahkan 2 μL etidium bromida 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ kemudian dihomogenkan. Sisir dipasang dan larutan didiamkan hingga membeku. Setelah beku, sisir diangkat dan nampan dipindahkan ke dalam wadah elektroforesis. Wadah diberi dapar TAE 1X secukupnya hingga gel terendam.

Loading buffer dipipet sebanyak 3 μL dan ditambahkan pada 2 μL amplikon hasil PCR dalam *microtube*, kemudian diresuspensikan dengan pemipetan. Campuran tersebut kemudian dipipet menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam sumur gel dengan hati-hati. Wadah ditutup dengan pelindung wadah dan elektroforesis dinyalakan. Tegangan diatur sebesar 100 volt. Elektroforesis dijalankan sekitar 45 menit.

Setelah selesai, gel agarose diambil dan pita diamati melalui UV transluminator pada panjang gelombang 590 nm. Hasil pengamatan difoto dengan kamera digital yang dihubungkan dengan komputer.

3.4.9. Kloning Produk PCR pada Vektor pET Champion[®] 100

Sebanyak 4 µL produk PCR dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi larutan garam (1:4) 1 µL sehingga volume total adalah 5 µL. Vektor pET Champion[®] 100 sebanyak 1 µL dimasukkan ke dalam *microtube*. Larutan dicampur dan diinkubasi selama 5 menit pada temperatur ruangan. Larutan kemudian disimpan dalam es sebelum ditransformasikan ke *E. coli* BL 21 Star[™].

3.4.10. Transformasi ke *E. coli* TOP10

Untuk proses transformasi, 3 µL DNA plasmid dimasukkan ke dalam vial berisi sel One Shot[™] TOP10 *chemically competent E. coli* menggunakan mikropipet yang telah didinginkan sebelumnya. Larutan dicampur, kemudian diinkubasi dalam es selama 30 menit.

Vial dipindahkan ke dalam penangas air yang telah diatur suhunya sebesar 42°C selama 30 detik. Vial jangan dikocok. Kemudian secara cepat, vial dipindahkan ke dalam penangas es. Sel dibiarkan dingin selama 1-2 menit. Sebanyak 250 µL medium Luria Bertani ditambahkan. Transforman diinkubasi selama 60 menit pada inkubator dengan suhu 37°C dengan pengocokan 200 rpm.

3.4.11. Seleksi Koloni

Seleksi koloni yang positif dilakukan dengan menggunakan antibiotik Ampisilin. Cawan Luria Bertani agar yang telah mengandung ampisilin 5 µg/mL disiapkan. Bakteri transforman diinokulasikan dengan *beads* steril, kemudian cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam (12-19 jam). Koloni yang tumbuh (koloni positif) dipilih dan segera digores kembali ke medium agar Luria Bertani dan Ampisilin yang baru, serta diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Koleksi klon yang diperoleh ini digunakan pada pemeriksaan PCR koloni maupun untuk diisolasi plasmid rekombinannya.

3.4.12. PCR Koloni

Sebanyak 30 μL akuades steril dimasukkan ke *microtube*, kemudian koloni kultur dimasukkan ke dalam *microtube* menggunakan ujung tip dan dididihkan pada suhu 90°C selama 5 menit. Setelah itu *microtube* disentrifus, bagian supernatan dijadikan sebagai cetakan untuk PCR.

Sebanyak 10 μL buffer B dimasukkan ke dalam *tube* PCR. Kemudian dNTP sebanyak 1 μL dimasukkan kedalam buffer tersebut. Primer universal T7 Forward dan Primer Universal T7 Reverse masing-masing sebanyak 2 μL ditambahkan ke dalam campuran. Setelah itu, enzim Kapa Robust HotStart sebanyak 0,4 μL dimasukkan dan campuran kemudian dihomogenkan. Air *milliQ* ditambahkan hingga volume mencapai 48 μL . Campuran dihomogenkan dan dibagi ke dalam 2 *tube* sama banyak, yaitu masing-masing 24 μL . Cetakan koloni dimasukkan ke dalam masing-masing *tube* sebanyak 1 μL . Proses pencampuran larutan ini dilakukan pada suhu dingin dan di dalam *hood* khusus pekerjaan PCR untuk menghindari kontaminasi.

Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: Pra siklus dilakukan pada suhu 95°C selama 1 menit. Siklus diulang sebanyak 30 kali yang terdiri dari: denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C ; pelekatan selama 30 detik pada suhu 58°C ; dan perpanjangan selama 2 menit pada suhu 72°C . Pasca siklus dilakukan pada suhu 72°C selama 2 menit.

3.4.13. Isolasi Plasmid Rekombinan

Langkah pertama yang dilakukan adalah pemanenan sel. Kultur yang telah diinkubasi semalaman dipersiapkan. Sebanyak 1,5 mL kultur sel diambil dan dimasukkan ke dalam *tube* sentrifugasi. Kultur sel ini disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 11.000xg. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dibuang. Proses ini dilakukan berulang kali hingga didapatkan pellet.

Selanjutnya dilakukan pelisisan sel. Pellet sel bakteri diresuspensi pada RNase A-buffer A1 sebanyak 250 μL . Setelah itu, sebanyak 250 μL buffer A2 ditambahkan ke dalam campuran, campuran dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung. Lisat (hasil sentrifugasi) diinkubasi pada temperatur

ruang selama 5 menit kemudian dinetralkan dengan buffer A3 sebanyak 300 μ L. *Tube* dibolak-balik sampai larutan homogen.

Lisat yang diperoleh dijernihkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 11.000xg pada suhu 4⁰C. Pengikatan plasmid ke kolom dilakukan dengan cara menempatkan kolom PrepEase[®] MiniSpin pada *microtube* 2 mL. Lisat yang sudah jernih dimasukkan ke dalam kolom. Kolom disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg.

Kolom ditempatkan kembali pada *microtube* kemudian ditambahkan buffer AW sebanyak 500 μ L. Campuran dipanaskan hingga mencapai suhu 50⁰C. Setelah itu larutan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Air sisa yang tertampung pada tabung dibuang.

Kolom ditempatkan kembali pada *microtube*, kemudian ditambahkan buffer A4 sebanyak 600 μ L. Larutan disentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 11.000xg. selanjutnya, kolom dikeringkan. Kolom ditempatkan kembali pada *microtube*, kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 11.000xg. Residu wash buffer etanol akan hilang pada langkah ini.

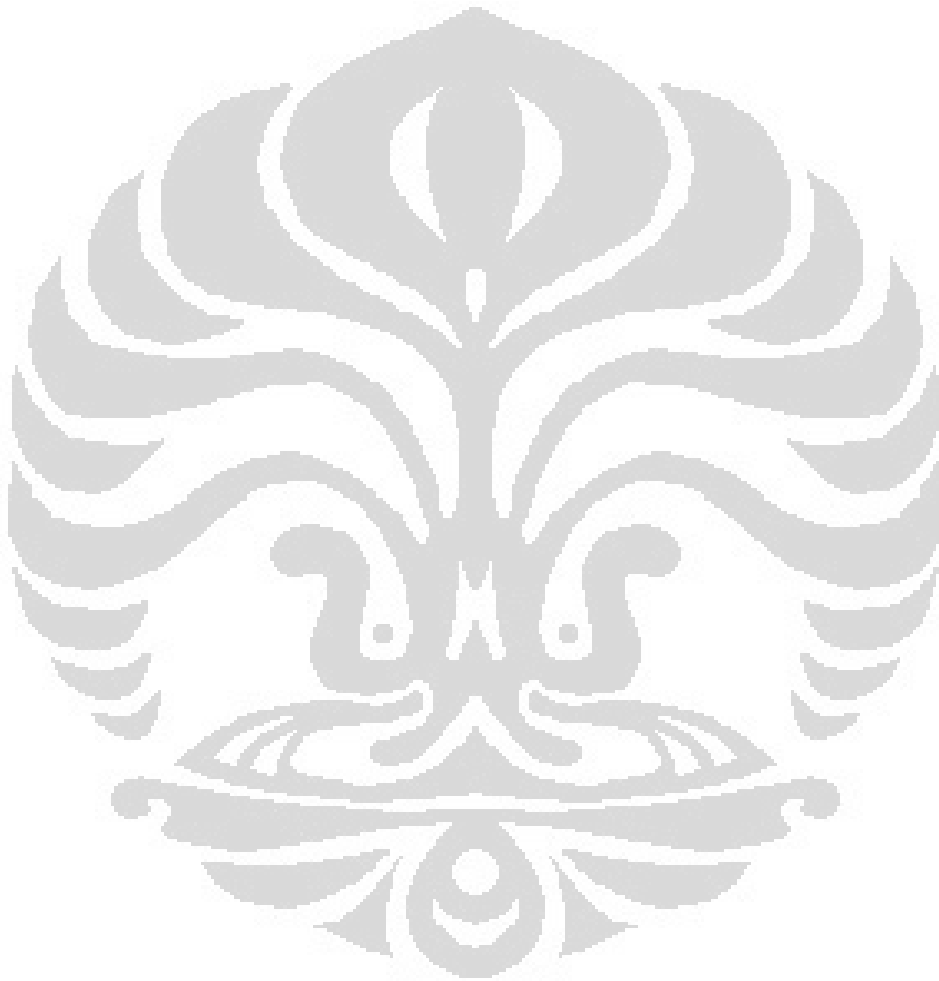
Langkah terakhir adalah elusi. Kolom ditempatkan kembali pada *microtube* yang baru dan steril. Sebanyak 50 μ L buffer AE ditambahkan ke dalam kolom, larutan kemudian diinkubasi selama 1 menit. Larutan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Plasmid yang diinginkan terdapat pada cairan hasil elusi pada *microtube*.

3.4.14. Analisis Hasil Kloning dengan Sekuensing

Plasmid di PCR lagi dengan primer vektor T7 dan hasilnya diamati dengan elektroforesis gel agarosa. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan primer universal T7 yang dilakukan oleh Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta. Sekuensing DNA ini dilakukan untuk memeriksa apakah gen sudah terklon dalam suatu kerangka baca yang benar, sehingga diharapkan protein *fff* terpenggal yang benar dapat diekspresikan.

3.4.15. Analisis sekuensing DNA dengan BLAST

Hasil sekuensing dari Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta dianalisa dengan membandingkan terhadap sekuens nukleotida yang terdapat pada *GenBank* dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Peremajaan *E. coli* BL21 StarTM Rekombinan Pembawa gen *ftfCNC-2(1)*

Langkah pertama yang dilakukan pada penelitian ini adalah peremajaan *E. coli* BL21 StarTM Rekombinan yang mengandung plasmid pembawa gen *ftfCNC-2(1)* versi lengkap. Cawan Luria Bertani yang telah ditambahkan dengan larutan antibiotik Tetrasiklin 5 µg/mL disiapkan. Penyiapan medium harus terlindung dari cahaya untuk menghindari terurainya antibiotik Tetrasiklin. Antibiotik ini perlu ditambahkan ke dalam medium karena plasmid pembawa gen lengkap pada *E. coli* rekombinan membawa marker tetrasiklin.

Isolat *E. coli* rekombinan yang berasal dari stok beku digoreskan pada cawan. Penggoresan dilakukan pada empat cawan agar Luria Bertani. Proses penyiapan medium dan penggoresan isolat dilakukan secara aseptis.

Cawan Luria Bertani yang telah digores kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama semalam. Hasil peremajaan *E. coli* rekombinan ini tumbuh dengan baik pada medium agar Luria Bertani, ditandai adanya koloni-koloni pada cawan agar Luria Bertani yang sudah diinkubasi tersebut.

4.2. Hasil Isolasi DNA Plasmid pAM_*ftfCNC-2(1)* dari *E. coli* Rekombinan

Koloni tunggal *E. coli* rekombinan yang tumbuh pada medium agar kemudian ditumbuhkan pada medium cair Luria Bertani untuk keperluan isolasi plasmid. Medium cair Luria Bertani ini juga ditambah dengan antibiotik Tetrasiklin 5 µg/mL. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37⁰C dengan pengocokan 100 rpm selama semalam. Setelah inkubasi, plasmid dari kultur bakteri siap untuk diisolasi.

Plasmid pAM_*ftfCNC-2(1)* diisolasi dengan menggunakan *plasmid isolation kit*, yaitu PrepEase[®] MiniSpin Plasmid Kit. Prinsip isolasi plasmid dengan kit ini adalah prinsip alkalin lisis. Volume kultur yang akan diisolasi adalah 5 mL. Kultur bakteri dimasukkan ke dalam *microtube* dan disentrifus selama 30 detik dengan kecepatan 11.000xg. Proses ini bertujuan untuk mendapatkan pellet sel sehingga supernatan hasil sentrifus harus dibuang.

Pellet sel kemudian diresuspensi dengan RNase A-buffer sebanyak 250 μ L dan dihomogenkan dengan vortex kuat. Buffer ini mengandung EDTA, glukosa, RNase A dan Tris. EDTA berfungsi untuk mengkelat ion divalen seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} sehingga akan mendestabilisasi dinding sel dan menghambat aktivitas DNase. Sedangkan glukosa berfungsi untuk menjaga tekanan osmosis sehingga sel tidak pecah. RNase A berfungsi untuk mendegradasi RNA sel selama proses lisis (Nick, 2007).

Proses lisis dilakukan dengan penambahan 250 μ L buffer A2 ke dalam campuran. Buffer A2 mengandung NaOH dan detergen SDS (Sodium Dodesil Sulfat). SDS berfungsi untuk melarutkan membran sel serta mendenaturasi sebagian besar protein sel. NaOH membantu memecah dinding sel, tetapi fungsi paling penting adalah untuk mengganggu ikatan hidrogen antara basa-basa DNA sehingga mengubah untai ganda DNA (dsDNA) menjadi untai tunggal (ssDNA). Proses ini dinamakan proses denaturasi dan terjadi baik pada DNA plasmid maupun DNA kromosomal (Nick, 2007).

