

Amplifikasi *in vitro* Gen *cobU* *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288

Retno Lestari¹, Abdul Latif², Danang Waluyo², Laily Nur Inayah², Dina Rahmi¹

¹Laboratorium Genetika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

²Laboratorium Teknologi Gen, Bioteknologi, BPPT, Puspiptek Serpong

retno4_ui@yahoo.com

dina.rahmi@gmail.com

Abstrak

Gen *cobU* *Pseudomonas denitrificans* merupakan salah satu gen yang berperan dalam tahap akhir sintesis vitamin B₁₂. Gen *cobU* menyandi enzim *nicotinate nucleotide: dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase* (NN: DMBI PRT). Gen *cobU* *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 telah diamplifikasi menggunakan PCR dengan primer-primernya spesifik, *cobU5* (23 mer) dan *cobU6* (23 mer). Kedua primer tersebut memiliki suhu leleh 54° C dan kandungan GC sebesar 56%. Primer-primernya didisain berdasarkan publikasi Cameron *dkk.* (1991). DNA diisolasi dari *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 menggunakan *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit[®]*. Kondisi amplifikasi dioptimasi pada suhu *annealing*, pada kisaran 50–55° C, suhu optimal yang diperoleh adalah 52° C. Produk amplifikasi dianalisis dengan teknik elektroforesis gel agarosa 1%. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa proses amplifikasi berjalan kurang spesifik, terdapat pita gen *cobU* dengan ukuran yang diharapkan (1.124 pb) dan pita-pita lainnya. Hasil tersebut kemudian dipurifikasi untuk digunakan dalam pengklonan gen *cobU*.

Keywords: amplification; *cobU* gene; PCR; *Pseudomonas denitrificans*; vitamin B₁₂

1. PENDAHULUAN

Vitamin B₁₂ atau kobalamin merupakan vitamin unik karena dihasilkan secara eksklusif oleh beberapa jenis bakteri dan *archaea* melalui dua jalur, yaitu jalur aerob dan anaerob. Contoh bakteri penghasil vitamin B₁₂ dengan menggunakan jalur aerob adalah *Pseudomonas denitrificans* Schlegel, sedangkan contoh bakteri penghasil vitamin B₁₂ dengan menggunakan jalur anaerob adalah *Propionibacterium shermanii* Sherman [1]. Manusia tidak dapat menyintesis vitamin B₁₂ di dalam tubuhnya, sehingga membutuhkan asupan berupa makanan yang mengandung vitamin B₁₂ seperti ikan, susu, produk-produk susu, telur, dan daging [2].

Manusia membutuhkan vitamin B₁₂ sekitar 1–2 µg per hari untuk pembentukan sel darah merah, sintesis DNA, dan menjaga sel saraf agar tetap baik. Defisiensi vitamin B₁₂ dapat menyebabkan anemia pernisiosa, jantung, *stroke*, *atherosclerosis*, dan kelainan pada saraf (penyakit Alzheimer) [3,4].

Kebutuhan bahan baku vitamin B₁₂ di Indonesia sekitar 6–7 ton per tahun dan baru dapat dipenuhi melalui impor. Impor bahan baku tersebut digunakan oleh perusahaan-perusahaan farmasi peracik obat

vitamin B₁₂, sebagai suplemen untuk meningkatkan nilai nutrisi produk makanan, dan suplemen untuk pakan ternak [5].

Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) telah mengembangkan teknik-teknik untuk meningkatkan produksi vitamin B₁₂ dengan menggunakan bakteri *P. denitrificans* secara fermentatif, namun kapasitas produksinya masih rendah. Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas vitamin B₁₂ melalui teknik rekayasa genetika dengan mengklonasi gen-gen yang terlibat dalam tahap akhir sintesis vitamin B₁₂, kemudian diekspresikan kembali ke galur semula yaitu bakteri *P. denitrificans*. Teknik rekayasa genetika tersebut diharapkan dapat menghasilkan peningkatan produktivitas vitamin B₁₂. Peningkatan produktivitas terjadi karena overekspresi dari gen-gen tersebut [6].

