

**LAPORAN PENELITIAN
PENELITIAN PENELITI MUDA (LITMUD) UNPAD**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI GEN PENGODE
FRUKTOSIL TRANSFERASE (ftf) DARI BAKTERI ASAM LAKTAT
SUSU FERMENTASI DI KABUPATEN GARUT**

Oleh:

Ketua : Yeni Wahyuni Hartati, M.Si.
Anggota : I. Shabarni Gaffar, M.Si.
II. Iman Permana Maksum, M.Si.

Dibiayai oleh Dana DIPA Universitas Padjadjaran
Tahun Anggaran 2007
Berdasarkan SPK No. 258/J06.14.LP/PL/2007
Tanggal 3 April 2007

LEMBAGA PENELITIAN
UNIVERSITAS PADJADJARAN



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PADJADADJARAN
NOVEMBER 2007

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PENELITIAN PENELITI MUDA (LITMUD) UNPAD
SUMBER DANA DIPA UNPAD
TAHUN ANGGARAN 2007**

- 1. a. Judul Penelitian** : Isolasi dan karakterisasi gen pengode fruktosil transferase dari bakteri asam laktat susu fermentasi di Kabupaten Garut.
- b. Macam penelitian** : Dasar
- c. Kategori Penelitian** : I
- 2. Ketua Peneliti**
- a. Nama lengkap : Yeni Wahyuni Hartati, M.Si
- b. Jenis kelamin : Perempuan
- c. NIP : 132 206 491
- d. Pangkat/Gol. : Penata/IIIc
- e. Jabatan struktural : -
- f. Jabatan fungsional : Lektor
- g. Fakultas/Jurusan : MIPA/KIMIA
- h. Bidang ilmu yang diteliti : Biologi Molekul
- :
- 3. Jumlah tim peneliti** : 3 orang
- 4. Lokasi Penelitian** : Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia FMIPA UNPAD
- 5. Kerjasama Instansi lain** : Tidak ada
- 6. Jangka Waktu Penelitian** : 8 bulan
- 7. Biaya penelitian** : Rp 5.000.000,00 (lima juta rupiah)

Mengeahui :
2007

Dekan FMIPA UNPAD
Peneliti,

Jatinangor, November

Ketua

Prof. Dr. Husein H. Bahti
NIP 130 367 261

Yeni W. Hartati, Msi
NIP. 132 206 491

Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian UNPAD

Prof. Dr. Oekan S. Abdoellah, MA., Ph.D
NIP. 130 937 900

ABSTRAK

Enzim fruktosil transferase (FTF) dari bakteri asam laktat merupakan enzim yang mengkatalisis pembentukan polimer ekstraselular polisakarida (EPS) dengan monomer sukrosa. Enzim ini menghasilkan beberapa jenis homopolimer, yaitu : fruktan, levan, inulin dan FOS (frukto-oligosakarida) yang bermanfaat sebagai prebiotik, pengemulsi, penstabil, pembentuk gel atau pengikat air pada makanan dan dibidang kesehatan sebagai antitumor, antiulcer, immonomodulating, dan menurunkan kadar kolesterol. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi, mengisolasi dan mengkarakterisasi gen pengode FTF (fruktosil transferase) dari bakteri asam laktat pada susu fermentasi (yohurt). Bakteri asam laktat di isolasi dari sampel yohurt yang diperoleh di Kabupaten Garut dan ditumbuhkan pada media MRS. DNA genom dari bakteri di isolasi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Fragmen gen *ftf* dan gen 16S rRNA di amplifikasi dengan metoda *Polimerase Chain Reaction* menggunakan dua pasang primer yang spesifik. Penelitian ini telah berhasil mengkulturkan bakteri asam laktat yang terdapat pada sampel yohurt. Hasil isolasi DNA genom menunjukkan bahwa isolasi DNA genom telah berhasil dilakukan terhadap tiga bakteri yang diperoleh dari tiga sampel yohurt. Penelitian ini juga telah berhasil mengamplifikasi gen 16S rRNA dari genom bakteri-bakteri tersebut, menghasilkan fragmen DNA berukuran 1,4 kb. Produk PCR ini digunakan untuk identifikasi secara molekular spesies bakteri yang terdapat pada sampel yohurt tersebut dengan sekuensing gen 16S rRNA metoda dideoksi Sanger. Amplifikasi dengan primer untuk gen *ftf* belum menghasilkan pita yang spesifik, sehingga optimasi kondisi PCR harus dilakukan.