Tahap selanjutnya adalah netralisasi, yaitu dengan menambahkan 300 μ L buffer A3 ke dalam lisat. *Microtube* kembali dibolak-balik kembali selama 6-8 kali hingga terbentuk suspensi homogen dengan flokulat berwarna putih. Buffer A3 akan mengurangi tingkat kebasahan larutan. Dibawah kondisi tersebut, ikatan hidrogen antara basa-basa dari untai tunggal DNA dapat kembali terbentuk sehingga ssDNA akan kembali menjadi dsDNA. Tahap ini selektif karena plasmid DNA yang kecil dan sirkular mudah membentuk kembali dsDNA, sedangkan DNA kromosomal (DNA genomik) yang sangat besar tidak mungkin kembali melekat. Pada tahap ini tidak boleh dilakukan vortex karena hal tersebut akan mengakibatkan DNA kromosomal patah dan pelekatan kembali mungkin terjadi sehingga akan terjadi kontaminasi DNA plasmid oleh DNA kromosomal dan debris sel lain (Nick, 2007). Larutan kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 11.000xg pada suhu 4⁰C untuk memaksimalkan pengendapan debris sel.

Lisat yang sudah jernih dimasukkan ke dalam kolom PrepEase. Selanjutnya kolom disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Proses sentrifugasi ini memungkinkan terjadinya pengikatan plasmid secara reversibel

pada membran filter *anion-exchange* yang disebabkan adanya garam *chaotropic* pada buffer A3.

Kolom PrepEase mengandung membran filter silika yang diaktifkan secara khusus. Membran ini didesain untuk mengikat plasmid DNA yang bermuatan negatif secara spesifik serta memisahkannya dari kontaminan berupa protein atau komponen seluler lain.

Langkah selanjutnya adalah pencucian kolom dengan buffer AW sebanyak 500 μ L. Sebelum digunakan, buffer AW dipanaskan terlebih dahulu hingga 50⁰C. Setelah itu larutan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Cairan sisa yang tertampung pada tabung dibuang. Pencucian dengan buffer AW bertujuan untuk menghilangkan seluruh nuklease dari plasmid hingga bersih.

Pencucian kolom selanjutnya dilakukan dengan buffer A4 yang telah dicukupkan dengan etanol sebanyak 600 μ L. Larutan disentrifus selama satu menit dengan kecepatan 11.000xg. Proses pencucian kolom ini bertujuan untuk menghilangkan kontaminan non-DNA.

Pada tahap selanjutnya, kolom dikeringkan. Kolom ditempatkan kembali pada *microtube*, kemudian disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 11.000xg. Residu wash buffer etanol akan hilang pada langkah ini.

Elusi dilakukan menggunakan buffer AE sebanyak 30 μ L. Setelah diinkubasi selama 1 menit, larutan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Plasmid yang diinginkan terdapat pada cairan hasil elusi pada *microtube*. Elusi kedua dilakukan dengan 20 μ L buffer AE dan perlakuan yang sama dengan elusi pertama.

Dari isolasi ini dihasilkan 2 *microtube* berisi plasmid *ftfCNC-2(1)* masing-masing 30 μ L dan 20 μ L.

4.3. Hasil Isolasi DNA Genomik *Weissella confusa* MBFCNC-2(1)

DNA genomik *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) diekstraksi dari bakteri asam laktat *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) dengan metode CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*). Metode ini dipilih karena cukup mudah dilakukan serta DNA yang diperoleh relatif banyak (Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar, 2008).

Isolat bakteri yang telah dikultur dalam 10 mL medium cair MRS serta diinkubasi selama semalam pada suhu 30°C dimasukkan ke dalam *microtube* bekas dan steril kemudian disentrifus dengan mikrosentrifus pada suhu 20°C selama 3 menit. Supernatan dibuang untuk mendapatkan pellet sel. Pellet sel ini kemudian diresuspensikan dengan dapar STET untuk membersihkan pellet sel dari sisa medium MRS yang tertinggal. Dapar STET mengandung sukrosa, basa Tris, EDTA, dan triton X-100. Komposisi ini mampu menghambat aktivitas DNase dan mengganggu kestabilan dinding sel.

Langkah selanjutnya setelah panen sel adalah pelisisan. Tahap ini dilakukan dengan cara menambahkan lisozim, SDS, dan proteinase-K. Lisozim adalah enzim yang mampu mendegradasi peptidoglikan yang merupakan komponen utama dinding sel bakteri. Peptidoglikan berbentuk polimer besar dan molekul-molekulnya dihubungkan oleh ikatan kovalen. Molekul-molekul ini adalah N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat. Bakteri asam laktat yang termasuk pada golongan gram positif mempunyai lapisan peptidoglikan hingga 40 lapis (Black, 2008). Lisozim, atau dikenal juga dengan muramidase (1,4-N-asetilmuramidase) bekerja dengan cara menghidrolisis ikatan $\beta(1 \rightarrow 4)$ antara asam N-asetilmuramat dan N-asetilglukosamin pada peptidoglikan.

Sodium Dodesil Sulfat (SDS) berfungsi untuk melarutkan membran sel dan mendenaturasi protein dalam sel sehingga DNA dapat terpisah dari protein. Proteinase K digunakan untuk membantu membersihkan protein dengan cara mendegradasinya.

Langkah selanjutnya adalah penghilangan debris sel dengan penambahan *Cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) 5%. CTAB merupakan surfaktan kationik yang mampu membentuk kompleks tak larut dengan asam nukleat pada konsentrasi NaCl di bawah 0,5 M.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan kloroform dan isoamil alkohol (24:1 v/v) sebanyak 650 μ L; terdiri dari 624 μ L kloroform dan 26 μ L isoamil alkohol. Sebenarnya ekstraksi dapat lebih efektif jika dilakukan dengan fenol: kloroform: isoamil alkohol (25:24:1, v/v/v), tetapi limbah fenol memerlukan penanganan khusus yang belum mungkin dilakukan. Ekstraksi dilakukan sebanyak dua kali untuk mengoptimalkan hasil ekstraksi.

Selanjutnya, supernatan diambil dan dimasukkan ke *microtube* yang baru dan steril sebelum ditambahkan dengan isopropanol dingin sebanyak 400 μL . Larutan dibolak-balik perlahan hingga tampak benang-benang putih halus yang merupakan benang DNA. Larutan yang mengandung DNA ini disentrifus pada suhu 20°C selama 3 menit dengan kecepatan 10.000xg. Isopropanol berfungsi untuk mengendapkan DNA.

Pellet DNA ditambah dengan etanol 70% dingin sebanyak 1 mL dan *microtube* dibolak-balik perlahan beberapa kali. Larutan ini kemudian disentrifus lagi pada suhu 20°C selama 2 menit dengan kecepatan 10.000xg. Supernatan dibuang dan pellet DNA dikeringkan di udara selama 1-2 jam. Setelah kering, DNA disimpan pada freezer -20°C . Ketika akan digunakan, pellet DNA dilarutkan dalam 15 μL akuabides steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.

4.4. Hasil Retransformasi Plasmid Rekombinan Pembawa Gen *ftf* Lengkap

Peneliti melakukan retransformasi plasmid rekombinan pembawa gen *ftf* lengkap yaitu pO_*ftf*NS 1-4 pada *E. coli* TOP10 yang sudah kompeten secara kimia.

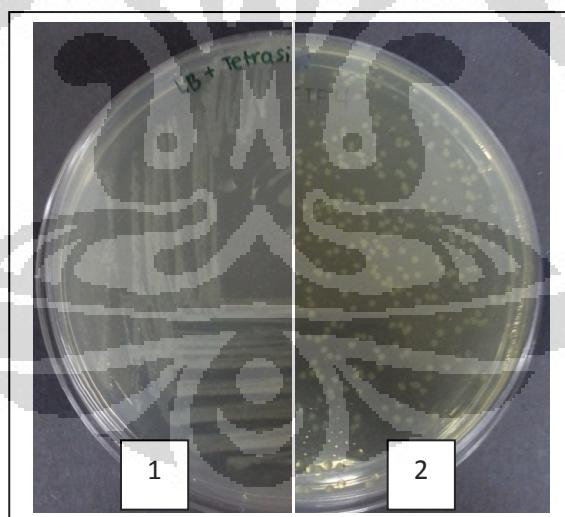
Metode transformasi yang digunakan yaitu metode *heat shock* pada suhu 42°C . Sebanyak 3 μL plasmid pO_*ftf*NS 1, pO_*ftf*NS 2, pO_*ftf*NS 3, dan pO_*ftf*NS 4 dimasukkan masing-masing ke dalam vial berisi *E. coli* TOP10 yang telah di-*thaw* pada es. Campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit sebelum di-*heat shock* selama 30 detik pada suhu 42°C tanpa pengocokan. Durasi 30 detik dipilih karena jangka waktu yang lebih lama dapat mengurangi efisiensi transformasi. Viabilitas sel akan menurun pada pemaparan lebih lama di suhu tinggi. Hal inilah yang mungkin menyebabkan penurunan efisiensi transformasi (Singh, Yadav, Ma, Amoah, 2010).

Pada proses transformasi, ion bivalen seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} dari bakteri yang sudah kompeten memegang peranan penting pada interaksi DNA dengan membran fosfolipid. Kation tersebut terikat pada fosfolipid dan memberikan muatan positif pada membran. DNA yang bermuatan negatif akan cenderung terikat pada molekul lipid dengan adanya mediasi dari kation bivalen (Sato,

Kumazawa, Yoshikawa, Kurusu, 2005). Pemanasan yang tiba-tiba akan mengubah membran dan memungkinkan pemasukan DNA secara cepat.

Pada tahap selanjutnya, vial dimasukkan ke dalam es dan kedalamnya ditambahkan 250 μ L medium Luria Bertani cair. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C dengan pengocokan 200 rpm selama 1 jam. Sel bakteri transforman kemudian disebar pada medium agar Luria Bertani yang mengandung antibiotik Tetrasiklin dengan menggunakan *beads* steril. Plasmid pO_*fft*NS 1-4 membawa marker tetrasiklin sehingga dapat digunakan dalam seleksi koloni. Kultur bakteri transforman tersebut kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu 37⁰C.

Setelah diperiksa pada keesokan harinya, pada semua cawan agar Luria Bertani tumbuh koloni-koloni bakteri. Dari hasil transformasi, peneliti mengambil dua koloni tunggal dan menggoreskannya kembali pada medium agar Luria Bertani dan ampisilin yang baru. Kultur ini kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu 37⁰C. hasil retransformasi plasmid pO_*fft*NS dapat dilihat pada gambar 4.1.



Keterangan: 1. Koloni tunggal transforman yang digores ulang pada medium LB+Tetrasiklin; 2. Hasil transformasi pO_*fft*NS-4;

Gambar 4.1. *E. coli* TOP10 Rekombinan hasil retransformasi

Kultur yang telah tumbuh pada medium agar Luria Bertani kemudian dibiakkan pada medium cair Luria Bertani yang telah ditambah dengan tetrasiklin untuk diisolasi plasmidnya. Proses isolasi dilakukan dengan menggunakan

plasmid isolation kit yaitu PrepEase MiniSpin seperti isolasi-isolasi sebelumnya. Dari proses isolasi ini didapatkan 30 μ L plasmid pO_*ftf-4*.

Langkah selanjutnya yang dilakukan peneliti adalah PCR plasmid *ftf-4* dengan menggunakan primer FTFdel_Fw dan FTFdel_Rv. Hasil dari PCR ini dijelaskan pada pembahasan poin 4.6. (Hasil PCR dan Analisis Amplikon hasil PCR).

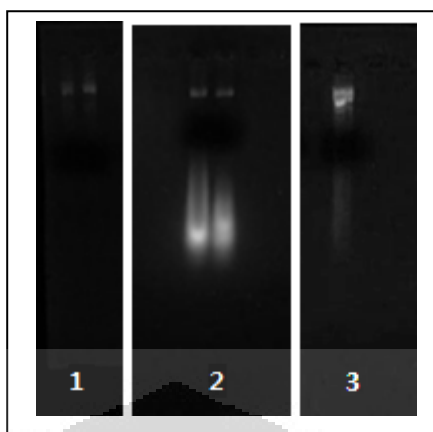
Amplikon hasil PCR plasmid pO_*ftf-4* yang telah dipurifikasi kemudian dikirim ke Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta untuk disekuensing. Sekuensing ini dilakukan dengan menggunakan primer FTFdel_Fw dan FTFdel_Rv.

4.5. Hasil Pengamatan Plasmid dan DNA pada Elektroforesis Gel Agarosa

Pengamatan plasmid dan DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 1,5 %, yaitu 0,3 gram agarosa yang dilarutkan dalam 20 mL dapar TAE 1X.

Plasmid dan DNA yang akan dielektroforesis disuspensikan terlebih dahulu dengan *loading buffer*. *Loading buffer* terdiri atas pewarna dan pemberat. Pewarna yang digunakan adalah campuran *xylene cyanol* dan *blue bromophenol*. Sedangkan pemberatnya adalah gliserol, ficoll, dan sukrosa. Pemberat berfungsi untuk meningkatkan densitas DNA sehingga DNA tidak mengapung tetapi dapat tenggelam pada dasar sumur elektroforesis.

Elektroforesis dijalankan selama 30 menit dan setelah selesai, gel diambil dari wadah elektroforesis. Pita DNA kemudian diamati melalui UV Transluminator pada panjang gelombang 590 nm. Dari hasil elektroforesis, terlihat pita pada kedua hasil elusi plasmid dan DNA yang diisolasi. Hasil elektroforesis dari plasmid dan DNA genomik *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) dapat dilihat pada gambar 4.2.



Keterangan: 1. plasmid pAM_fffCNC-2(1); 2. DNA genomik *Weisella confusa* MBFCNC-2(1); 3. Plasmid pO_fffNS-4

Gambar 4.2. Hasil Identifikasi plasmid dan DNA genomik

Pita DNA pada hasil elektroforesis dapat terlihat karena adanya pewarna, yaitu Etidium Bromida (3,8-diamino-6-ethyl-5-phenylphenatridium bromide). Penggunaan Etidium Bromida sebagai pewarna pada proses elektroforesis disebabkan oleh kemampuannya berfluoresensi dibawah sinar UV serta berinterkalasi diantara pasang basa DNA (Sambrook et al., 1989).