Jalur biosintesis vitamin B₁₂ pada *P. denitrificans* melibatkan sedikitnya 22 gen *cob*. Gen *cobU* merupakan salah satu gen yang berperan pada tahap akhir sintesis vitamin B₁₂. Gen *cobU* menyandi enzim *nicotinate-nucleotide: dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase* (NN: DMBI PRT). Enzim tersebut mengkatalisis sintesis *1-α-D-ribofuranosyl-5,6-dimethylbenzimidazole 5'-phosphate (α-ribazole*

5'-phosphate) dari 5,6-dimethylbenzimidazole (DMBI) dan β -nicotinic acid mononucleotide (NAMN) (Gambar 1). Produk enzim NN: DMBI PRT yaitu *a-ribazole 5'-phosphate* akan menjadi salah satu substrat untuk pembentukan *ado-cobalamin 5'-phosphate* yang merupakan bahan akhir pembentukan koenzim vitamin B₁₂ [7].

Perbanyakkan kopi gen *cobU* dengan cara mengklona gen tersebut diharapkan dapat meningkatkan produksi vitamin B₁₂. Pengklonaan dan manipulasi gen pada *P. denitrificans* masih belum berkembang sehingga pada penelitian dilakukan pengklonaan dan analisis gen *cobU* ke dalam *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers JM109. Amplifikasi *in vitro* gen *cobU* *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 bertujuan untuk memperoleh kopi gen *cobU* dalam jumlah yang cukup banyak untuk digunakan dalam pengklonaan dan analisis gen *cobU*.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Gen, Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT, Serpong selama 6 bulan (September 2004–Februari 2005). Kultur bakteri *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMC B12 F942/288 pada medium Luria Bertani (LB) agar, disimpan dalam freezer -4° C. Medium dalam penelitian adalah medium LB cair dan LB agar. Bahan kimia dalam penelitian adalah akuades, ddH₂O [Gibco], etanol teknis, dapar TAE, Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit [Promega], Wizard[®] SVGel & PCR Clean-up System [Promega], dATP, dCTP, dGTP, dTTP [Promega], MgCl₂ [Promega], enzim AmpliTaq DNA polymerase dan dapar 10x [Applied Biosystems], 100 pb DNA Ladder [Invitrogen], 1 kb DNA Ladder [Promega], serta sepasang oligonukleotida sebagai primer [Invitrogen] yaitu: CobU5 : 5' CCG ATT GGC GCA AAT GTC GTT GC 3' 23 mer
CobU6 : 5' AGC CCG GCC GGA ACT TCA CTA TT 3' 23 mer
Peralatan dalam penelitian adalah tabung sentrifus 1,5 ml [Eppendorf], tabung PCR [Applied Biosystems], pipet mikro [Socorex dan Thermo LabSystems], spektrofotometer [Shimadzu UV-160A], mesin PCR thermal cycler [Applied Biosystems], elektroforesis gel agarosa [BioRad], mikrosentrifus [Tomy], dan peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

Sumber gen *cobU* yang akan diamplifikasi merupakan DNA genom *P. denitrificans* yang telah diisolasi dari kultur bakteri tersebut. Isolasi DNA genom *P. denitrificans* dilakukan berdasarkan metode Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit [9]. Hasil isolasi DNA genom dianalisis dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 0,8% dengan penanda DNA 1 kb. Kemurnian dan konsentrasi DNA genom