ABSTRACT

Fructosyltransferase from lactic acid bacteria is enzyme that catalyze formation of polymers exopolysaccharides (EPS) with sucrose as monomer. This enzyme yields some kind of homopolymers, such as fructans, levans, inulin and FOS (fructo-oligosaccharides), that used as prebiotics, emulsifier, stabilizing, gelling or water binding in food and may contribute to human health as antitumoral, antiulcer, immunomodulating and cholesterol lowering activity. This research aim to identify, isolate and to characterize the gene encoded FTF (fructosyltransferase) from lactic acid bacteria on traditional fermented milk (yohurt). Lactic acid bacteria were isolated from yohurt samples that were taken from Kabupaten Garut, and growth in MRS medium. Genomic DNA from bacteria was isolated using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). ftf gene fragment and 16S rRNA gene fragment was amplified by Polimerase Chain Reaction method using two pair of specific primers. The result shown that, lactic acid bacteria was successfully inoculated from yohurt samples in MRS medium, and genomic DNA was successfully isolated from three colony of bacteria from three yohurt samples. Amplification of 16S rRNA gene fragment was successfully done, yielding 1,4 kb DNA fragment. This PCR product was purify and used for molecular identification of bacterial species in yohurt samples by dideoxy Sanger DNA sequencing method. However, the result of amplification using primers for ftf gene shown that to many non specific DNA fragment, therefore optimisation of PCR condition should be done.

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya tertuju kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya kepada kami tim peneliti untuk melaksanakan penelitian dan penulisan laporan ini. Kami menyadari adanya keterbatasan kemampuan yang dimiliki, namun hasil penelitian ini Insya Allah telah membuka jalan bagi kami untuk melanjutkan penelitian ini sampai memperoleh hasil yang bermanfaat untuk keilmuan.

Pada kesempatan ini perkenankanlah peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Universitas Padjadjaran dan Lembaga Penelitian UNPAD atas dana penelitian yang diberikan melalui DIPA UNPAD tahun anggaran 2007.
2. Dekan Fakultas MIPA, Ketua Jurusan Kimia, serta kepala Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia, yang telah menyediakan fasilitas bagi peneliti untuk melaksanakan penelitian ini.
3. Semua pihak yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Kami menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran sangat kami harapkan untuk menyempurnakan laporan ini.

Bandung, November 2007

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Hal
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	
viii	
DAFTAR GAMBAR	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Fruktan	4
2.2. Fungsi eksopolisakarida (EPS)	5
2.3. Aplikasi Eksopolisakarida	5
2.4. Bakteri asam laktat	6
2.5. Enzim yang mensintesis fruktan	7
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
3.1. Tujuan Penelitian	8
3.2. Manfaat Penelitian	8
BAB IV. METODE PENELITIAN	9
4.1. Kultivasi bakteri asam laktat dari sampel yohurt	9
4.2. Isolasi DNA genom	9
4.3. Analisis hasil isolasi DNA genom	10
4.4. Amplifikasi fragmen gen <i>fff</i>	10
4.5. Amplifikasi gen 16S rRNA	11
4.6. Purifikasi produk PCR	11
4.7. Sekuensing (penentuan urutan DNA)	12
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	13

5.1.Kultivasi bakteri asam laktat dari sampel yohurt.	13
5.2.Hasil isolasi DNA genom.	13
5.3. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA.	14
5.4. Hasil Amplifikasi fragmen gen <i>ftf</i>	15.
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	18
6.1. Kesimpulan	18
6.2. Saran	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN I	20
LAMPIRAN II	21
LAMPIRAN III	22

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 5.1. Urutan dan T_m primer 5FTF dan 6FTF	16
Tabel 5.2. Optimasi suhu <i>annealing</i> untuk amplifikasi gen <i>ftf</i> dan hasilnya	17