4.6. Hasil PCR dan Analisis Amplikon Hasil PCR

Sebelum melakukan PCR, primer terlebih dulu dilarutkan menggunakan buffer TE sehingga konsentrasinya menjadi 100 pmol/ μ L. Untuk primer FTFdel_Fw, sebanyak 162 μ L buffer TE ditambahkan ke dalam primer dan kemudian dihomogenkan. Untuk primer FTFdel_Rv, sebanyak 209 μ L buffer TE ditambahkan ke dalam primer, kemudian dihomogenkan. Untuk PCR, primer yang digunakan mempunyai konsentrasi 20 pmol/ μ L sehingga larutan primer harus diencerkan.

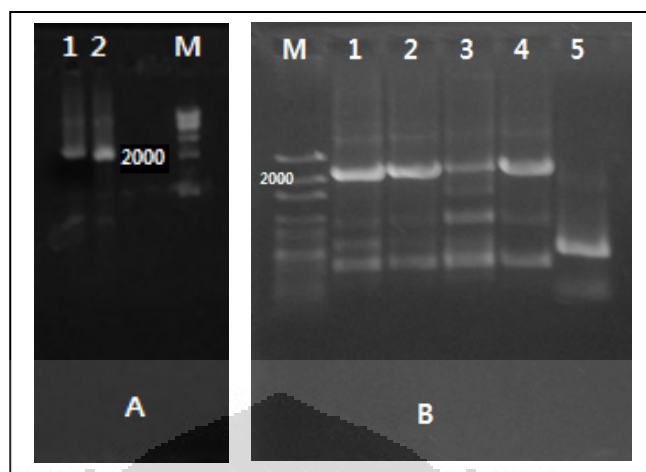
Proses pengenceran primer dilakukan dengan penambahan akuabides steril. Masing-masing primer sebanyak 10 μ L diambil dan dimasukkan ke dalam *microtube* yang baru dan steril. Akuabides kemudian ditambahkan hingga volume total 50 μ L. Tahap pelarutan dan pengenceran primer dilakukan secara aseptis biokimia dalam ruang *Laminar Air Flow* dan pelaksanaan kerja dilakukan dengan menggunakan sarung tangan *non powder*.

Pada uji pendahuluan dilakukan PCR DNA genomik dan plasmid rekombinan (hasil isolasi terhadap *E. coli* dari stok beku) dengan menggunakan PCR *beads*. PCR *beads* berisi komponen-komponen yang dibutuhkan pada proses PCR seperti dNTP, MgCl₂, KCl, Tris-HCl, dan enzim *Pure Taq polymerase* dalam bentuk padat sehingga lebih stabil pada suhu ruang. PCR *beads* ini dilarutkan terlebih dahulu dengan 41 µL akuabides steril hingga terbentuk larutan jernih. Primer FTFdel_Fw dan FTFdel_Rv masing-masing sebanyak 2 µL ditambahkan dan dihomogenkan. Kemudian sebanyak 3 µL MgCl₂ ditambahkan ke dalam larutan sebelum larutan dibagi menjadi dua *tube* PCR. Masing-masing *tube* PCR ditambah dengan cetakan DNA dengan volume 1 µL. MgCl₂ berperan sebagai kofaktor enzim *taq polymerase* yang dapat meningkatkan ketelitian enzim tersebut dalam mempolimerisasi (Malik, Hermawati, Hestiningtyas, Soemiati, Radji, 2010).

Hasil pengamatan amplicon PCR yang berasal dari DNA genomik tidak menunjukkan adanya pita, sedangkan amplicon PCR yang berasal dari plasmid rekombinan menunjukkan adanya pita tetapi tidak terlalu jelas. Hal ini dimungkinkan karena enzim *taq polimerase* bersifat kurang spesifik dan sering mengintroduksi *error* pada proses PCR.

Selanjutnya, PCR dilakukan dengan menggunakan enzim KAPA HiFi (*High fidelity*). Cetakan DNA yang digunakan adalah plasmid rekombinan yang diisolasi dari *E. coli* BL21 StarTM dari stok beku karena proses PCR pada DNA genomik tidak menghasilkan pita sama sekali. Enzim *High Fidelity* mempunyai spesifitas yang tinggi dengan ketelitian mencapai 100 kali lipat enzim *taq* polimerase sehingga kemungkinan *error* sangat kecil.

Disamping PCR terhadap plasmid rekombinan yang diisolasi dari stok beku *E. coli* rekombinan, peneliti juga melakukan PCR terhadap plasmid pO_*ftf*NS-4 yang ditransformasi ke dalam *One Shot* TOP10 *Chemically competent E. coli*. Hasil identifikasi gen *ftf* versi terpenggal dengan teknik PCR dapat dilihat pada gambar 4.3.



Keterangan: A. Amplikon hasil PCR plasmid pAM_fffCNC-2(1) [M: Marker; 1,2: hasil PCR]; B. Amplikon hasil PCR plasmid pO_fffNS-4 [M: Marker; 1-4: hasil PCR; 5: Kontrol positif]

Gambar 4.3. Hasil identifikasi gen *fff* versi terpenggal.

Hasil elektroforesis yang menunjukkan adanya beberapa pita DNA perlu dipurifikasi. Munculnya beberapa pita ini mungkin disebabkan oleh kurang optimalnya suhu atau kelebihan $MgCl_2$ sehingga penempelan primer kurang spesifik. $MgCl_2$ juga berfungsi sebagai penetral gaya tolak menolak antara tulang punggung primer dengan tulang punggung cetakan DNA. Oleh karena itu kelebihan $MgCl_2$ dapat menyebabkan amplifikasi yang tidak spesifik (primer berikatan pada tempat yang tidak spesifik; *mismatches*) sedangkan kekurangan $MgCl_2$ dapat menyebabkan kegagalan amplifikasi (Malik, Hermawati, Hestiningtyas, Soemiati, Radji, 2010).

4.7. Hasil Purifikasi Amplikon Hasil PCR

Hasil elektroforesis amplikon PCR plasmid pAM_fffCNC-2(1) dan pO_fffNS-4 menunjukkan adanya beberapa pita sehingga perlu dilakukan purifikasi terhadap pita DNA yang diinginkan. Purifikasi dilakukan dengan menggunakan *prepEase Gel Extraction Kit*.

Seluruh amplikon hasil PCR yang berjumlah 100 μ L di elektroforesis pada gel agarosa konsentrasi 2%. Fragmen pita yang diinginkan, yaitu yang berukuran 2 kbp kemudian dipotong menggunakan *cutter* steril dan dimasukkan ke dalam *microtube* steril. Buffer NT sebanyak 200 μ L ditambahkan ke *microtube*. Gel

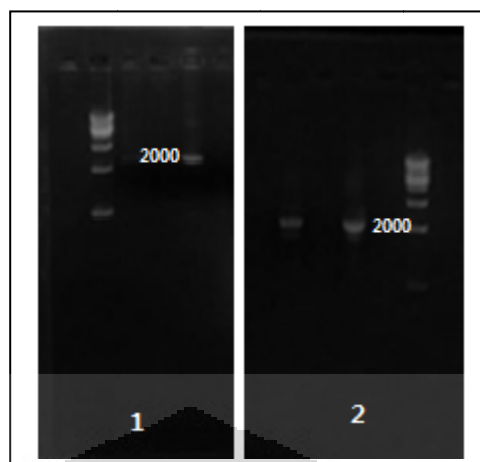
kemudian diinkubasi pada penangas air bersuhu 50⁰C selama 10 menit atau hingga gel larut sempurna. Larutan kemudian dituangkan ke dalam kolom PrepEase dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Air yang tertampung dibuang.

Kolom PrepEase terdiri atas membran silika yang bisa berikatan dengan DNA dengan adanya garam *chaotropic* pada NT buffer. Jenis garam *chaotropic* yang terkandung pada NT buffer adalah Guanidin Tiosianat. Guanidin Tiosianat mampu mempresipitasi DNA dan materi genetik berberat molekul tinggi dalam lingkungan tinggi garam *chaotropic*. Sementara itu, lemak dan kontaminan lain hanya mempunyai afinitas moderat terhadap silika sehingga dapat dicuci bersih dari campuran.

Selanjutnya, kolom dicuci dengan 600 μ L NT3 buffer yang telah dicukupkan dengan etanol. Kolom disentrifus kembali selama 1 menit. Air yang tertampung dibuang kembali. Kolom disentrifus ulang selama 2 menit dengan kecepatan sama agar sisa etanol dari NT3 buffer hilang. Etanol harus dihilangkan karena dapat mengganggu reaksi selanjutnya.

Kolom kemudian ditempatkan pada *microtube* yang baru dan steril. Sebanyak 20 μ L NE buffer ditambahkan secara langsung pada tengah kolom. Kolom kemudian diinkubasi selama 1 menit untuk memperoleh hasil yang maksimal. Langkah terakhir adalah sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000xg. Oleh karena itu pada tahap ini dihasilkan 20 μ L ampikon hasil PCR yang telah dipurifikasi dari masing-masing plasmid.

Hasil purifikasi ampikon PCR dielektroforesis kembali pada gel agarosa dengan konsentrasi 1,5% untuk pengecekan. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada tegangan 100 volt. Hasil elektroforesis kemudian diamati pada UV transluminator dan didokumentasikan. Dari hasil pengamatan, tampak pita tunggal hasil purifikasi yang berukuran 2 kbp. Hasil purifikasi ampikon PCR pada gel elektroforesis dapat dilihat pada gambar 4.4.



Keterangan: 1. Hasil purifikasi amplikon PCR plasmid pAM_fffCNC-2(1); 2. Hasil purifikasi amplikon PCR plasmid pO_fffNS-4

Gambar 4.4. Hasil Purifikasi Amplikon PCR dengan menggunakan PrepEase Gel Extraction Kit

4.8. Kloning Amplikon Hasil PCR dan Transformasi Plasmid Rekombinan

Amplikon hasil PCR plasmid pAM_fffCNC-2(1) yang telah dipurifikasi diligasikan ke dalam vektor pET ChampionTM 100. Sebanyak 4 μ L produk PCR dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi larutan garam 1 μ L sehingga volume total adalah 5 μ L. Vektor pET Champion[®] 100 dengan volume 1 μ L dimasukkan ke dalam *microtube*. Larutan dicampur dan diinkubasi selama 5 menit pada temperatur ruangan. Larutan kemudian disimpan dalam es sebelum ditransformasikan ke *E. coli* TOP10.

Vektor pET ChampionTM 100 tersedia dalam satu Kit yang memungkinkan terjadinya kloning langsung dari produk PCR berujung tumpul kedalam vektor dengan efisiensi lebih dari 90%. Kit ini memudahkan penggunaannya karena tidak diperlukan adanya enzim ligase, prosedur post-PCR, atau enzim restriksi.

Setelah proses kloning, langkah selanjutnya adalah transformasi plasmid rekombinan kedalam *One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli*. Transformasi bertujuan untuk mengintroduksi DNA rekombinan yang ke dalam sel inang sehingga didapatkan bakteri rekombinan.

Hasil reaksi kloning sebanyak 3 μ L ditambahkan kedalam vial yang berisi *E. coli* TOP10 yang telah di-*thaw* pada es. Campuran ini kemudian diinkubasi

selama 30 menit pada suhu ruang. Inkubasi lebih lama tidak mempunyai efek yang signifikan pada efisiensi transformasi.

Langkah selanjutnya dari tahap transformasi ini sama dengan transformasi sebelumnya yaitu *heat shock* selama 30 detik pada suhu 42⁰C tanpa pengocokan. Sel bakteri transforman disebar pada medium agar Luria Bertani yang mengandung antibiotik Ampisilin dengan menggunakan *beads* steril. Vektor pET ChampionTM 100 membawa marker resisten antibiotik Ampisilin sehingga dapat digunakan untuk seleksi transforman.

Setelah diinkubasi selama semalam pada suhu 37⁰C, pada semua cawan agar Luria Bertani tumbuh koloni-koloni bakteri yang jumlah totalnya mencapai ratusan. Koloni tunggal kemudian digores kembali pada medium yang baru. Satu plate agar Luria Bertani berisi 24 goresan koloni tunggal. Dari proses pemindahan koloni tunggal ini, didapatkan plate agar Luria Bertani sejumlah 5 buah yang masing-masing berisi 24 koloni bakteri transforman.

4.9. PCR Koloni

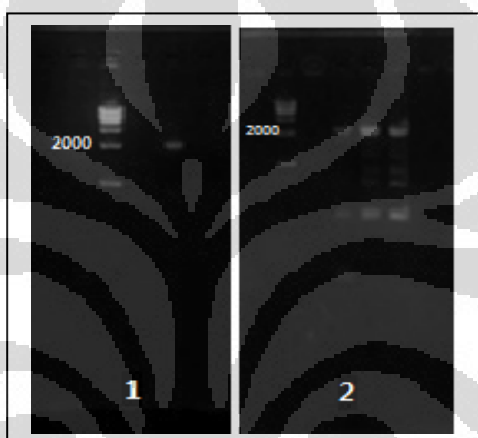
PCR koloni dilakukan untuk memverifikasi bahwa koloni bakteri yang dipilih merupakan bakteri rekombinan yang membawa gen *ftf* versi terpenggal. Pada uji pendahuluan, digunakan dNTP, Buffer B, Primer T7 Forward dan T7 Reverse, enzim KAPA2G Robust HotStart, serta air *milliQ* dan cetakan DNA.

Enzim DNA Polimerase KAPA2G Robust merupakan enzim yang memiliki performa lebih baik dibandingkan *taq polymerase* karena memiliki *range* cetakan DNA, tipe ampikon, dan ukuran fragmen yang cukup luas. Enzim ini juga lebih toleran terhadap inhibitor PCR yang umum muncul serta memiliki sensitivitas tinggi. Pada formulasi HotStart, enzim dikombinasikan dengan antibodi yang sesuai untuk menginaktivasi enzim hingga langkah denaturasi pertama. Hal ini akan mengeliminasi kemungkinan produk amplifikasi palsu yang dihasilkan selama penyiapan reaksi dan inisiasi, yang secara garis besar dapat dikaitkan dengan peningkatan efisiensi reaksi.