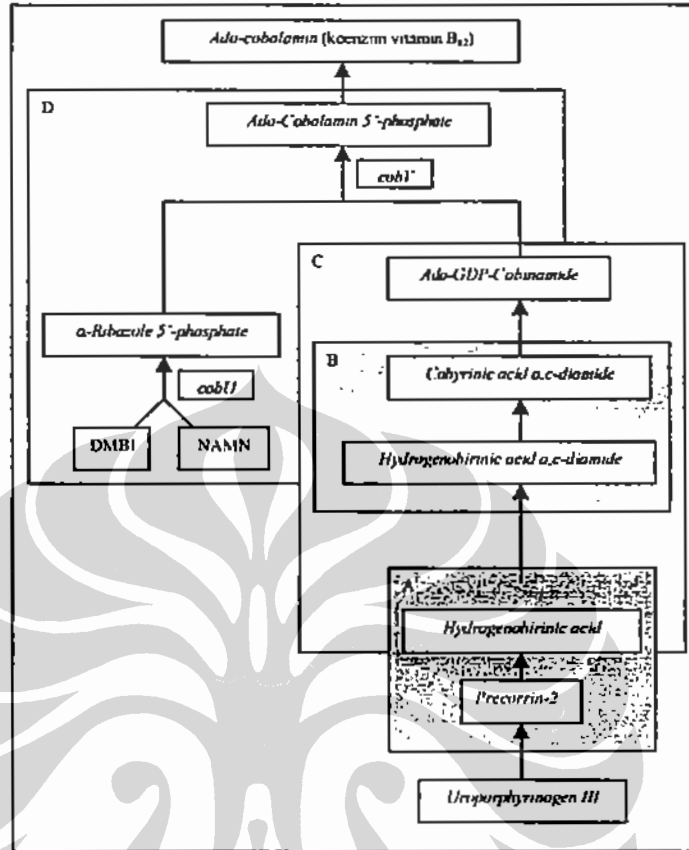
diukur dengan teknik spektrofotometri. Amplifikasi *in vitro* gen *cobU* dengan metode PCR dilakukan berdasarkan metode Sambrook dan Russell [10]. Larutan reaksi amplifikasi terdiri dari DNA genom sebanyak 300 ng sebanyak 1 μ l, dapar PCR 10x sebanyak 2,5 μ l, dNTP (konsentrasi masing-masing dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP adalah 0,2 mM) sebanyak 2 μ l, MgCl₂ (1,5 mM) sebanyak 1,5 μ l, enzim AmpliTaq DNA polymerase (1,25 U) sebanyak 0,25 μ l, serta primer CobU5 dan CobU6 (0,5 μ M) kemudian ditambah ddH₂O hingga 25 μ l. Kondisi PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94° C selama 10 menit. Tahap selanjutnya dilakukan sebanyak 30 siklus dengan tahapan denaturasi pada suhu 94° C selama 30 detik, annealing dengan suhu 52° C selama 1 menit, dan polimerisasi pada suhu 72° C selama 1 menit 30 detik. Proses tersebut berulang sebanyak 30 siklus. Tahap akhir PCR diperpanjang dengan inkubasi pada suhu 72° C selama 10 menit. Hasil PCR disimpan dalam kulkas pada suhu 4° C. Sampel seluruhnya (25 μ l) dianalisis dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1% dan penanda DNA 100 pb.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi DNA genom *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288

Konsentrasi hasil isolasi DNA genom *P. denitrificans* dihitung menggunakan teknik spektrofotometri. Menurut Sambrook dan Russell [10], asam nukleat mengabsorpsi kuat radiasi sinar ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm. Metode spektrofotometri tidak dapat membedakan DNA dan RNA. Penambahan RNase pada proses pengisolasian bertujuan untuk menghindari kontaminasi RNA pada hasil isolasi DNA. Satu unit OD₂₆₀ DNA untai ganda setara dengan 50 μ g/ml DNA [10]. Hasil isolasi DNA yang diperoleh menunjukkan absorbansi OD₂₆₀ sebesar 0,424 (Tabel 1). Berdasarkan nilai absorbansi tersebut, maka konsentrasi hasil isolasi DNA genom adalah 2.120 ng/ μ l (Lampiran 1). Menurut Henegariu [11], jumlah DNA genom dalam reaksi PCR adalah kurang dari 500 ng. Hasil isolasi DNA genom yang diperoleh cukup untuk digunakan dalam proses PCR.

Hasil isolasi DNA genom *P. denitrificans* dihitung kemurniannya dengan penghitungan rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) [10]. Rasio absorbansi DNA genom yang diperoleh adalah 1,89 (Tabel 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA yang diperoleh cukup murni. Menurut Clark dan Christopher [12], protein menyerap kuat radiasi sinar



Gambar 1. Jalur biosintesis vitamin B₁₂ pada *Pseudomonas denitrificans* [8]

Tabel 1. Pengukuran spektrofotometri hasil isolasi DNA

Hasil isolasi DNA	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Pengenceran	Konsentrasi (ng/μl)
Genom <i>P. denitrificans</i>	0,424	0,224	1,89	100	2.120

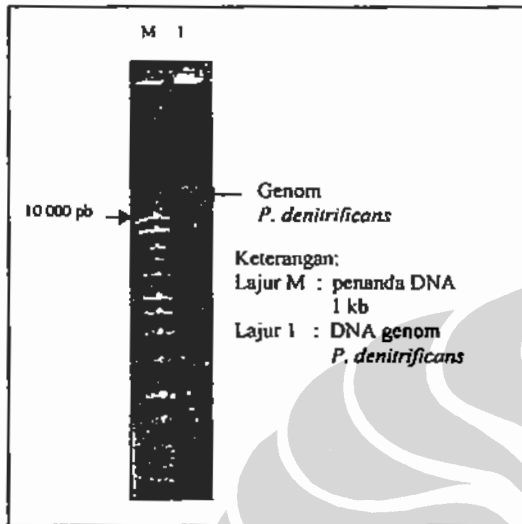
Lampiran 1. Penghitungan konsentrasi DNA