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 5.1. Contoh bentuk koloni bakteri dari sampel 1	13
Gambar 5.2. Analisis hasil isolasi DNA genom	14
Gambar 5.3. Analisis hasil PCR gen 16S rRNA	15
Gambar 5.4. Analisis hasil PCR fragmen gen <i>ftf</i>	17

BAB I. PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* termasuk golongan organisme *food-grade* yang memiliki status GRAS (*generally recognized as safe*) dan diketahui memproduksi sejumlah jenis molekul ekstraselular polisakarida (EPS) yang berkontribusi untuk tekstur pada susu fermentasi. EPS dibagi dua golongan yaitu homopolisakarida dan heteropolisakarida. Yang termasuk EPS diantaranya : glukosa, fruktan, levan dan inulin. EPS dari bakteri ini memungkinkan pengembangan generasi baru dari *food-grade* polisakarida. Bakteri asam laktat juga sering berkontribusi positif pada rasa, bau, atau preservasi dari produk akhir (van Hijum *et al.*, 2002; De Vuyst *et al.*, 2001).

Fruktan merupakan homopolimer dari fruktosa yang disintesis oleh golongan enzim sukrase, yaitu fruktosil transferase (FTF). Enzim ini memotong sukrosa dan menggunakan energi yang dibebaskan untuk menggabungkan unit fruktosil ke rantai fruktan yang sedang tumbuh. Enzim fruktosil transferase ini terdapat pada tumbuhan dan bakteri (van Hijum *et al.*, 2002; van Geel-Schuten *et al.*, 1999).

Fruktan mengandung ikatan β (2-1), β (2-6), dan β (2-1-6) percabangan. Fruktan yang mengandung ikatan β (2-6) pada tulang punggungnya disebut levan, dan fruktan yang mengandung ikatan β (2-1) disebut inulin. FTF yang memproduksi levan dikenal juga dengan nama levansukrase, dan yang memproduksi inulin disebut inulosukrase. Tumbuhan umumnya memproduksi inulin, sementara mikroorganisme pada umumnya memproduksi levan dan inulin. Mikroorganisme yang memproduksi fruktan diantaranya: *Streptococcus*, *Bacillus* dan *Lactobacillus* (van Hijum *et al.*, 2002).

Baru-baru ini, grup van Hijum dkk (2002), telah menskrining sejumlah koleksi strain *Lactobacillus* yang memproduksi EPS. Salah satu strain ini diidentifikasi sebagai *Lactobacillus reuteri* LB 121, yang mensintesis sejumlah besar EPS larut air, dengan glukosa dan fruktosa sebagai konstituen. Gen *ftf* dari *Lactobacillus reuteri* LB 121 telah dikarakterisasi dan diekspresikan di *E. Coli*.

Lactobacillus termasuk jenis bakteri yang mempunyai keutamaan yaitu, berkontribusi pada kesehatan manusia sebagai probiotik. Probiotik merupakan campuran kultur mikroorganisme yang diberikan pada manusia atau hewan untuk

menambah populasi bakteri pencernaan. Pengaruh dari probiotik diantaranya menghambat pertumbuhan bakteri patogen, antimutagen, antikanker, meningkatkan sistem respon imun dan menurunkan kadar kolesterol (Du Toit *et al.*, 1998; De Vuyst *et al.*, 2001).

Lactobacillus dan *bifidobakteria* telah digunakan sebagai probiotik untuk mengontrol penyakit pencernaan seperti intoleran terhadap laktosa, gastroenteritis akut, efek radioterapi, konstipasi, inflamasi dan alergi terhadap makanan. Manfaat dari *Lactobacillus* berhubungan dengan kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen, melalui sekresi senyawa antibakteri seperti asam laktat, peroksida dan bakteriosin. Daya tahannya untuk melewati tenggorokan dan lambung manusia telah diteliti secara intensif. Bakteri ini diantaranya terdapat pada susu fermentasi, yang biasa dikenal dengan yoghurt (Du Toit *et al.*, 1998; De Vuyst *et al.*, 2001).