Cetakan DNA yang digunakan pada PCR koloni berasal dari koloni bakteri yang dilarutkan dalam 30 μ L akuabides dan kemudian dididihkan selama 5 menit. Larutan yang telah mendidih ini kemudian disentrifus. Supernatannya

diambil dan digunakan sebagai cetakan pada komponen PCR koloni. Pada pengujian pertama, diambil koloni nomor 1 sampai 21 dari cawan A. Setelah di cek menggunakan elektroforesis gel agarosa, tidak terlihat adanya pita pada ukuran 2 kbp. Ada pita yang terlihat tetapi ukurannya sangat kecil yaitu jauh dibawah 1 kbp. Pita ini kemungkinan besar merupakan primer yang tidak bereaksi pada saat PCR.

Pada pelaksanaan PCR selanjutnya, digunakan kombinasi primer T7 Forward dan primer FTFdel_Rv. Koloni yang diuji adalah koloni 1 dan 2 dari plate B.



Keterangan: 1. Hasil PCR koloni 1; 2. Hasil PCR Koloni 3, 4, dan 6

Gambar 4.5. Hasil identifikasi gen *fffCNC-2(1)* versi terpenggal pada PCR koloni 1, 3, 4, dan 6 dari cawan B.

Pada hasil elektroforesis terlihat ada pita tunggal pada koloni 1. Pita ini berukuran 2 kbp sehingga kemungkinan besar koloni tersebut positif membawa gen *fff* versi terpenggal. Koloni yang positif kemudian dikultur ulang pada medium agar Luria Bertani dan Ampisilin yang baru dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam.

Kultur koloni 1 pada medium agar ini kemudian ditumbuhkan pada 20 mL medium cair Luria Bertani yang sudah ditambah dengan antibiotik Ampisilin untuk kemudian diisolasi plasmid rekombinannya. Isolasi plasmid rekombinan dilakukan sebanyak dua kali menggunakan *Isolation plasmid Kit* PrepEase MiniSpin. Dari isolasi pertama didapatkan 50 µL plasmid hasil elusi pertama dan

20 μL plasmid hasil elusi kedua. Sementara itu dari isolasi kedua didapatkan 30 μL plasmid elusi pertama dan 20 μL plasmid elusi ke dua.

Koloni selanjutnya yang di PCR adalah koloni nomor 3, 4, dan 6 dari cawan B, dengan komposisi sama dengan komposisi PCR koloni sebelumnya. Setiap koloni hanya di PCR dalam satu *tube* sehingga masing-masing dari koloni tersebut menghasilkan 25 μL ampikon hasil PCR. Pada hasil elektroforesis terlihat beberapa pita pada semua koloni. Salah satu dari pita-pita ini berukuran 2 kbp sehingga kemungkinan besar koloni tersebut juga positif membawa gen *fff* versi terpenggal. Pita pada koloni 3 sedikit lebih tipis dibandingkan pita pada koloni 4 dan 6. Peneliti kemudian memilih koloni nomor 4 untuk diteliti lebih lanjut.

PCR untuk koloni nomor 4 kemudian diulang sekali lagi untuk mendapat ampikon PCR yang lebih banyak. Kali ini PCR dibuat untuk empat *tube* sehingga pada akhirnya menghasilkan 100 μL ampikon hasil PCR koloni 4. Seluruh ampikon hasil PCR koloni 4 kemudian dipurifikasi untuk dicoba disekuensing langsung di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta. Sekuensing ini menggunakan kombinasi primer T7 Forward dan FTFdel_Rv.

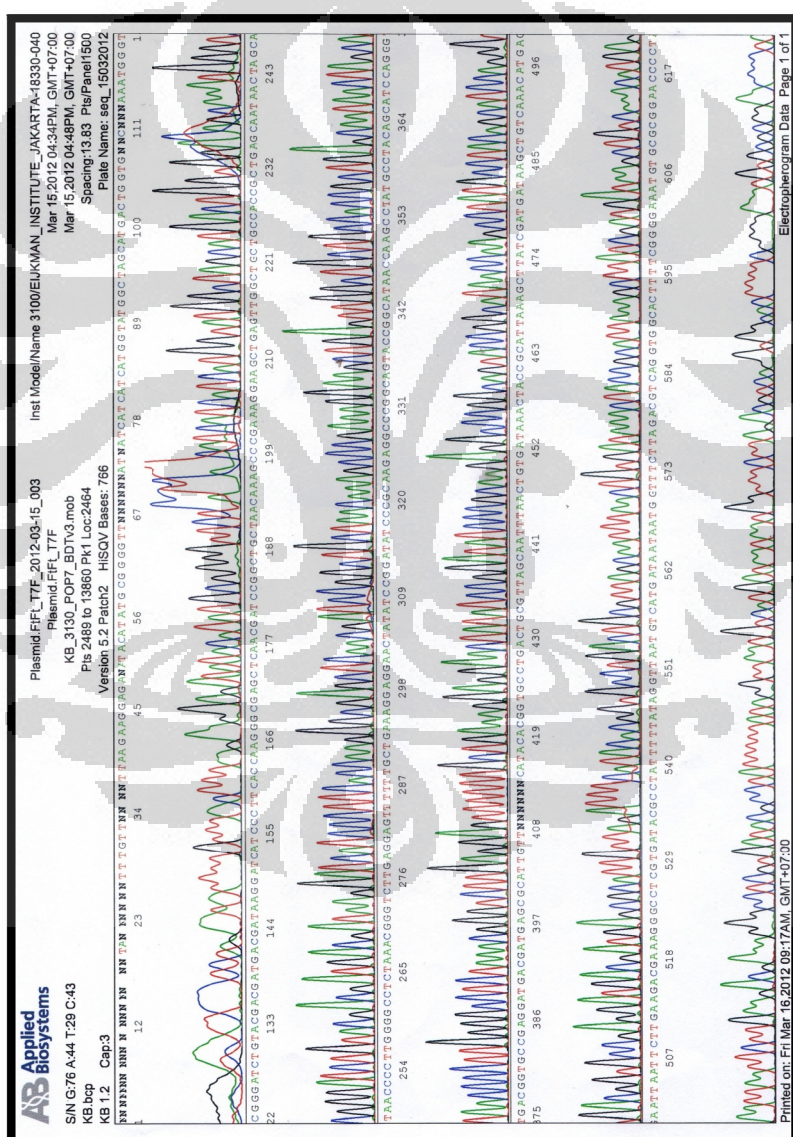
4.10. Sekuensing dan Analisis Hasil Sekuensing dengan BLAST

Sebelum disekuensing, plasmid yang dihasilkan dari isolasi koloni nomor 1 pada cawan B di PCR terlebih dahulu. Pada proses ini digunakan komposisi yang sama dengan amplifikasi gen terpenggal dari gen lengkap di awal kerja. Primer yang digunakan yaitu FTFdel_Fw dan FTFdel_Rv. Namun, hasil elektroforesis pada ampikon PCR tidak menunjukkan adanya pita. Peneliti juga telah menggunakan berbagai kombinasi primer antara FTFdel_Fw, FTFdel_Rv, T7 Forward, dan T7 Reverse, serta PCR beads untuk mengamplifikasi gen *fff* terpenggal yang dimungkinkan terdapat dalam plasmid. Namun semua percobaan kombinasi tersebut tidak ada yang menghasilkan pita pada elektroforesis gel agarosa.

Plasmid kemudian dicoba untuk disekuensing di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta. Sekuensing ini dilakukan dengan primer T7 Forward dan T7 Reverse. Proses sekuensing di lembaga tersebut memakan waktu

hingga 3 minggu sehingga sambil menunggu hasil sekuensing, peneliti melakukan lagi PCR koloni terhadap koloni transforman lain, yaitu koloni 3, 4, dan 6 yang telah dibahas sebelumnya.

Hasil sekuensing untuk sampel pertama yang berupa plasmid kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan sekuens yang terdapat pada *Gen Bank* menggunakan program BLAST (Metode ini dapat digunakan secara gratis di internet melalui situs <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Elektroferogram yang dihasilkan dari sekuensing menggunakan primer T7 Forward dapat dilihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6. Elektroferogram sampel I dengan menggunakan primer universal T7 Forward

Dari elektroferogram diatas terlihat ada empat warna garis, yaitu merah, hijau, biru, dan hitam. Masing-masing warna mewakili satu basa nitrogen; merah mewakili T (Timin), hijau mewakili A (Adenin), biru mewakili C (Cytosin), dan hitam mewakili G (Guanin). Pada elektroferogram tersebut masih ada basa-basa yang belum terbaca karena *peak* elektroferogramnya bertumpuk dan ditulis sebagai N. Sebelum dianalisis menggunakan program BLAST, basa nitrogen yang belum terbaca ini harus diganti secara manual dengan cara menentukan puncak (*peak*) yang tertinggi pada basa nitrogen yang masih bertanda N tersebut. *Peak* yang paling tinggi pada elektroferogram dibaca sesuai warnanya. Jika *peak* tertingginya berwarna merah maka huruf N diganti dengan huruf T, jika berwarna hijau maka diganti A, jika berwarna biru maka diganti C, dan jika berwarna hitam maka diganti dengan huruf G. Oleh karena itu setelah melengkapi data elektroferogram tersebut secara manual diperoleh urutan basa sebagai berikut:

ATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGGAAGCAAATG
GGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCAAG
GGCGAGCTCAACGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGA
GTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGC
CTCTAAACGGGTCTTGAGGAGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATC
CGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTAT
GCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCAT
TGTTCATAACGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACT
ACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAAT
TCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAAT
GTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA
AATGTGCGCGGAACCCCTA.

Sedangkan elektroferogram yang dihasilkan dari primer T7 Reverse dapat dilihat pada lampiran 11. Setelah dibaca secara manual dan basa yang masih ditandai dengan huruf N diganti, sekuens yang terbentuk dari primer T7 Reverse adalah sebagai berikut:

TTTGTTAGCAGCCGGATCGTTGAGCTCGCCCTTGGTGAAGGGAG
ATCCTTATCCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTGCTGTCCACCATC
ATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAACCCCGCATATGT

ATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTT
 ATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCG
 AGATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCG
 CCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGG
 AAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGT TTCGGCGTGG
 GTATGGTGGCAGGCCCGTGCGCGGGGGACTGTTGGGGCGCCATCTCCT
 TGCATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTAACCTAC
 TACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAG
 ATCCCGGACACCATCGAATGGCGCAAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGA
 TATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCA.

Baik sekuens yang berasal dari primer T7 Forward maupun primer T7 Reverse kemudian dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Berikut adalah perbandingan sekuens plasmid (sampel 1) yang disequensing dengan primer T7 Forward terhadap sekuens pada GenBank:

```

> gb|AF147464.1|AF147464 T7 expression vector pViet, complete sequence
Length=4985

Score = 750 bits (406), Expect = 0.0
Identities = 437/450 (97%), Gaps = 10/450 (2%)
Strand=Plus/Minus

Query 97 GCTCAACGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGC 156
      ||||| | ||||||| | | ||||||| | | ||| | | | ||||||| | | ||| | | |
Sbjct 1542 GCTCGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGC 1483

Query 157 TGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCCTCTAAACGGGICTTGAGGAGTTTTTGCT 216
      ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | |||||
Sbjct 1482 TGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCCTCTAAACGGGICTTGAGGAGTTTTTGCT 1423

Query 217 GAAAGGAGGAAGTATATCCGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGAGTACCGGCATAACCAAG 276
      ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | |||||
Sbjct 1422 GAAAGGAGGAAGTATATCCGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGAGTACCGGCATAACCAAG 1363

Query 277 CCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTT---- 332
      ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | |||||
Sbjct 1362 CCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGAT 1303

Query 333 --CATACACGGTGCCCTGACTGCCGTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGC 390
      ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | |||||
Sbjct 1302 TTCATACACGGTGCCCTGACTGCCGTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGC 1243

Query 391 TTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCCTGAAGACGAAAGGGCCCTCGTGA 450
      ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | |||||
Sbjct 1242 TTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAAAT----CTTGAAGACGAAAGGGCCCTCGTGA 1187

Query 451 TACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCA 510
      ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | |||||
Sbjct 1186 TACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCA 1127

Query 511 CTTTTCGGGAAATGTGCCGGAAACCCCTA 540
      ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | |||||
Sbjct 1126 CTTTTCGGGAAATGTGCCGGAAACCCCTA 1097
  
```

Gambar 4.7. Perbandingan sekuens plasmid (sampel 1)-T7Forward dengan sekuens pada *GenBank*

Sedangkan hasil BLAST sekuens plasmid (sampel 1) yang disekuensing dengan primer T7 Reverse adalah sebagai berikut:

```

> gb|AF533984.1| Cloning vector pIA423, complete sequence
Length=16341

Score = 863 bits (467), Expect = 0.0
Identities = 474/477 (99%), Gaps = 2/477 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 126   AGAACCCCGCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAA 185
          |||
Sbjct 5216   AGAACCCCGCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAA 5157

Query 186   TTGTTATCCGCTCACAAITCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCT 245
          |||
Sbjct 5156   TTGTTATCCGCTCACAAITCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCT 5097

Query 246   CGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGCGCCACAGGTGCGGTTGCTG 305
          |||
Sbjct 5096   CGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGCGCCACAGGTGCGGTTGCTG 5037

Query 306   GCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGA 365
          |||
Sbjct 5036   GCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGA 4977

Query 366   GCGCTTGTTCGGCGTGGGATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTGGGCGCCA 425
          |||
Sbjct 4976   GCGCTTGTTCGGCGTGGGATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTGGGCGCCA 4917

Query 426   TCTCCTTGCAATGCACCAITCCTTGGCGGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGG 485
          |||
Sbjct 4916   TCTCCTTGCAATGCACCAITCCTTGGCGGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGG 4857

Query 486   GCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCCGGACACCATCGAA 545
          |||
Sbjct 4856   GCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCCGGACACCATCGAA 4797

Query 546   TGGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAAITCA 602
          |||
Sbjct 4796   TGGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATA--GCGCCCGGAAGAGAGTCAAITCA 4742

```

Gambar 4.8. Perbandingan sekuens plasmid (sampel 1)-T7 Reverse dengan sekuens pada *GenBank*

Dari hasil perbandingan kedua sekuens diatas, terlihat bahwa sampel yang disekuensing bukan merupakan gen *ftf*, tetapi vektor (baik vektor ekspresi maupun vektor kloning) dengan homologi 97-99%. Pada gambar, *Query* merupakan hasil sekuensing plasmid (sampel 1) sedangkan *Sbjct* (*Subject*) merupakan sekuens yang terdapat pada GenBank. Kesamaan basa nukleotida antara sekuens sampel dengan sekuens pada GenBank ditandai dengan adanya garis penghubung antara *Query* dan *Sbjct*.