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi DNA genom } P. \text{ denitrificans} &= \text{OD}_{260} \times \text{pengenceran} \times 50 \mu\text{g/ml} \\ &= 0,424 \times 100 \times 50 \mu\text{g/ml} = 2.120 \mu\text{g/ml} = 2.120 \text{ ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm. Rasio perbandingan OD₂₆₀/OD₂₈₀ DNA yang murni adalah 1,8. Kontaminasi hasil isolasi DNA dapat menyebabkan reaksi PCR terhambat. Penelitian Hänni dkk. [13] menunjukkan bahwa presipitasi isopropanol atau etanol dapat memurnikan sampel DNA dari senyawa-senyawa yang dapat menghambat reaksi PCR.

Hasil isolasi DNA genom *P. denitrificans* dianalisis menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 0,8% dengan dapar TAE. Konsentrasi gel agarosa umumnya digunakan berkisar antara 0,7-1,5%. Semakin rendah konsentrasi gel agarosa, semakin baik dalam memisahkan fragmen DNA yang berukuran besar (misalnya hasil isolasi genom) [14]. Hasil elektroforesis isolasi DNA genom *P. denitrificans* menunjukkan adanya pita tunggal DNA

(Gambar 2). Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil isolasi genom cukup baik dan tidak terkontaminasi, sehingga dapat digunakan untuk proses selanjutnya yaitu reaksi PCR.



Gbr 2. Elektroforesis hasil isolasi DNA genom *Pseudomonas denitrificans*

B. AMPLIFIKASI *in vitro* GEN *cobU* *Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B₁₂ F942/288 DENGAN TEKNIK PCR

Hasil isolasi DNA genom *P. denitrificans* digunakan sebagai DNA cetakan untuk mengamplifikasi gen *cobU* secara *in vitro* dengan teknik PCR. Produk PCR yang diduga mengandung DNA *cobU* adalah fragmen DNA berukuran 1.124 pb.

Menurut Giri-Rachman [15], tidak ada satu protokol pun yang sesuai untuk semua reaksi PCR, sehingga perlu dilakukan optimasi untuk setiap aplikasi PCR dengan tujuan memperoleh produk PCR yang diharapkan dan spesifik. Optimasi dapat dilakukan pada komponen-komponen dalam reaksi PCR dan program PCR yang digunakan pada proses amplifikasi.

Jumlah DNA cetakan yang dimasukkan ke dalam reaksi PCR telah dioptimasi pada penelitian pendahuluan. Hasil PCR muncul bila jumlah DNA cetakan yang digunakan sejumlah 100–1.000 ng. Jumlah DNA optimal hasil optimasi adalah 300 ng, sehingga jumlah DNA cetakan tersebut digunakan dalam penelitian. Menurut Henegariu [11], optimasi DNA cetakan dalam reaksi PCR dapat dilakukan pada kisaran 30–500 ng dalam total volume reaksi PCR 25 µl.

Keberhasilan PCR sangat dipengaruhi oleh spesifisitas primer untuk menempel pada DNA

cetakan. Primer yang digunakan dalam mengamplifikasi gen *cobU* adalah CobU5 dan CobU6. Kedua primer tersebut dibuat berdasarkan sekuens parsial gen *cobU* yang telah dipublikasikan [7]. *Open reading frame* (ORF) gen *cobU* sebesar 1.017 pb. Primer CobU5 terletak pada 66 basa di depan ORF gen *cobU*, dan primer CobU6 berakhir pada 18 basa setelah ORF (Gambar 3). Primer tersebut telah memenuhi syarat-syarat desain primer yang baik, di antaranya memiliki kandungan GC yang tidak terlalu rendah dan tidak terlalu tinggi yaitu sekitar 50%. Produk PCR dengan menggunakan kedua primer tersebut akan menghasilkan fragmen DNA sebesar 1.124 pb.