Prebiotik merupakan penguat (makanan) dari bakteri probiotik atau bakteri pencernaan. Oligosakarida atau polisakarida tertentu (misalnya: laktulosa dan fruktan) tidak bisa dicerna oleh enzim pencernaan karena adanya unit fruktosil dalam bentuk β . Tapi prebiotik dapat difermentasi oleh bakteri pencernaan seperti *Lactobacillus* dan *bifidobakteria*. Sehingga prebiotik akan menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik (Du Toit *et al.*, 1998; De Vuyst *et al.*, 2001).

Mikroorganisme "food grade" yang memproduksi EPS, terutama bakteri asam laktat, *propionibakteria*, dan *bifidobakteria*. EPS dapat digunakan sebagai pengemulsi, penstabil, pembentuk gel dan pengikat air pada industri makanan, dan juga digunakan sebagai prebiotik. Selain itu juga bermanfaat dibidang kesehatan, untuk antitumor, antiulcer, menurunkan kadar kolesterol dan lain-lain. Jadi banyak sekali aplikasi dari EPS yang dihasilkan oleh bakteri ini. Enzim yang mensintesis EPS adalah enzim FTF yang dikode oleh gen *ftf*. Beberapa paten tentang FTF yang memproduksi EPS telah dihasilkan untuk industri makanan dan farmasi (De Vuyst *et al.*, 1999; Gamar *et al.*, 1997).

Penelitian tentang identifikasi dan karakterisasi gen *ftf* dari bakteri asam laktat yang terdapat pada susu fermentasi tradisional di Indonesia belum pernah dilakukan. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan yang akan memberikan informasi tentang spesies bakteri asam laktat yang menghasilkan EPS yang terdapat pada susu

fermentasi tradisional dan informasi karakter (urutan nukleotida dari gen dan urutan asam amino dari protein) fruktosil transferase yang terdapat pada bakteri tersebut. Karakter ini nantinya akan berhubungan dengan jenis EPS (eksopolisakarida) yang dihasilkannya.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

Karbohidrat merupakan sumber energi utama makhluk hidup di dunia. Berdasarkan fungsinya karbohidrat dibagi dua : struktural karbohidrat dan non struktural karbohidrat. Yang termasuk struktural karbohidrat, diantaranya : kitin, murein, pektin dan selulosa. Non struktural karbohidrat contohnya : glukosa, fruktosa, disakarida sukrosa trehalosa dan laktosa, trisakarida rafinosa, pati, glikogen dan fruktan. Fruktan merupakan polisakarida simpanan pada beberapa tumbuhan seperti gandum, sayur-sayuran dan kacang-kacangan (van Hijum *et al.*, 2002).

Polisakarida simpanan seperti pati dan inulin pada tumbuhan, glikogen pada hewan merupakan polisakarida intraseluler. Beberapa bakteri, mikroalga, jamur dan ragi, menyimpan polisakarida diluar sel (ekstraseluler polisakarida = EPS). EPS bakteri merupakan molekul dengan berat molekul bervariasi antara $10-10^4$ kDa (sekitar 50 – 50.000 unit glikosil). Berdasarkan komposisi dan mekanisme biosintesis, EPS dibagi menjadi dua kelas, yaitu: homopolisakarida dan heteropolisakarida (van Hijum *et al.*, 2002).

Homopolisakarida, hanya disusun oleh satu jenis monomer, yaitu glukosa (polimer: glukosa), fruktosa (polimer: fruktan) dengan tipe ikatan dan percabangan yang berbeda. Polisakarida ini disintesis diluar sel oleh enzim sukrase dengan adanya molekul donor sukrosa pada medium, dan molekul penerima polimer: sukrosa, rafinosa atau air (De Vuyst *et al.*, 2001)..

Beberapa enzim sukrase juga digunakan untuk mensintesis oligosakarida, seperti frukto-oligosakarida (FOS) dan gluko-oligosakarida. Oligosakarida ini mengandung beberapa tipe ikatan, antara gula glukosa atau fruktosa tergantung pada enzim dan kondisi yang digunakan untuk sintesis. Manfaat dari oligosakarida ini, diantaranya digunakan sebagai prebiotik (Du Toit *et al.*, 1998).