Hasil sekuensing untuk sampel kedua yang berupa hasil purifikasi amplikon PCR koloni juga dianalisis dengan menggunakan program BLAST. Sekuensing ini menggunakan kombinasi primer T7 Forward dan FTFdel_Rv. Elektroferogram sampel kedua dengan menggunakan primer T7 Forward dan FTFdel_Rv dapat dilihat pada lampiran 12 dan 13.

Setelah data dilengkapi dengan pembacaan secara manual, sekuens yang dihasilkan dari primer T7 Forward adalah sebagai berikut:

```
AACTTAAGAAGGAGAATACATATGCGGGGTTCTCATTACCCTC
AGATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACACTAAATAAATCGGGA
TCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCAACGATCCGGC
TGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACGCTGA
GCATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGAGTT
TTTTGCTGA.
```

Sedangkan sekuens yang terbentuk dari primer FTFdel_Rv adalah sebagai berikut:

```
CTTGAGTCCACCCGGGAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC
AGCCACTGGTCACAGGATTAAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCT
ACAGACTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGTT
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
TTTGTTTGCA.
```

Sekuens tersebut dianalisis dengan menggunakan program BLAST, hasilnya juga bukan merupakan gen *fif*. Hasil analisis sekuens ini sama dengan sebelumnya, yaitu vektor kloning dengan homologi 99%.

Sampel ketiga yang disekuensing merupakan amplicon hasil PCR dari plasmid rekombinan pO_ *fif*NS-4 yang diretransformasi pada *E. coli* TOP10. Produk PCR dari plasmid ini disekuensing secara langsung tanpa terlebih dahulu dikloning ke dalam vektor. Sekuensing langsung (*direct DNA sequencing*) terhadap produk PCR memfasilitasi dan mempercepat perolehan informasi sekuens. Selama reaksi PCR hanya menghasilkan produk tunggal atau ganda tetapi dapat dipisahkan, *direct DNA sequencing* dapat dilakukan (Dorit, Ohara, Hwang, Kim, Blackshaw, 2001).

Beberapa hal penting yang harus diperhatikan jika akan melakukan sekuensing langsung terhadap produk PCR antara lain: produk PCR mengandung amplicon tunggal, berukuran minimal 200-300 bp, dan reaksi PCR menghasilkan banyak produk (DNA Sequencing & Services, 2012). Produk PCR dari plasmid

pO_{ftf}NS-4 memenuhi ketiga hal tersebut sehingga mungkin untuk disekuensing langsung tanpa di klon ke dalam vektor.

Sebelum disekuensing, produk PCR harus dimurnikan terlebih dahulu dari amplikon yang tidak diinginkan, kelebihan primer, serta sisa dNTP dari reaksi. Produk yang tidak murni akan menghasilkan *messy* sekuens (DNA Sequencing & Services, 2012). Proses pemurnian dilakukan dengan menggunakan PrepEase Gel Extraction Kit dengan langkah kerja yang sama seperti sebelumnya. Hasil pemurnian produk PCR ini kemudian dikirim ke Lembaga Biologi Molekular Eijkman di Jakarta.

Hasil sekuensing langsung terhadap amplikon PCR plasmid pO_{ftf}NS-4 kemudian dibandingkan dengan sekuens yang terdapat pada *Gen Bank* menggunakan metode BLAST. Sekuens yang dihasilkan oleh primer FTFdel_Fw tidak dapat terbaca karena terlalu banyak *noise*. Seperti yang telah dibahas sebelumnya, hal ini sangat mungkin terjadi pada sekuensing langsung, yaitu jika produk PCR belum murni. Pada umumnya, purifikasi dengan elektroforesis gel agarosa cukup untuk memurnikan produk PCR. Namun pada beberapa kasus, dalam satu pita tunggal mungkin terdapat lebih dari satu produk amplikon PCR sehingga dibutuhkan metode yang lebih canggih untuk memurnikan amplikon tersebut. Proses sekuensing dilakukan dengan menggunakan satu primer, sedangkan PCR menggunakan dua jenis primer. Jika produk PCR belum murni dari sisa primer, hasil sekuensing tidak terbaca karena sekuensnya saling bertumpuk (Dorit, Ohara, Hwang, Kim, Blackshaw, 2001).

Sekuens yang dihasilkan FTFdel_Rv dapat terbaca walaupun tidak secara keseluruhan, yaitu sebagai berikut:

```
CCATTGTCGAATGGAACTCCCTTCTCCCATGGCAGGTAGGCTTC
ATCCCCCTTGACAGTAAAAATATTGGTATAAAGCTTACTACCATTATTG
AATTCCCACACACCTTGTTTACTTACTTAAAGCAATACCCTAGTTGTAC
TATCTGGATTAACCCTTAATAATGATGGA.
```

Elektroferogram hasil sekuensing dengan menggunakan primer FTFdel_Rv dapat dilihat pada gambar 4.9.


```

>gb|GQ466164.1| Weissella confusa strain MBFCNC-2(1) fructansucrase gene, complete
cds
Length=3534
Score = 215 bits (116), Expect = 9e-53
Identities = 148/164 (90%), Gaps = 0/164 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      CCATTGTCGAATGGAAGCTCCCTTCTCCCATGGCAGGTAGGCTTCATCCCCCTTGACAGTA 60
              |||
Sbjct 2309    CCATTGTCGAATGGAACGCCCTTCTCCCATGGCAGGTAGGCTTCATCCGCCTTGGCAGTC 2250

Query 61     AAAATATTGGTATAAAGCTTACTACCATTATTGAATCCCACACACCTTGTTTACTTACT 120
              |||
Sbjct 2249    ATAATATTGGTATTAAGCTTAGTAGCATTATTGAAGTCCCAAACACCTTGTTTAGTTACA 2190

Query 121    TAAAGCAATACCCTAGTTGTACTATCTGGATTAACCCCTTAATAA 164
              |||
Sbjct 2189    TAAAGCAATACCCTAGTTGTACCATCTGGATTAACCCGTAATAA 2146

```

Gambar 4.10. Perbandingan sekuens sampel 3 (produk PCR pO_*ftf*NS-4)-FTFdel_Rv dengan sekuens pada GenBank

Dari hasil ini, peneliti menganalisis bahwa *E. coli* BL21 StarTM Rekombinan pembawa gen *ftf* lengkap sudah tidak sesuai untuk digunakan sebagai sumber gen karena plasmidnya tidak lagi utuh. Ketidakutuhan plasmid ini bisa disebabkan oleh adanya instabilitas segregasi pada plasmid rekombinan. Instabilitas plasmid, atau bahkan hilangnya plasmid dari bakteri rekombinan merupakan hasil dari bertambahnya beban metabolik dari vektor pada sel *host* (Subhash, 2009).

Vektor plasmid mengalami mekanisme segregasi secara acak pada saat pembelahan sel sehingga *daughter cell* akan menerima ukuran vektor yang berbeda dari sel induk. Instabilitas segregasi ini berkorelasi langsung dengan ukuran plasmid, dimana adanya penambahan ukuran plasmid akan meningkatkan instabilitas segregasi (Ashwani, Subhash, 2009).

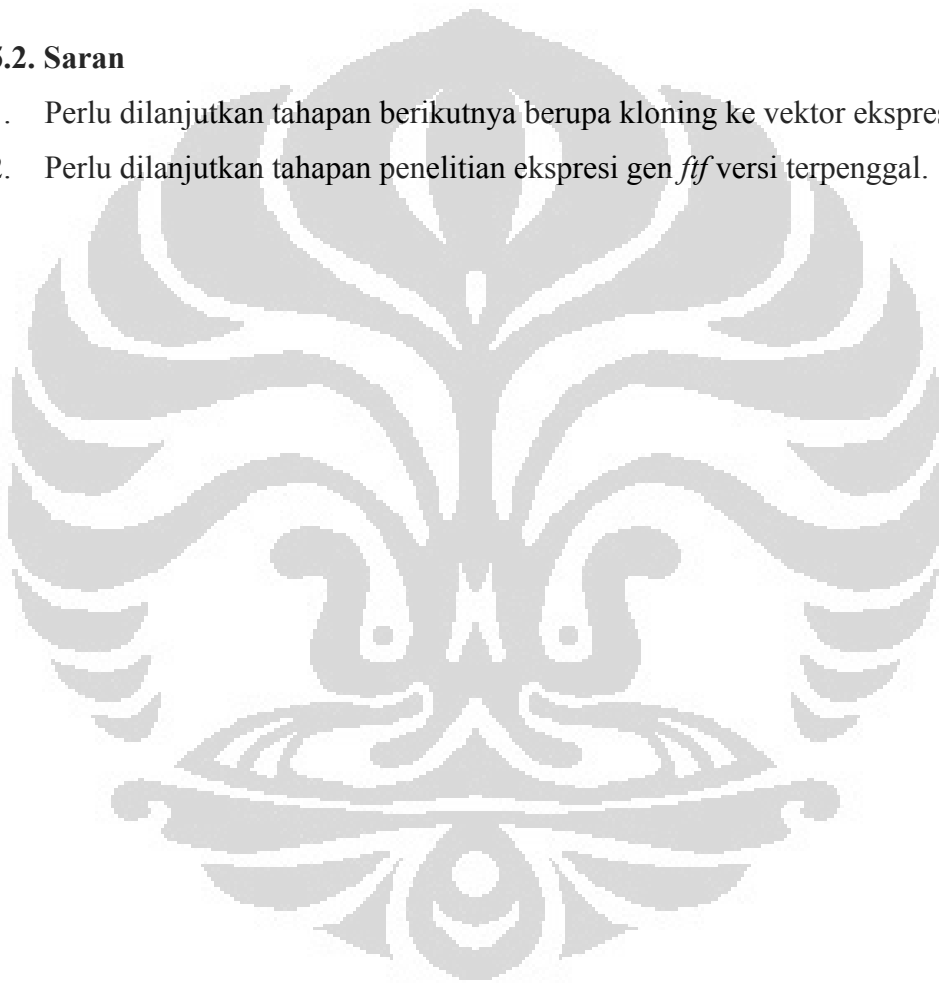
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Klon gen *ftf* versi terpenggal berhasil didapatkan dari PCR terhadap plasmid pO_*ftf*NS yang diretransformasi ke One Shot[®] TOP10 *Chemically Competent E. coli*.

5.2. Saran

1. Perlu dilanjutkan tahapan berikutnya berupa kloning ke vektor ekspresi.
2. Perlu dilanjutkan tahapan penelitian ekspresi gen *ftf* versi terpenggal.



DAFTAR ACUAN

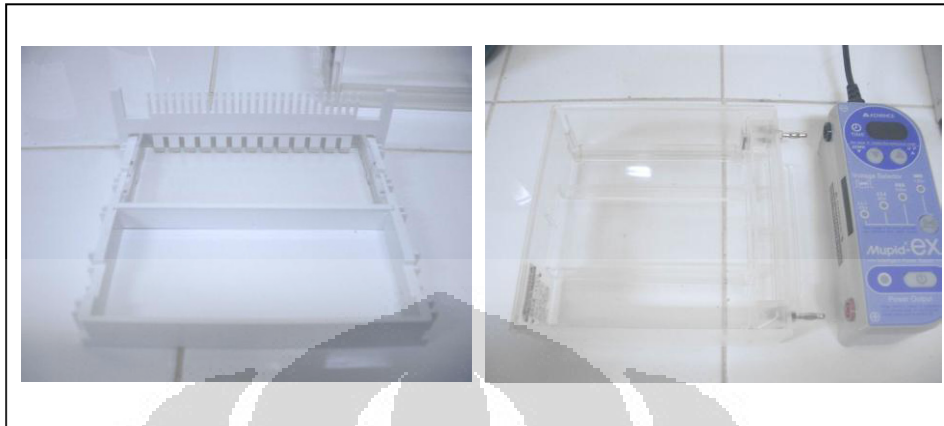
- Allison, Lizabeth A. (2007). *Fundamental Molecular Biology*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Alphey, Luke. (1997). *DNA Sequencing from experimental methods to bioinformatics*. Oxford: BIOS Scientific Publisher, Ltd.
- Amersham Biosciences. (1998). *PCR Product Analysis: a Guide to Using Semidry Flatbed Gel Electrophoresis*. UK: Amersham Biosciences Group.
- Amersham Biosciences. (2004). *Ready-To-Go PCR Beads*. UK: Amersham Biosciences Group.
- Anwar, Kralj, Pique, Leemhuis, van der Maarel, Dijkhuizen. (2010). Inulin and Levan Synthesis by Probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: Characterization of Three Novel Fructansucrase Enzymes and Their Fructan Products. *Microbiology*, 156, 000.
- Anwar, Kralj, van der Maarel, dan Dijkhuizen. (2008). The Probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 Prom Sucrose by Using an Inulosucrase Enzyme. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 4390-4398.
- Bio-Rads Laboratories. (2006). MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler Instruction Manual.
- Black, Jacquelyn G. (2008). *Microbiology: Principles and Exploration* 7th Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Blaber, Michael. (1998). *Prokaryotic Expression Vector*. February 04, 2012. <http://www.mikeblaber.org/oldwine/bch5425/lect25/lect25.htm>.
- DNA Sequencing & Services™. (Juni 2012). 1 hlm. PCR Product Direct Sequencing Support. http://www.dnaseq.co.uk/pcrdirect_support.html
- Doly, Bimboim. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research Oxford Journal*, 7(6), 1513-1523
- Dorit, Ohara, Hwang, Kim, Blackshaw. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology: Direct DNA Sequencing of PCR Products*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J. (1998). *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, Second Edition*. Washington: ASM Press.
- Hindley, J. (1983). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.
- Hinrich, Prinsen, dan Frijlink. (2000). Inulin Glasses for the Stabilization of Therapeutic Proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 215, 163-174.
- Invitrogen. (2006). Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits.