Primer CobU5 dan CobU6 masing-masing memiliki panjang 23 mer. Menurut Innis dan Gelfand, panjang primer dalam reaksi PCR umumnya 17–28 mer [14]. DNA genom sebagai cetakan sebaiknya menggunakan primer dengan sedikitnya

20 nukleotida yang homolog dengan sekuens target sehingga primer dapat menempel secara spesifik [17]. Kandungan GC primer mempengaruhi suhu denaturasi. Semakin tinggi kandungan GC, maka suhu denaturasi semakin tinggi [10]. Hal tersebut disebabkan oleh ikatan antara basa G dan C terdiri dari 3 ikatan hidrogen, sedangkan ikatan antara basa A dan T terdiri dari 2 ikatan hidrogen. Menurut Innis dan Gelfand, kandungan GC primer sebaiknya berada pada kisaran 50–60% [14]. Primer CobU5 dan CobU6 memiliki kandungan GC sebesar 56%.

Menurut Sambrook dan Russell [10], perbedaan suhu leleh (*melting temperature*) antara kedua primer sebaiknya tidak lebih dari 5° C. Primer CobU5 dan CobU6 memiliki suhu leleh yang sama yaitu 54° C. Primer dalam penelitian cukup baik karena memiliki suhu leleh yang sama.

Konsentrasi primer yang dimasukkan dalam reaksi PCR yaitu masing-masing sebesar 0,5 µM. Menurut Kidd dan Ruano [18], masing-masing primer sebaiknya dimasukkan dalam konsentrasi sama yaitu sekitar 0,2–0,5 µM. Konsentrasi primer terlalu tinggi dapat menyebabkan dimer primer dan amplifikasi tidak spesifik. Konsentrasi primer terlalu rendah menyebabkan produk PCR berkurang.

Keseimbangan konsentrasi antara MgCl₂ dan dNTP merupakan salah satu faktor penting dalam reaksi PCR. Menurut Henegariu [11], konsentrasi MgCl₂ optimal adalah 1,5 mM dalam campuran reaksi PCR yang mengandung dNTP dengan konsentrasi 0,2 mM (untuk masing-masing dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP). Konsentrasi MgCl₂ dan dNTP dalam penelitian adalah 1,5 mM dan 0,2 mM.

Ion Mg²⁺ diperlukan sebagai kofaktor enzim *Taq* DNA polimerase. Konsentrasi Mg²⁺ rendah menyebabkan menurunnya laju polimerisasi, namun akurasi pemasangan basa menjadi lebih tepat. Konsentrasi Mg²⁺ tinggi menyebabkan meningkatnya

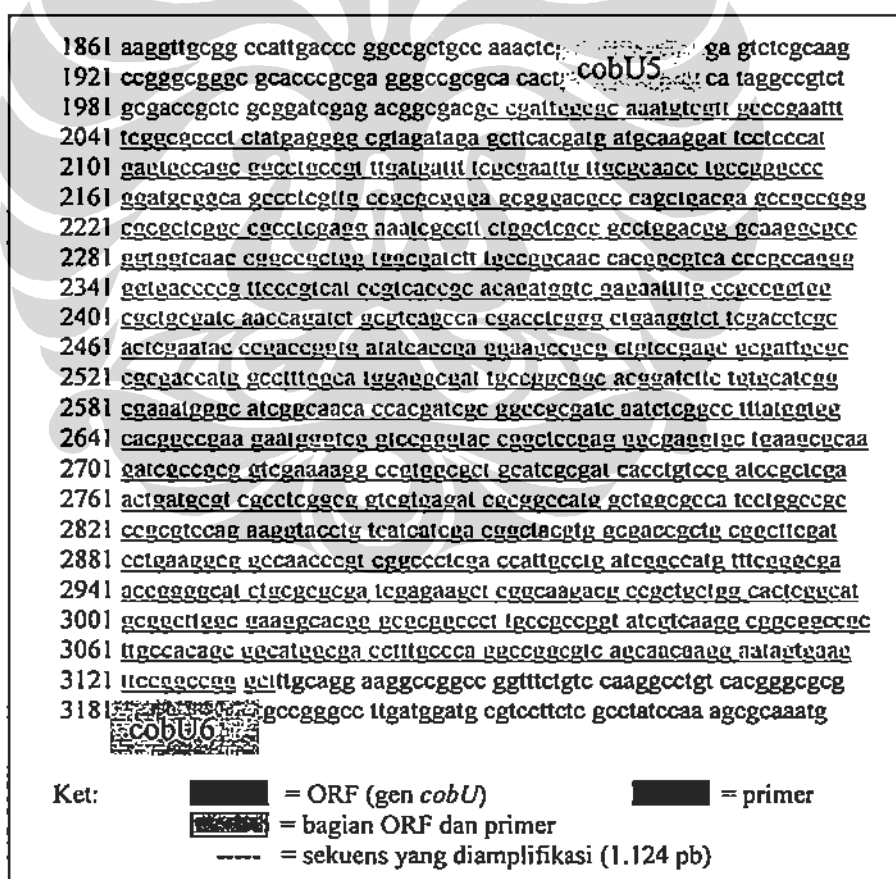
laju polimerisasi, namun akurasiya rendah sehingga dapat terbentuk produk-produk PCR yang tidak diharapkan (amplifikasi tidak spesifik)[18].