2.1. Fruktan

Fruktan merupakan homopolimer dari fruktosa yang disintesis oleh golongan enzim sukrase, yaitu fruktosil transferase (FTF). Enzim ini memotong sukrosa dan menggunakan energi yang dibebaskan untuk menggabungkan unit fruktosil ke rantai

fruktan yang sedang tumbuh. Enzim fruktosil transferase ini terdapat pada tumbuhan dan bakteri (van Hijum *et al.*, 2002).

Fruktan mengandung ikatan β (2-1), β (2-6), dan β (2-1-6) percabangan. Fruktan yang mengandung ikatan β (2-6) pada tulang punggungnya disebut levan, dan fruktan yang mengandung ikatan β (2-1) disebut inulin. FTF yang memproduksi levan dikenal juga dengan nama levansukrase, dan yang memproduksi inulin disebut inulosukrase. Tumbuhan umumnya memproduksi inulin, sementara mikroorganisme pada umumnya memproduksi levan dan inulin. Mikroorganisme yang memproduksi fruktan diantaranya: *Streptococcus*, *Bacillus* dan *Lactobacillus* (van Hijum *et al.*, 2002; Van Geel-Schuten *et al.*, 1999).

2.2. Fungsi eksopolisakarida (EPS).

Fungsi fisiologi dari EPS bakteri belum diketahui dengan jelas. EPS diperkirakan berfungsi untuk memproteksi mikroba dari lingkungan luar, fagositosis, serangan faga dan antibiotik atau senyawa toksin. EPS tidak berfungsi sebagai makanan untuk mikroba yang memproduksinya. EPS mungkin berfungsi sebagai agen adesif yang memfasilitasi interaksi antara tumbuhan dan bakteri, contohnya produksi levan oleh akar tebu menyerang *G. Diazotrophicus* (1). Homopolisakarida (glukan dan fruktan) yang dibentuk oleh *Streptococcus* di mulut, mempercepat pembentukan plak pada gigi (Bergeron *et al.*, 2000; Gamar *et al.*, 1997).

2.3. Aplikasi eksopolisakarida.

Probiotik merupakan campuran kultur mikroorganisme yang diberikan pada manusia atau hewan untuk menambah populasi bakteri pencernaan. Pengaruh dari probiotik diantaranya menghambat pertumbuhan bakteri patogen, antimutagen, antikanker, meningkatkan sistem respon imun dan menurunkan kadar kolesterol. *Laktobacillus* dan *bifidobakteria* telah digunakan sebagai probiotik untuk mengontrol penyakit pencernaan seperti intoleran terhadap laktosa, gastroenteritis akut, efek radioterapi, konstipasi, inflamasi dan alergi terhadap makanan. Manfaat dari *Laktobacillus* berhubungan dengan kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen, melalui sekresi senyawa antibakteri seperti asam laktat, peroksida dan bakteriosin. Daya tahannya untuk melewati tonggorokan dan usus manusia, bila

dimasukkan ke produk susu fermentasi telah diteliti secara intensif. Contoh makanan yang mengandung probiotik: yakult (Yakult, Jepang) yang mengandung bakteri *L. casei Shirota* (Du Toit et al., 1998; De Vuyst et al., 2001).

Prebiotik merupakan penguat (makanan) dari bakteri probiotik atau bakteri pencernaan. Oligosakarida atau polisakarida tertentu (misalnya: laktulosa dan fruktan) tidak bisa dicerna oleh enzim pencernaan karena adanya unit fruktosil dalam bentuk β . Tapi prebiotik dapat difermentasi oleh bakteri pencernaan seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobakteria*. Sehingga prebiotik akan menstimulasi pertumbuhan bakteri probiotik. Contoh frukto-oligosakarida yang ditambahkan ke makanan adalah : Nutrilon dan Omneo baby food (Numico, The Netherlands) dan Fysiq (Mona, The Netherlands) yang mengandung inulin dan bakteri *Lactobacillus* (Du Toit et al., 1998; De Vuyst et al., 2001).