- International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (Juni, 2012). E. C. 3.2.1.17. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/17.html>
- Kopp, Jameson. (1998). *Principles of Molecular Medicine*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Li, Anderson, Yang, Lin, Yang. (2007). DNA Transformation via Local Heat Shock. *Applied Physics Letter*, 91, 01392.
- Lo, Y. M. D, ed., (1998). *Clinical Application of PCR (Method in Molecular Medicine)*. New Jersey: Humana Press.
- Lyons, Robert. (Juni, 2012). 1 hlm. Direct Sequencing of PCR Products. <http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/dnaseq/pcr.html>.
- Malik, Ariestanti, Nurfachtiyani, Yanuar. (2008). Skrining Gen Glukosiltransferase (GTF) dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Makara, Sains*, 12(1), 1-6.
- Malik, Amarila. (2009) *Penuntun Pelatihan Bioteknologi: Teknologi DNA dan Teknik PCR*. Depok: Laboratorium Bioteknologi Departemen Farmasi UI.
- Malik, Hermawati, Hestiningtyas, Soemiati, Radji. (2010). Isolasi dan Skrining Molekuler Bakteri Asam Laktat Pembawa Gen Glukansukrase dari Makanan dan Minuman Mengandung Gula. *Makara, Sains*, 14(1), 63-68.
- Malik, Amarila. (2012). Molecular Cloning and *in silico* Characterization of Fructansucrase Gene from *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) Isolated from Local Beverage. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 20, 33-43.
- Mathur, Chand. (2009). Model-based evaluation of Plasmid Segregational Instability in Repeated Batch Culture with recombinant *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Journal*, 153, 227-230.
- McEntyre & J, Ostell. (Ed.). (2002). *The NCBI Handbook*. Bethesda(MD): National Center for Biotechnology Information.
- Meulen, R. V. D. (2007). Screening of Lactic Bacteria Isolated from Dairy and Cereal Products for Exopolysaccharide Production and Genes Involved. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 250-258.
- Monsan, et al. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Elsevier International Daily Journal*, 11, 675-685.
- Mozzi, Raul, Graciela. (Ed.). (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Iowa: Wiley-Blackwell.
- National Center for Biotechnology Information. (2012). *Basic Local Alignment Search Tool*. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nick. (2007). The Basic: How Alkaline Lysis Work. <http://bitesizebio.com/articles/the-basics-how-alkaline-lysis-works/>.
- Nick. (2007). 5 Ways to Clean Up a DNA sample. <http://bitesizebio.com/articles/5-ways-to-clean-up-a-dna-sample/>

- Roberfroid, Marcel. (2005). *Inulin-Type Fructans Functional Food Ingredients*. Florida: CRC Press.
- Sato, Kumazawa, Yoshikawa, Kurusu. (2005). Transformation of *Escherichia coli* Mediated by Natural Phospholipid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (1), 235-237.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual Book*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Singh, Yadav, Ma, Amoah. (2010). Plasmid DNA Transformation in *Escherichia coli*: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6, 561-568.
- Tieking, Markus., et al. (2005). Molecular and Functional Characterization of a Levansucrase from the Sourdough Isolate *Lactoacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 655-663.
- Trevan, M. D., et al. (1988). *Biotechnology The Biological Principles*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing.
- Walker, John M. (Ed.). (1984). *Methods in Molecular Biology Nucleic Acids*. New Jersey: Humana Press.
- Van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen, van Geel-Schutten. (2006). Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 70, 157-176.
- Van Hijum, van Geel-Schutten, Rahaoui, van der Maarel, Dijkhuizen. (2002). Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4390-4398.
- Weaver, R. F. (2005). *Molecular Biology*, Third Edition. New York: McGraw Hill



LAMPIRAN

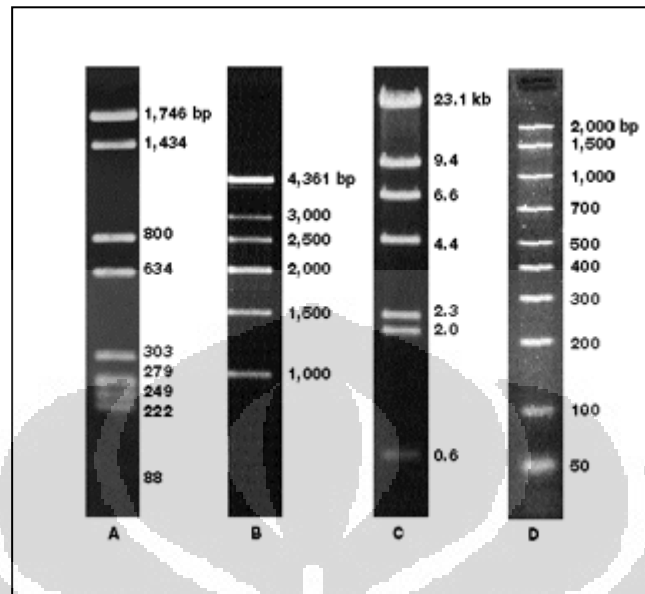
Lampiran 1: Gambar

Gambar 1. Alat Elektroforesis gel mini
[Mupid-Ex]



Gambar 2. UV Transluminator
[BDA Biometra TI 1]

(lanjutan)



Gambar 3. Berbagai penanda ukuran molekul DNA dengan berbagai range ukuran: 1 kbp dan 100 kbp



Gambar 4. *Thermal Cycler*

[MJ Mini BioRad]

(lanjutan)



Gambar 5. MiniSpin Eppendorf
[Sorvall]



Gambar 6. Laminar Air Flow

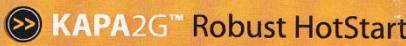
(lanjutan)



Gambar 7. Mikrosentrifus berpendingin

Lampiran 2: Technical Data Sheet KAPA 2G™ Robust HotStart

Technical Data Sheet



1. Product Description

KAPA2G Robust DNA Polymerase is a highly robust and versatile second-generation enzyme derived through a process of molecular evolution. The novel amino acid mutations in KAPA2G Robust DNA Polymerase offer superior performance compared to that 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 spurious amplification products resulting from non-specific priming events during reaction setup and initiation, and increases overall reaction efficiency.

Three KAPA2G Buffers and the proprietary additive, KAPA Enhancer 1, offer extended optimization options for diverse and difficult templates. Buffer A is specifically formulated for the unique characteristics of the enzyme, and offers improved yield, specificity and sensitivity. Buffer B is recommended for samples containing inhibitors and for Colony PCR. The GC Buffer is specifically designed for GC-rich amplicons or templates.

KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase has 5'-3' polymerase and 3'-5' exonuclease activities, but no 5'-3' exonuclease (proofreading) activity. The fidelity of KAPA2G Robust HotStart is similar to that of wild-type *Taq*; it has an error rate of approximately 1 error per 1.7×10^5 nucleotides incorporated.

DNA fragments generated with KAPA2G Robust HotStart have the same characteristics as those generated with wild-type *Taq* polymerase and may be used for routine downstream analyses or applications, including restriction enzyme digestion and sequencing. PCR products generated with KAPA2G Robust HotStart are A-tailed and may be cloned into TA cloning vectors.

2. Applications

KAPA2G Robust HotStart kits are ideally 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 a high GC or AT content.
- Templates containing common PCR inhibitors (e.g. salts, urea, SDS or ethanol) at levels inhibitory to wild-type *Taq*.
- Amplification from crude samples, e.g. Colony PCR.

Kit components*	Product codes		
	KK 5522 5532	KK 5515 5516	KK 5517 5518
KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 U/μl)	100 U	250 U	500 U
SX KAPA2G Buffer A (with MgCl ₂)	1.5 ml	3.0 ml	6.0 ml
SX KAPA2G Buffer B (with MgCl ₂)	1.5 ml	3.0 ml	6.0 ml
SX KAPA2G GC Buffer (with MgCl ₂)	1.5 ml	3.0 ml	6.0 ml
SX KAPA Enhancer 1	1.5 ml	3.0 ml	6.0 ml
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 ml	1.6 ml	1.6 ml
dNTP mix (10 mM each)	160 μl (KKS532 only)	300 μl (KKS516 only)	600 μl (KKS518 only)


*For the composition of larger kits, please refer to our website.

Storage, handling and specifications

Store all components at -20 °C for long-term use. Please refer to Section 5 for full details.

Quick Notes

- KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase offers robust performance across a wide range of template and amplicon types, improved tolerance to common PCR inhibitors and higher yield/sensitivity per unit of enzyme.
- Use 30 sec/kb extension time.
- Use 0.5 units KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase per 25 μl reaction, or 1 unit per 25 μl reaction for GC-rich or other difficult templates.
- Use optimized Buffer A, with or without KAPA Enhancer 1, for high yields, specificity and sensitivity.
- Use Buffer B for samples containing inhibitors and Colony PCR.
- The GC Buffer is specifically formulated for GC-rich amplicons and templates.
- The fidelity of KAPA2G Robust DNA polymerase is the same as that of wild-type *Taq*.
- KAPA2G Robust PCR products are A-tailed and may be used for all routine downstream analyses, e.g. cloning, RE digestion and sequencing.



www.kapabiosystems.com

Version 4.10

Lampiran 3: OneStep DNA Ladder

Wako ニッポンコジーン

Size Marker

OneSTEP Ladder 1kb
(1-10 kbp)

Code No. 310-05371

包装単位 500 µl

Lot No. 11000B

濃度 0.12 µg/µl

備考 長期間使用しない場合は4°Cで保存してください。

試験薬
保存 室温
長期保存 冷蔵

For Research Use Only

和光純薬工業株式会社
大阪府中央区東船場1丁目1番2号
東京府中央区日本橋本町1丁目1番13号
TEL:03(3270-8571)(代番)

株式会社ニッポンコジーン
富山県富山1丁目1番1号
TEL:076(481-6548)
FAX:076(481-6541)
http://www.nipponkogen.com

形状 10 mM Tris-HCl (pH7.9)
10 mM EDTA
20 mM NaCl
0.004% Bromophenol Blue
0.004% Xylene Cyanol FF
10% Glycerol

使用方法
・通常1レーンあたり5 µlで使用下さい。(写真参照)
・色素およびグリセロールを含有しているので調製の必要はございません。そのまま電気泳動ゲルにアプラインで使用下さい。

1% Agarose S
EtBr染色
1レーンあたり5 µl電気泳動した場合

●右レーン
OneSTEP Ladder 1kb (1-10 kbp)
●左レーン
OneSTEP Ladder 500 (0.5-5 kbp)

電気泳動度対応表

Orange G	Bromophenol Blue	Xylene Cyanol FF
約100 bp	約200 bp	約5000 bp
1% Agarose S	約300 bp	約1500 bp
2% Agarose S	約500 bp	約1500 bp
3% Agarose 21	約100 bp	約1000 bp

Agaroseの濃度と分離範囲

製品名	使用濃度範囲	分離範囲
Agarose 21	2~5%	0.01~1.0 (kbp)
Agarose X	2~6%	0.01~1.0 (kbp)
Agarose XP	1~4%	0.01~20 (kbp)
Agarose S	0.5~2%	0.5~30 (kbp)
Agarose HS	0.5~2%	0.5~30 (kbp)
Agarose L	0.5~2%	0.5~30 (kbp)
Agarose H	0.2~1%	1~200 (kbp)

10000 9000 8000 7000 6000 5000 4000 3000 2000 1000

DNA量 (µg/µl)

50 50 50 50 150 50 50 50 50 50

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

本品は、色素(核酸染色用)として販売しているものです。
医薬品の用途には使用しないでください。

HN01

(lanjutan)



Solis BioDyne
Data Sheet

100 bp DNA Ladder

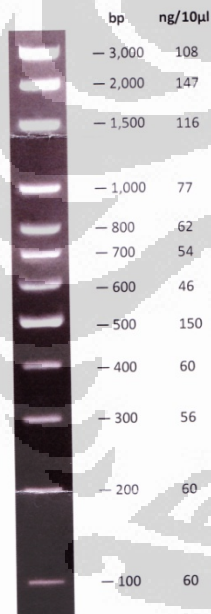
Ready to Load

Cat. No.	Pack Size	Conc.
07-11-0000S	2.5 µg SAMPLE	0.1 µg/µl
07-11-00050	50 µg	0.1 µg/µl

For *in vitro* use only

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.



Concentration:

0.1 µg/µl

Size range:

100 – 3,000 bp

No of Bands:

12

Recommendations:

For best results, please load 5-10 µl of the 100 bp DNA Ladder per well.

Storage solution:

10 mM EDTA, 10% glycerol, 0.015% bromophenol blue and 0.17% SDS.

Shipping and Storage conditions:

Shipping and storage for up to 9 months at room temperature has no detrimental effects on the quality of this reagent. -20°C is recommended for long term storage.

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 purchase of this product. Users should obtain the license if required

Related products:

Product name	Pack size	Cat. No.
FIREPol™ DNA Polymerase	500 U	01-01-00500
FIREPol™ DNA Polymerase	1000 U	01-01-01000
FIREPol™ DNA Polymerase	2000 U	01-01-02000
HOT FIREPol™ DNA Polymerase	500 U	01-02-00500
HOT FIREPol™ DNA Polymerase	1000 U	01-02-01000
dNTP SET (100 mM)	4 x 25 µmol	02-21-00100
dNTP SET (100 mM)	4 x 100 µmol	02-21-00400
dNTP MIX (20 mM of each)	20 µmol	02-31-00020
dNTP MIX (20 mM of each)	100 µmol	02-31-00100

Solis BioDyne

Riia 185a, 51014 Tartu, Estonia, tel: +372 740 9960, fax: +372 740 2079, e-mail: solis@sbd.ee, www.sbd.ee

Lampiran 4: Pembuatan Reagen

No.	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Natrium hidroksida 5 N	Sebanyak 20 g natrium hidroksida dilarutkan dalam aquades hingga tepat 100 ml.
2.	Asam klorida 1 N	Sebanyak 10 ml larutan asam klorida 12 N ditambahkan aquades hingga tepat 120 ml
3.	Dapar STET	Sebanyak 32 g sukrosa, 2,42 g tris-base, dan 7,4448 g EDTA dilarutkan dalam sejumlah aquabides. Kemudian tambahkan 0,4 ml triton x-100 ke dalam larutan tersebut, kocok hingga homogen. pH larutan disesuaikan hingga 8,0. Kemudian tambahkan aquabides hingga tepat 400 ml dan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
4.	Lisozim 10 mg/ml	Sebanyak 10 mg lisozim dilarutkan dalam 1 ml tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Larutan disimpan dalam freezer.