Sejalan dengan proses reaksi PCR, konsentrasi dNTP akan menurun. Konsentrasi dNTP berlebihan akan menghambat reaksi PCR karena mengikat Mg^{2+} dan menghasilkan produk PCR tidak spesifik. Konsentrasi dNTP rendah dapat mengurangi jumlah produk PCR [10,11].

Program PCR diawali dengan denaturasi awal pada suhu $94^{\circ}C$ selama 10 menit. Denaturasi awal dilakukan pada siklus pertama untuk mengaktifkan enzim *Taq* DNA polimerase. Suhu denaturasi reaksi PCR adalah $94-95^{\circ}C$, karena pada suhu tersebut enzim *Taq* DNA polimerase dapat bertahan selama 30 siklus atau lebih tanpa mengalami kerusakan [10]. Denaturasi awal dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu $94^{\circ}C$ selama 30 detik dan diulang sebanyak 30 siklus. Tahap setelah denaturasi adalah *annealing*. Suhu *annealing* merupakan suhu saat primer

menempel pada sekuens target sehingga suhu *annealing* menentukan keberhasilan reaksi PCR [19]. Suhu *annealing* terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel tidak spesifik yaitu di luar DNA target, sedangkan suhu *annealing* terlalu tinggi dapat menyebabkan primer berkurang kemampuannya dalam menempel pada DNA target [16].

Optimasi suhu *annealing* dilakukan pada kisaran suhu $50-55^{\circ}C$. Pita-pita DNA muncul ketika dilakukan suhu *annealing* $50-53^{\circ}C$. Suhu *annealing* di bawah suhu $52^{\circ}C$ memperlihatkan pita semakin banyak (amplifikasi tidak spesifik), sedangkan pada suhu *annealing* $53^{\circ}C$ memperlihatkan pita menjadi kurang jelas. Hasil optimasi menunjukkan bahwa suhu *annealing* $52^{\circ}C$ merupakan suhu *annealing* optimal. Menurut Kidd dan Ruano [18], waktu *annealing* sebaiknya dilakukan selama 60 detik. Berdasarkan hal tersebut, suhu *annealing* dalam penelitian dilakukan pada suhu $52^{\circ}C$ selama 60 detik.



Gbr 3. Sekuens fragmen DNA (mengandung gen *cobU* *Pseudomonas denitrificans*) yang diamplifikasi [7]

Tahap selanjutnya adalah polimerisasi. Suhu polimerisasi merupakan suhu pemanjangan sekuens DNA. Menurut Rybicki [16], polimerisasi umumnya dilakukan pada suhu 70--72° C selama 0,5–3 menit. Polimerisasi dapat terjadi hingga 100 basa/detik. Suhu polimerisasi dalam penelitian dilakukan pada suhu 72° C selama 1 menit 30 detik. Waktu tersebut dianggap mencukupi untuk polimerisasi DNA target sepanjang 1.124 pb. Polimerisasi pada siklus terakhir diperpanjang 10 menit untuk menyempurnakan pemanjangan DNA.