Mikroorganisme "food grade" yang memproduksi EPS, terutama bakteri asam laktat, *Propionibakteria*, dan *Bifidobakteria*. Bakteri asam laktat yang memproduksi EPS sudah dipelajari dengan detail. Bakteri ini diisolasi dari produk olahan susu, seperti: produk susu fermentasi Scandinavia, beberapa jenis yoghurt, susu fermentasi, keju, daging dan sayur hasil fermentasi, yang berfungsi sebagai sumber bakteri asam laktat yang memproduksi EPS (van Hijum et al., 2002; van Geel-Schuten et al., 1999).

EPS dapat digunakan sebagai pengemulsi, penstabil, pembentuk gel dan pengikat air pada industri makanan, dan juga digunakan sebagai prebiotik. Selain itu juga bermanfaat dibidang kesehatan untuk antitumor, antiulcer, menurunkan kadar kolesterol dan imonomodulating. Penggunaan EPS untuk aplikasi medis juga telah dilaporkan. Inulin dapat mengurangi Colitis (inflamasi di perut) tikus percobaan. Fruktan (FOS dan inulin) dapat berfungsi sebagai penyedap rasa makanan (van Hijum et al., 2002; van Geel-Schuten et al., 1999; De Vuyst et al., 2001).

2.4. Bakteri asam laktat.

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir fermentasi karbohidrat. *Lactobacillus* termasuk bakteri asam laktat, bersama-sama dengan: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Aloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactospaera*, *Oenococcus*,

Carnobacterium, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weisella*. *Lactobacillus* ditemukan pada habitat yang kaya karbohidrat, seperti: membran mukosa manusia dan binatang (rongga mulut, usus dan vagina), tumbuhan dan material tumbuhan dan makanan fermentasi (5, 6). *Streptococcus* ditemukan pada mulut dan menghasilkan glukosa dan fruktosa yang berkontribusi pada pembentukan plak pada gigi (Bergeron *et al.*, 2000).

Secara historis genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus* merupakan bakteri asam laktat yang memiliki status GRAS (*Generally Regarded as Safe*) dan diketahui memproduksi sejumlah homo dan heteropolisakarida. Genus ini biasa digunakan pada fermentasi makanan seperti keju, susu, roti, anggur dll. Bakteri asam laktat berkontribusi pada persiapan produk-produk fermentasi, karena menurunkan pH dengan memproduksi asam laktat dan pada beberapa kasus memproduksi senyawa antibakteri. Bakteri ini juga mempengaruhi rasa, tekstur, dan memberikan nutrisi pada produk (van Hijum *et al.*, 2002; Van Geel-Schuten *et al.*, 1999; De Vuyst *et al.*, 2001).

2.5. Enzim yang mensintesis fruktosa.

Pada bakteri, inulin disintesis oleh inulosukrase (sukrosa: 2,1- β -D-fruktosa 1- β -D-fruktosiltransferase; E.C 2.4.1.9; reaksi 1) dan levan disintesis oleh levansukrase (sukrosa: 2,6- β -D-fruktosa 6- β -D-fruktosiltransferase; E.C 2.4.1.10; reaksi 2) dengan reaksi :

1. Sukrosa + (2,1- β -D-fruktosyl)_n \rightarrow D-glukosa + (2,1- β -D-fruktosyl)_{n+1}
2. Sukrosa + (2,6- β -D-fruktosyl)_n \rightarrow D-glukosa + (2,6- β -D-fruktosyl)_{n+1}

Enzim ini biasa dikenal dengan nama fruktosil transferase (FTF). FTF bakteri pada umumnya menghasilkan polimer levan. Pohon filogenetik dari enzim ini menunjukkan bahwa FTF dari bakteri bisa dibedakan antara (i) dari bakteri asam laktat, (ii) bacillus dan (iii) dari bakteri gram negatif. Gen untuk levansukrase sudah pernah dikarakterisasi dari *S. mutans* dan *L. reuteri* (van Hijum *et al.*, 2002; Van Geel-Schuten *et al.*, 1999)

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan penelitian.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara molekular bakteri asam laktat yang terdapat pada tiga sampel yohurt yang diperoleh dari Kabupaten Garut dan mengkarakterisasi gen *fff* dari bakteri asam laktat yang terdapat pada sampel tersebut.