(lanjutan)

5. Proteinase K 25 mg/ml	Sebanyak 25 mg Proteinase K dilarutkan dalam 1 ml aquabides steril ambil divortex. Larutan disimpan dalam freezer.
6. Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10%	Sebanyak 10 g sodium dodesil sulfat dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 100 ml.
7. Natrium Klorida 4 M	Sebanyak 93,6 g natrium klorida dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 400 ml. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
8. <i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> (CTAB)	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 masukkan larutan natrium klorida yang telah dibuat sebelumnya ke dalam larutan CTAB dan tambahkan dengan aquabides hingga tepat 100 ml. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.


(lanjutan)

9. Dapar Tris Asetat EDTA (TAE) 50X	Sebanyak 24,2 g tris-base, 5,71 ml asam asetat, dan 10 ml EDTA 0,5 M dilarutkan dalam aquades. Lalu pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan asam asetat 1 N dan tambahkan dengan aquades hingga 100 ml. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
10. Dapar Tris Asetat EDTA (TAE) 1X	Sebanyak 5 ml dapar TAE 50X dilarutkan dengan aquabides hingga tepat 250 ml. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
11. Dapar Tris EDTA (TE)	Sebanyak 1,0 ml Tris-HCl 1,0 M (pH 8,0) dan 0,2 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) dilarutkan dalam aquabides hingga 100 ml. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
12. Dinatrium edetat 0,5 M	Sebanyak 18,6 g dinarium edetat dilarutkan dalam sedikit aquabides. Larutan ditambahkan natrium hidroksida 5 N hingga larut dan mencapai pH 8,0. kemudian tambahkan aquabides hingga tepat 100

(lanjutan)

	ml. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
13. Asam asetat 1 N	Sebanyak 10 ml asam asetat glasial 12 N ditambahkan aquades hingga tepat 120 ml.
14. Tris-base 1 M	Sebanyak 22,228 g tris-base dilarutkan dalam aquabides hingga tepat 200 ml. Kemudian larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
15. Tris-HCl 10 mM pH 8	Sebanyak 0,4 ml tris-base 1 M dilarutkan dalam sedikit aquabides. pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan HCl 1N. Kemudian tambahkan aquabides hingga tepat 40 ml. Larutan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.

Lampiran 5: Certificate of Analysis One Shot® Chemically Competent *E. coli*



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

Certificate of Analysis

Part No./Catalog No. C404010
Lot Number: 988535A

Transformation Efficiency

50 µl of competent cells are transformed with 10 pg 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 1.0×10^9 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 15 µg/ml tetracycline, indicating the absence of any tetracycline resistance markers.

Untransformed cells must show no growth on LB plates containing 15 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. 4,981,797 and foreign equivalents.

1

Lampiran 6: *Product Specification* FTFdel_Fw

@netikebat C:



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

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

Invoice reference: None
Invoice address: customer number 1453

General information

Volume: Your oligo is originally dissolved in 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 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!

Product specification**Oligo Data**

Order number: 39411
 Lab number: 160190 / 00140941_5
 Order date and time: Mon Jan 9 08:04:07 2012
 Oligo name: FTFdel_Fw
 Oligo comment: None
 Sequence:
 ATG TTA AGG AAT AAT TAT TTT GGA
 GAG ACT AAA ACG
 Total length: 36
 Number modifications: 0
 Unmodified length: 36
 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: 11195.44
 Modified mol weight: 11195.44
 Od: 7,1
 Yield [nmol]: 16,2
 Yield [micro gram]: 180,8
 Vol.f.100pmol/μl: 162 ✓ 162 μl
 T(m): 69.59
 T(a): 64.59
 C/G content: 27.77

ambil 10 μL →
 + 40 air milliQ

$$\frac{100 \text{ pmol}}{\mu\text{L}} = \frac{20 \text{ pmol}}{x \mu\text{L}}$$

$$100x = 20 \mu\text{L}$$

$$x = \frac{1}{5}$$

Lampiran 7: Product Specification FTFdel_Rv



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

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

Invoice reference: None
Invoice address: customer number 1453

General information

Volume: Your oligo is originally dissolved in 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 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!

Product specification**Oligo Data**

Order number: 39411
 Lab number: 160191 / 00140941_6
 Order date and time: Mon Jan 9 08:04:07 2012
 Oligo name: FTFdel_Rv
 Oligo comment: None
 Sequence:
 CTG TGG ATC CAC AAA ATT AGT AAC
 CGC TGC
 Total length: 30
 Number modifications: 0
 Unmodified length: 30
 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: 9176.04
 Modified mol weight: 9176.04
 Od: 7,0
 Yield [nmol]: 20,9
 Yield [micro gram]: 191,9
 Vol.f.100pmol/μl: 209 ✓ 209 μl
 T(m): 67.23
 T(a): 62.23
 C/G content: 46.66

Lampiran 8: *Product Specification T7 Forward***Product specification**

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

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

Invoice reference: None
Invoice address: customer number 1453

General information

Volume: Your oligo is originally dissolved in 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 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: 39411
 Lab number: 160192 / 00140941_7
 Order date and time: Mon Jan 9 08:04:07 2012
 Oligo name: Primer universal T7_Fw
 Oligo comment: None

Sequence:

TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Total length: 20

Number modifications: 0

Unmodified length: 20

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: 6126.08

Modified mol weight: 6126.08

Od: 5,4

Yield [nmol]: 23,3

Yield [micro gram]: 142,9

Vol.f.100pmol/μl: 233 ✓ 233 μl

T(m): 54.78

T(a): 49.78

C/G content: 40.00

Lampiran 9: Product Specification T7 Universal Reverse



CYBERGENE AB

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

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

Invoice reference: None
Invoice address: customer number 1453

General information

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

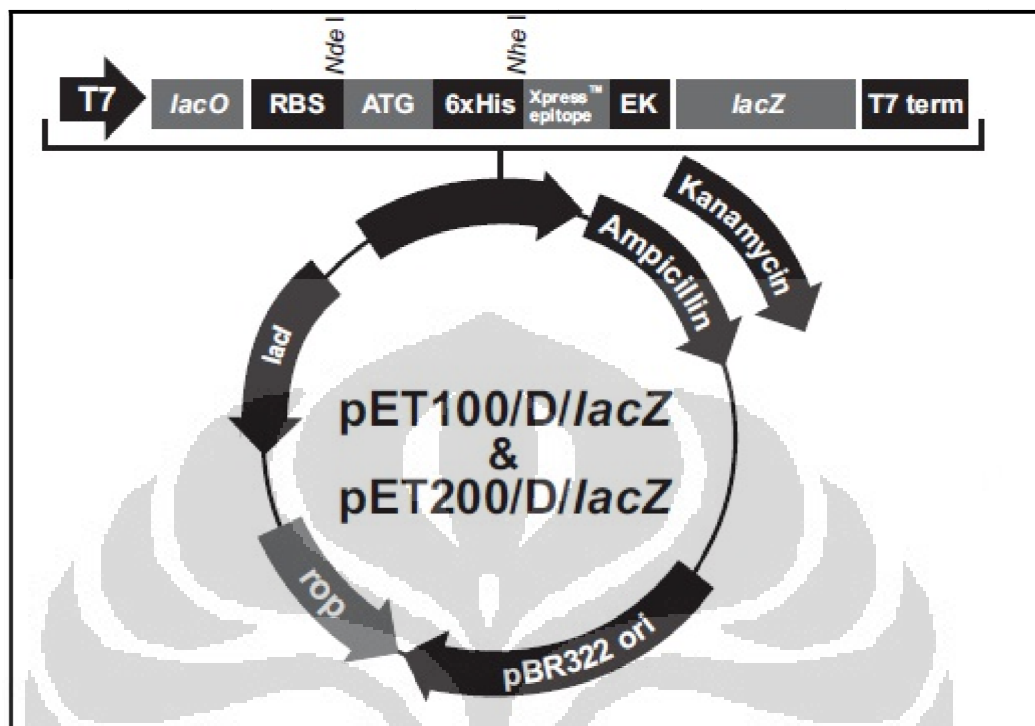
Storage: In general oligonucleotides (non-labelled) can be stored for more than a year with little or no degradation. They can be stored in media (such as water, ammonia, 20% acetonitrile, dilute buffer containing EDTA, salt etc.) or as a dry pellet. The most important is to keep them cold to avoid bacterial growth and minimize degradation. Avoid storing oligos in solutions that are mutagenic, oxidizing or outside the pH range of 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!

Product specification

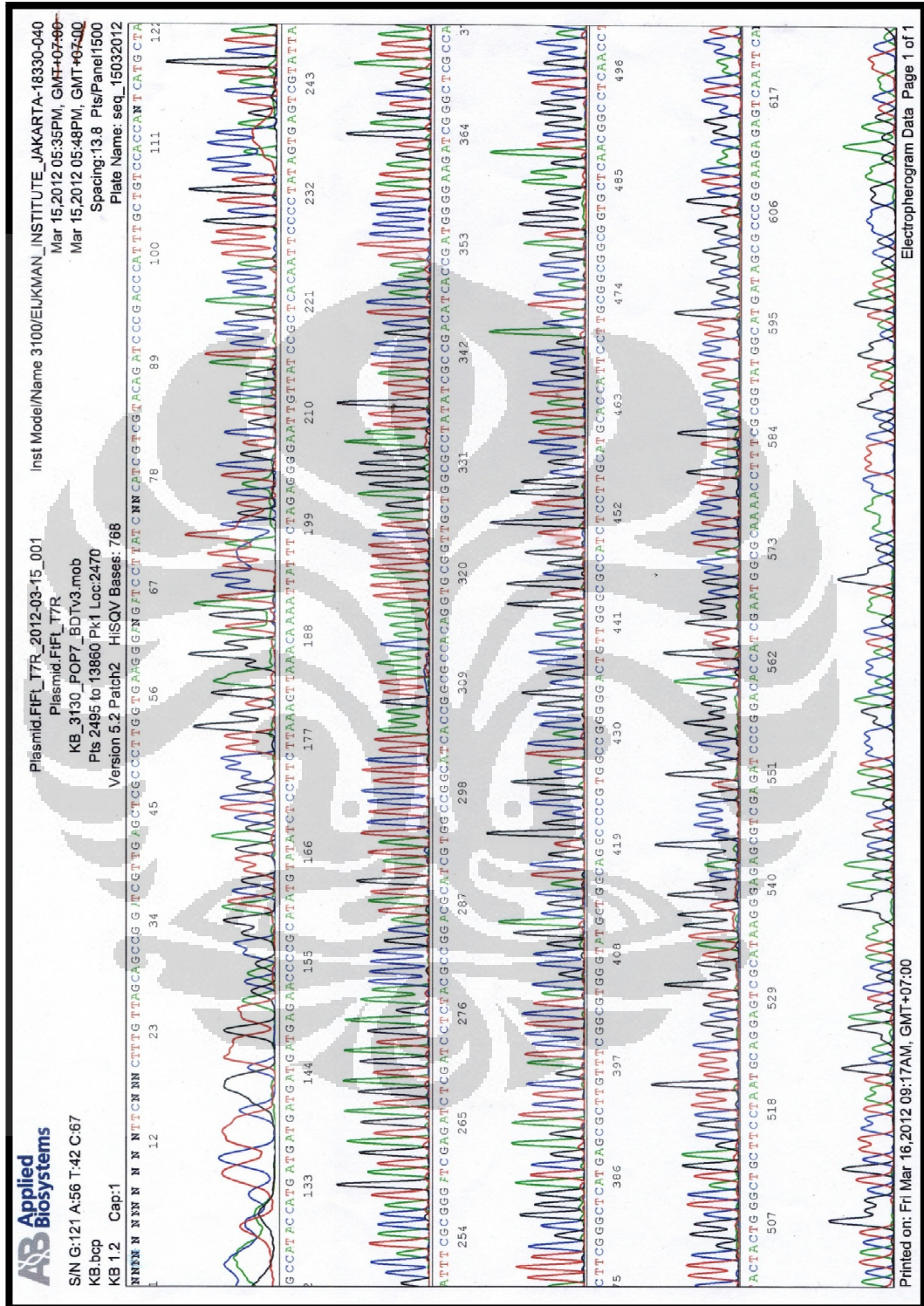
Oligo Data

Order number: 39411
Lab number: 160193 / 00140941_8
Order date and time: Mon Jan 9 08:04:07 2012
Oligo name: Primer universal T7_Rv
Oligo comment: None
Sequence:
GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G
Total length: 22
Number modifications: 0
Unmodified length: 22
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: 6798.48
Modified mol weight: 6798.48
Od: 5,1
Yield [nmol]: 21,7
Yield [micro gram]: 147,5
Vol.f.100pmol/µl: 217 ✓ 217 µl
T(m): 59.42
T(a): 54.42
C/G content: 54.54