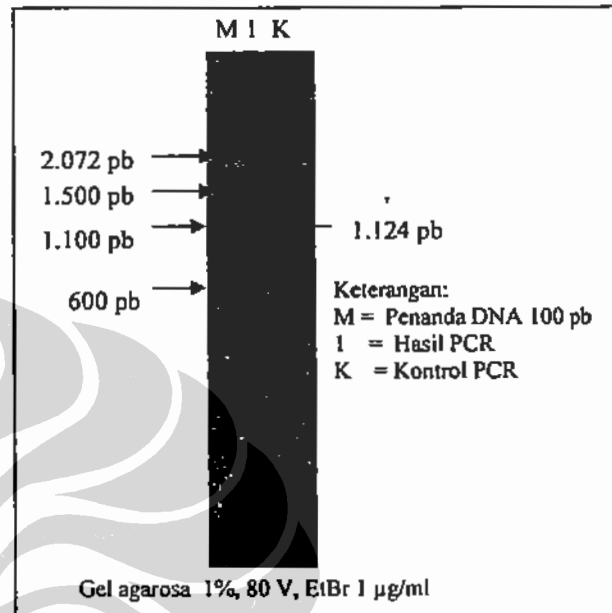
Reaksi PCR dibuat sebanyak 3 tabung, dua tabung berisi sampel berupa DNA genom *P. denitrificans* dan satu tabung kontrol PCR, masing-masing tabung berisi 25 µl. Reaksi PCR berisi sampel DNA dibuat sebanyak dua tabung untuk memperoleh produk PCR dengan jumlah yang lebih besar. Kontrol PCR dilakukan untuk mengetahui apakah proses PCR telah berjalan dengan baik. Kontrol PCR dilakukan tanpa memasukkan DNA genom. Hasil reaksi PCR seluruhnya dianalisis menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1% dengan dapar TAE untuk melihat ada tidaknya fragmen DNA yang diinginkan.

Hasil elektroforesis produk PCR memperlihatkan adanya pita DNA berukuran sekitar 1.100 pb, diduga merupakan fragmen DNA mengandung gen *cobU* (berukuran 1.124 pb), selain itu juga terdapat pita-pita lain (Gambar 4). Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh primer CobU5 dan CobU6 dibuat hanya berdasarkan sekuens parsial dari genom *P. denitrificans* yang telah dipublikasikan oleh Cameron *dkk* [7]. Hal tersebut menyebabkan primer CobU5 dan CobU6 dapat berhibridisasi dengan sekuens lain pada DNA genom *P. denitrificans*. Hasil amplifikasi tidak spesifik tersebut juga dapat disebabkan karena konsentrasi komponen-komponen PCR kurang optimal dan program PCR kurang sesuai.

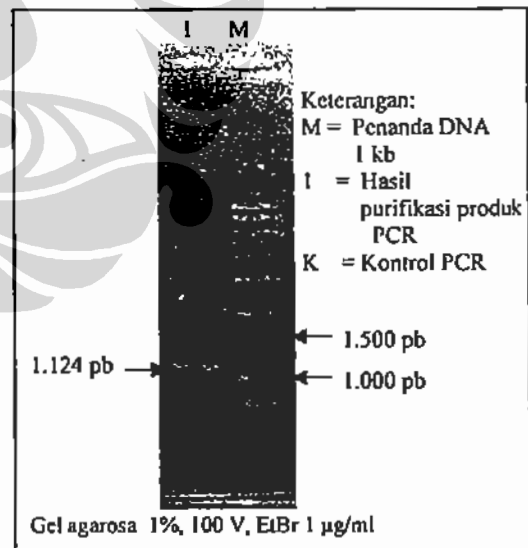
Hasil elektroforesis kontrol PCR tidak memperlihatkan adanya fragmen DNA. Adanya kontaminasi DNA dapat menghambat reaksi PCR, karena ada kemungkinan primer berhibridisasi dengan kontaminan DNA tersebut sehingga dapat menurunkan jumlah produk PCR yang diharapkan.

Fragmen DNA yang diduga mengandung gen *cobU* diisolasi dari gel agarosa dan dipurifikasi dengan metode Wizard[®] SVGel & PCR Clean-up System [20]. Menurut Elion [17], DNA produk PCR dapat dipurifikasi dari gel agarosa guna memurnikan DNA produk PCR dari dNTP dan primer. DNA produk PCR (diduga mengandung gen *cobU*) diisolasi dari gel agarosa dan dimurnikan sebelum digunakan dalam proses ligasi. Hasil purifikasi PCR sebanyak 2 µl dianalisis menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1% dengan dapar TAE (Gambar 5). Hasil purifikasi PCR memperlihatkan adanya pita tunggal

DNA berukuran sekitar 1.100 pb, diduga merupakan fragmen DNA mengandung gen *cobU* (berukuran 1.124 pb).