3.2. Manfaat penelitian.

Penelitian ini akan memberikan informasi tentang identitas bakteri asam laktat yang terdapat pada sampel yohurt dan gen pengode fruktosil transferase (*fff*) dari bakteri asam laktat galur lokal. Informasi ini akan memberikan petunjuk ke arah ekstraseluler polisakarida (EPS) yang dihasilkan oleh enzim Fruktosil Transferase (FTF) bakteri tersebut. Penelitian ini akan memberikan petunjuk ke arah kemungkinan memproduksi enzim rekombinan dari bakteri asam laktat galur lokal. Penelitian serupa belum pernah dilaporkan di Indonesia, sehingga diharapkan berkontribusi untuk produksi enzim industri di Indonesia. Enzim fruktosil transferase mengkatalisis perubahan sukrosa menjadi polimer fruktosa seperti FOS (fruktosa oligosakarida), inulin, dan fruktan. Polimer ini bermanfaat untuk kesehatan manusia, diantaranya digunakan sebagai prebiotik, antitumor, antiulcer, perangsang sistem imun, dan menurunkan aktifitas kolesterol.

BAB IV. METODE PENELITIAN

Tahap awal penelitian ini adalah penumbuhan bakteri asam laktat dari sampel yohurt yang diperoleh dari Kabupaten Garut pada media selektif MRS. Penumbuhan dilakukan untuk memisahkan koloni bakteri yang terkandung di dalam sampel yohurt. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA genom dari koloni bakteri yang diperoleh. Tahapan selanjutnya adalah proses PCR (*Polimerase Chain Reaction*) fragmen gen *fff* dari DNA genom, dan proses PCR gen 16S rRNA. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agaros 1%. Selanjutnya produk PCR dimurnikan dan ditentukan konsentrasinya dan dikirim ke MacroGen (Korea) untuk penentuan urutan nukleotida. Semua alat-alat yang digunakan penelitian ini menggunakan fasilitas yang terdapat di Laboratorium Penelitian, Jurusan Kimia, UNPAD.

4.1. Kultivasi bakteri asam laktat dari sampel yohurt.

Sampel yohurt diperoleh dari dua produsen yohurt di Kabupaten Garut. Sampel dibawa ke laboratorium dan langsung ditumbuhkan pada media MRS cair (5,2 gr/L). Sebanyak 100 µl sampel di inokulasikan ke media MRS cair, kemudian di inkubasi pada 37 °C selama 24 jam pada kondisi anaerob. Keesokan harinya, bakteri yang telah tumbuh pada media cair dipindahkan ke media padat dengan cara; sebanyak 50 µl kultur cair di *spread* ke cawan petri yang telah berisi MRS padat, kemudian di inkubasi pada 37 °C selama 24 jam pada kondisi anaerob. Koloni bakteri yang tumbuh pada media padat dipisahkan ke media yang baru, sampai di peroleh koloni tunggal yang seragam. Koloni tunggal ini kemudian di isolasi DNA genomnya.

4.2. Isolasi DNA genom

DNA genom di isolasi menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Sebanyak 1 ml kultur cair dimasukkan ke tabung mikro 1,5 ml. Disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Pelet sel diambil, dan ditambahkan 480 µl EDTA 50 mM, pH 8,0 dan 120 µl Lysozim 10 mg/ml, dihomogenkan dengan pemipetan, kemudian di inkubasi pada 37 °C selama satu jam. Selanjutnya disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 2 menit. Supernatannya dibuang,

pada pelet sel ditambahkan 600 μL buffer *Nuclei lysis solution*, dihomogenkan dengan pemipetan dan diinkubasi pada 80 °C selama 5 menit. Setelah itu larutan lisis dibiarkan pada suhu kamar. Kedalam larutan lisis kemudian ditambahkan 3 μL RNase dan di inkubasi pada 37 °C selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 200 μL *Protein precipitation solution*, di vortex selama 20 detik dan di inkubasi di dalam es selama 15 menit. Selanjutnya di sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 3 menit. Supernatan di ambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru yang telah berisi 600 μL isopropanol p.a. Tabung dibolak-balik beberapa kali, sampai terlihat ada benang DNA yang halus, kemudian di sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 2 menit untuk mengendapkan DNA. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan menambahkan 600 μL etanol 70%, dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 2 menit. Pelet DNA kemudian dikeringkan, kemudian dilarutkan dengan menambahkan 100 μL *DNA rehydration solution*, dan di inkubasi pada 4 °C selama semalam. Hasil isolasi DNA genom kemudian di analisis dengan elektroforesis gel agarose 1%.