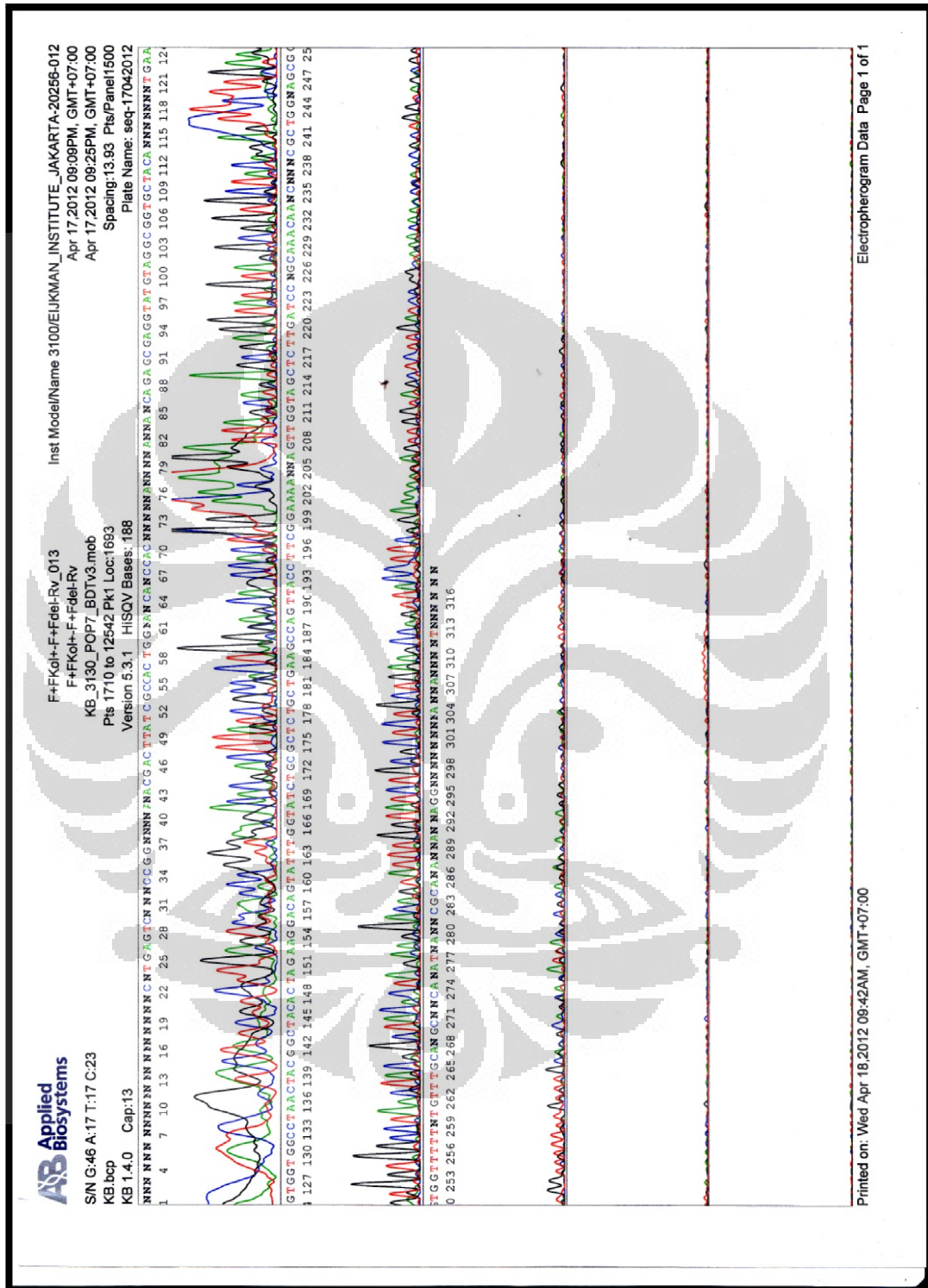
Lampiran 10: Peta Vektor Champion™ pET 100



Lampiran 11. Elektroferogram sampel 1 (plasmid) dengan menggunakan primer T7 Reverse.



Lampiran 13. Elektroferogram sampel 2 dengan menggunakan primer FTTFdel_Rv



Lampiran 14. Sekuens Gen *fff* Lengkap dan Terpanggal

```

atgттааgga атааttattt tggagagact aaaacg catt ataaattata taaatgcggt
aagaactggg ctgtcatggg gatttcatta ttttcgctgg gatttagggat gctagttacc
agccagccag tgtcagctga tgtgacagcc accagcacct caagcagtgц агtgaggact
gatgcgatca gtgaaagtag tagcagtgca gcaaaggccg aaacgactag tgcaagtagt
agcagtgцag tgaaggccga aacgactagt gcaagtagta гcagtgцagt gaaggccgaa
acgactagtг caagtagtag cagtгcagtg gaggccgaaa cggctгcгat cactactгca
ggtgттgcaa атаатgattc аcaaacatca гcagaagtaa ccгctгactc tacttctacc
agccaagtгg таactaата ttccaатаат caaaатаата cagcacagcc агccгgtaac
tctacaagta гgacгcaate аaccaaccag гctaattccc ааатаtctaa таaggcaaa
ctcaaccaat ttgccacagг cттtgтааac cгtgctattt ctgaagtgгc таacгtгcгac
ccgaataact tcaccagгc acagatгcгac гcactгaaca агттggaaaa gtattctata
actaagaaga атаctгatac аactcagттc acttactatc агттccaaca гacagctгac
aagттggгctг аггттgatcc тcaatатгct аттcттact тcaagгctга ccaaattcaa
aacctaccгг cagcaaccгc таaagatгgt caaatгггca аagттгctaa catggatatt
tgгgattcat гgccгgtcca агaccaact acagгtgaaa тттctaactг gaatгgtaaг
caattгггта ttгcгatгat гggaacacca аatгccaaca гтаaccact ttacttactt
tacaatгact атггтгггга caattттгca гgatгgaaga атгctгггca тattттггc
ггттatcatг gtгacaagaa аactггтctг gaaattттг атgatcaaga атггтcagгt
tcagcttacc cгттaacгa тггттcaate caactгттct acacacacag таactacгag
actaagacaa ттаaccatca аaaccaccag cгtattгcta ccгctaactt gaagatгаag
ttaaatactг атгgaaccat тteгattгct агттггaca атgatcacac cctcттгag
ггgaaggгata атгcttcagc caatгgaact cattatcaaa cattгgacca атгггctcac
aatгtgacta тgттгacгг ccaccaagaa гactттгггг гcгctгataa cттгctatг
cгtgaccctc acattггтаа агatagтcaa гgтаaccгтт атctггтatt тgaagctagt
accгgtгагt агgattacca агtгаagat caaatttatг атctгcгtaa ctatггггc
aatгctaagt тccaactгga агtctattt аacctcatca аcaacгacta cagcгtcatг
gataaggгaa ctгgaaaaat гattaaaatt гgccгtgaca тgцгггггcг тgactгcгag
гccaatгcгc caattггtat тattaaacta ггтггcactг агаатаacc аaccгттгc
gaagттtatг acccaattat тtcagccгг атггтаagтг acгaaattга acгtctгac
atгgтаaaaa тггггacac ctactatctг тттгctгctt cacгccttaa тcггггtacc
aatгatгctг cттггггaa агccaacгac аaagтcггг аcaacгtagt таcгctггc
тггtactcca агgacttaac аaaagгctтt аagccaacta атгgcaatгг тгттгcctt
acttctacag тtctгcaa ctггггact гccaagтatt catattatгc агтаccaacг
cгcagcactг атccacггтт таagaacact гtattgatca cagcttacet гactaaccгt
aatcгггттг ctгattaccг таacaagat гgтаaagctг тctгgгatcc тgattttatt
caagagaata acггггаaca eaactctact тggгctcat cattcttatt acгггttaat
ccagatггта caactagггt аттгccttat гтаactaacc аagгггттг гgacttcaat
aatгctacta агcttaatac caatattatг actгccaagг cгgatгаagc ctaccтгcca
тгггagaagг гcгттccatt cгacaatгga тctatcctag гcagтггcca gtattгггта
gatagcatгc caagтgaecc атаcattcca actгcгccta ctгctгггac тccagгtacc
acгггcactг ccггtactcc аггtaccacг гgcaactгccг гtactccagг тaccгcгггc
actгccггта ctccagгtac cгcгггcact гccgaaaccг cccaactгa аccaagcaag
ccaactactc таcaaaatcc ггттcagгct гттcaagcag cггттactaa тттггггat
ccacagттгc ctcaaactгг тgcaactгat caacaacaca таacгctгag тггcttatta
ctattagcca тgagtagттt гttagгactc тtcagaatга cтаagcггca гcгcaaaгaa
taggatгata тtatcatгct аaatcatcгг caaactaaga accagттгa гagcttaaca
accctгcaag ctattcagaa тcagгcatac cagatгттгг тgтаaggact гgcaaaaact
гactттtcaa тgцггagтг гggaatatta гtctatctтг аacaatатгг гcaagctact
гctagtгаat тatctгatгc аттcagгтc acгcгcacac таatttccag гаatactгг
cгattгattc аagataattt аattcaatca caagтгаatc caaatгatcг acгagттгтт
тггctatctt тgactггтаа тггccaagaa агггтccagг аagгггттcг гcaagтгcaa
gaaaatttaa аaactттcaa ccaaagтcac гattтггaga агттгactaa аcaagтгaa
actттгtcac аacaactггc таagataaat таaaagттt тcaaagтаag таaagatгcc
ttaatгтаaa tagagatcгг тccгttaaaa ccctтгггтт тgagtagгcc ггтctттtat
тgaagтгаag caaatttaa cattaagatt аattттггc тgtгacaata атcattттгt
ataaccaagт аatcaatcag гcactacaag тггctaagcг тtcccctгтт аaaagгггтт
agataaaaaat гтттctггac гттттttata татаatгagт аaagтгттта gatagcггta

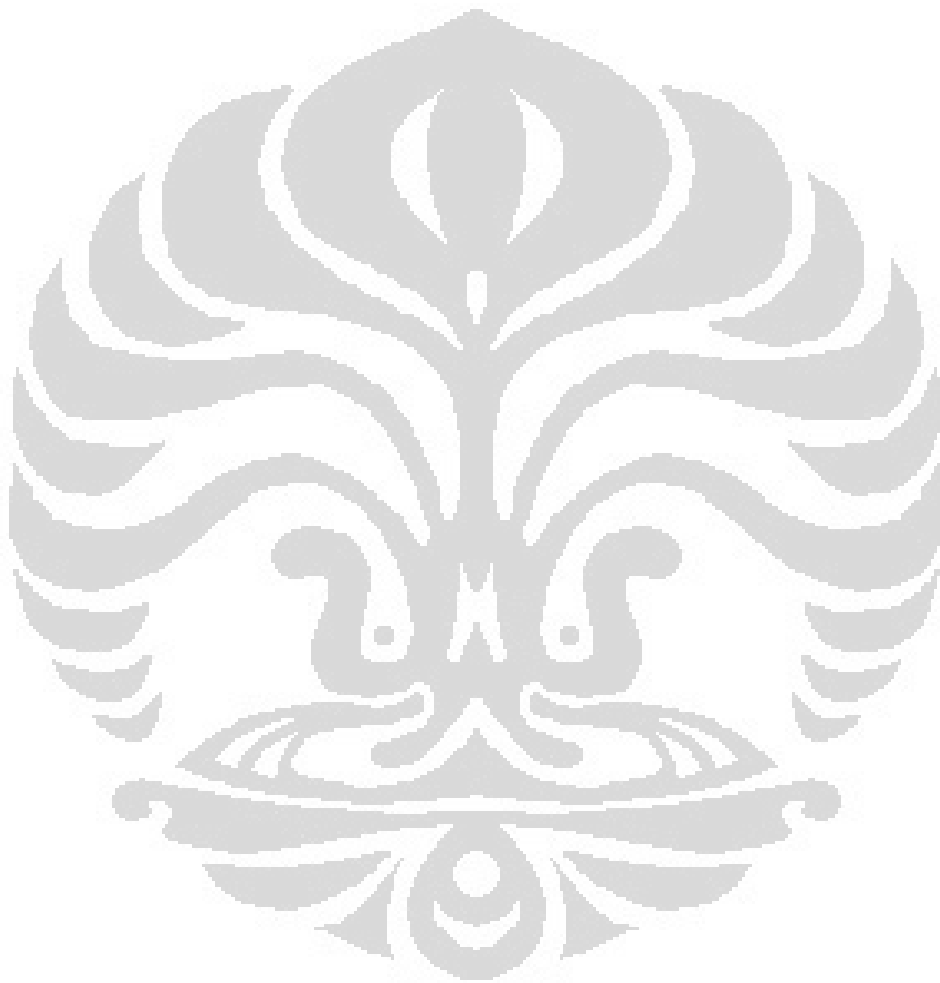
```

(lanjutan)

```
aatcaggcca taacttaaca attgtgtcgc tttttttgtg cttataatt aaagtggtta  
aaatagtcga taacttacct ccataaagca gtccaattaa tttattgact tcta
```

Keterangan:

Sekuens kuning	: Primer forward (FTFdel_Fw)
Sekuens biru (turquoise)	: Primer reverse (FTFdel_Rv)
Sekuens abu-abu+kuning+biru	: ranah gen <i>ftf</i> terpenggal



Lampiran 15. Perbandingan sekuens amplikon PCR pO_{ftf}NS-4 dengan sekuens pada Gen Bank

6/13/12 NCBI Blast:Nucleotide Sequence (170 letters)

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GQ466164.1	Weissella confusa strain MBFCNC-2(1) fructansucrase gene, complete cds	215	215	95%	9e-53	90%	

Alignments

>gb|GQ466164.1| Weissella confusa strain MBFCNC-2(1) fructansucrase gene, complete cds
Length=3534

Score = 215 bits (116), Expect = 9e-53
Identities = 148/164 (90%), Gaps = 0/164 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      CCATTGTCGAATGGAACCTCCCTTCTCCCATGGCAGGTAGGCTTCATCCCCCTTGACAGTA 60
Sbjct 2309-   CCATTGTCGAATGGAACGCCCTTCTCCCATGGCAGGTAGGCTTCATCGGCCTTGGCAGTC 2250

Query 61     AAAATATTGGTATAAAGCTTACTACCATATTGAATTCACACACCTTGTACTACT 120
Sbjct 2249   ATAATATTGGTATTAAGCTTAGTAGCATTATTGAAGTCCCAAACACCTTGGTTAGTTACA 2190

Query 121    TAAAGCAATACCCTAGTTGTACTATCTGGATTAACCCCTAATAA 164
Sbjct 2189   TAAGGCAATACCCTAGTTGTACCATCTGGATTAACCCGTAATAA 2146
  
```