Gbr 4. Elektroforesis produk PCR



Gbr 5. Elektroforesis hasil purifikasi produk PCR

4. KESIMPULAN

Amplifikasi gen *cobU Pseudomonas denitrificans* Schlegel BioMCC B12 F942/288 telah berhasil

diperoleh, meskipun pada hasil amplifikasi masih terdapat pita-pita lain. Hasil tersebut masih dapat digunakan untuk penelitian berikutnya yaitu pengklonan gen *cobU* dan analisis gen *cobU* ke dalam *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers JM109.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Bapak Dr. Nadirman Haska, APU yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian di Laboratorium Teknologi Gen, BPPT, Serpong. Terima kasih kepada Bapak Dr. Abinawanto selaku ketua Departemen Biologi, FMIPA, UI; Bapak Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc; dan Bapak Iman Santoso, M.Phil yang telah banyak memberi saran, bantuan, dan masukan selama penelitian.

DAFTAR ACUAN

- [1] Scott, A.I. & C.A. Roessner. 2002. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂). *Biochemical Society Transactions* 30(4): 613--620.
- [2] Combs, G.F. 1998. *The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. 2nd ed. Academic Press, San Diego: xxii + 618 hlm.
- [3] Martens, J.H., H. Barg, D. Jahn & M.J. Warren. 2002. Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(3): 275--285.
- [4] Feldman, B. 2005. Clinical hemopoiesis. 11 hlm. <http://www.vin.com/VINDBPub/SearchPB/Proceedings/PR05000/PR00038.htm>, 3 Mei 2005, pk. 10.05.
- [5] BPPT (= Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi). 1995. Prastudi kelayakan pengkajian produksi vitamin B₁₂. BPPT, Jakarta: viii + 35 + L-20 hlm.
- [6] BPPT (= Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi). 1998. Laporan tahunan: Proyek pengkajian bioteknologi industri tahun anggaran 1997/1998. BPPT, Tangerang: 141 hlm.
- [7] Cameron, B., F. Blanche, M.C. Rouyez, D. Bisch, A. Famechon, M. Couder, L. Cauchois, D. Thibaut, L. Debussche & J. Crouzet. 1991. Genetic analysis, nucleotide sequence, and products of two *Pseudomonas denitrificans cob* genes encoding nicotinate-nucleotide: dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase and cobalamin (5'-phosphate) synthase. *Journal of Bacteriology* 173(19): 6066--6073.
- [8] Stamford, N.P.J. 1994. Genetics and enzymology of the vitamin B₁₂ pathway. *Dalam: Stamford, N.P.J. (ed.). 1994. The biosynthesis of tetrapyrrole pigments*. John Wiley & Sons, New York: 247--266.
- [9] Promega. 2002. *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit*. Promega Corp., Madison: 16 hlm.
- [10] Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. 3rd ed. CSHL Press, New York: xxvii + 18.136 + A.14.1 + R.22 + I.44 hlm.
- [11] Henegariu, O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance & P.H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23: 504--511.
- [12] Clark, W. & K. Christopher. 2000. An introduction to DNA: Spectrophotometry, degradation, and the 'Frankel' experiment. 19 hlm. <http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/vol-22/5-clark.pdf>, 17 April 2005, pk. 21.10.
- [13] Hänni, C., T. Brosseau, V. Laudet & D. Stehelin. 1995. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acid Research* 23(5): 881--882.
- [14] CSU (=Colorado State University). 2000. Agarose gel electrophoresis. 15 Januari 2000: 4 hlm. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>, 17 Mei 2005, pk. 09.01.
- [15] Giri-Rachman, E.A. 2004. Polymerase chain reaction (PCR). *Dalam: Kelompok Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi. 2004. Kursus identifikasi mikroba dengan cara sekuensing gen 16s rRNA/18s rRNA*. ITB, Bandung: iv + 60 hlm.
- [16] Rybicki, E. 2001. PCR primer design and reaction optimization. 11 hlm. <http://www.mcb.uct.ac.za/pcroptim.htm>, 8 Mei 2005, pk. 10.36.
- [17] Elion, E.A. 1997. Constructing recombinant DNA molecules by the polymerase chain reaction. 10 hlm. <http://www.does.org/masterli/cpmb0317.htm>, 7 Mei 2005, pk. 13.19.
- [18] Kidd, K.K. & G. Ruano. 1995. Optimizing PCR. *Dalam: McPherson, M.J., B.D. Hames & G.R. Taylor (eds.). PCR2: A practical approach*. Oxford University Press, Oxford: xxv + 332 hlm.
- [19] Wong, D.W.S. 1997. *The ABCs of gene cloning*. Chapman & Hall, New York: xiii + 213 hlm.
- [20] Promega. 2002. *Wizard[®] SVGel and PCR clean-up System*. Promega Corp., Madison: 9 hlm.