4.3. Analisis hasil isolasi DNA genom.

Hasil isolasi DNA genom dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1% (b/v) yang mengandung 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ etidium bromida. Untuk elektroforesis, 5 μL hasil isolasi DNA dicampur terlebih dahulu dengan *loading buffer* (Bromofenol biru 0,15% (b/v), sukrosa 40% (b/v), dan 5 mM EDTA). Elektroforesis dilakukan selama 45 menit pada tegangan 85 Volt dengan buffer TAE (0,04 M Tris-asetat dan 0,001 M EDTA) sebagai *running buffer*. Untuk analisis ukuran DNA digunakan penanda DNA pUC19/*Hinf* I. Hasil elektroforesis dilihat dengan alat sinar UV pada panjang gelombang 312 nm dan difoto dengan menggunakan kamera digital.

4.4. Amplifikasi fragmen gen *ftf*.

Fragmen DNA gen *ftf* di amplifikasi dengan teknik PCR menggunakan degenerated primer untuk bakteri gram positif dari penelitian yang sudah dipublikasi (van Hijum *et al.*, 2002). Campuran reaksi terdiri dari: 1 μL DNA genom, 2,5 Unit enzim Taq DNA Polimerase (Fermentas), buffer PCR 1X, 5 μM primer 5FTF, 5 μM primer 6FTF, 2,5 mM MgCl_2 dan ddH₂O, dengan volume total 50 μL . Siklus PCR dimulai dengan denaturasi awal pada 95 °C selama 2 menit, diikuti dengan 30 siklus :

(denaturasi pada 95 °C selama 1 menit; penempelan primer pada 45-55 °C selama 1 menit; dan polimerisasi pada 72 °C selama 1 menit) dan pemanjangan akhir pada 72 °C selama 10 menit. Produk PCR di analisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Pada proses amplifikasi fragmen gen *ftf* ini, dilakukan variasi suhu penempelan primer dari 45 – 55 °C untuk memperoleh suhu penempelan primer yang optimum.

4.5. Amplifikasi gen 16S rRNA.

Fragmen DNA gen 16S rRNA di amplifikasi menggunakan teknik PCR. Campuran reaksi terdiri dari: 1 µL DNA genom, 2,5 Unit enzim Taq DNA Polimerase (Fermentas), buffer PCR 1X, 30 pmol primer BactF I, 30 pmol primer UniB I, 2,5 mM MgCl₂ dan ddH₂O dengan volume total 50 µL. Siklus PCR dimulai dengan denaturasi awal pada 95 oC selama 2 menit, diikuti dengan 30 siklus : (95 °C selama 1 menit; 50 °C selama 1 menit; 72 °C selama 1 menit) dan pemanjangan akhir pada 72 °C selama 10 menit. Produk PCR di analisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%.

4.6. Purifikasi produk PCR

Fragmen DNA hasil PCR yang telah dianalisis melalui gel agaros seperti tersebut di atas selanjutnya dipurifikasi mengikuti prosedur dari *GFXTM PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham). Purifikasi hasil PCR ini dilakukan melalui pemotongan gel agaros yang mengandung pita DNA hasil PCR. Potongan gel ini kemudian ditimbang (berat maksimum potongan gel yang akan diproses untuk setiap tabung 1,5 mL adalah 300 mg). Selanjutnya potongan gel dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL, lalu ditambahkan "capture buffer" dengan perbandingan 1:1 (b/v) dan divorteks dengan kuat agar potongan gel tersebut bisa bercampur. Kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C selama 5-15 menit sampai potongan gel agaros benar-benar larut. Campuran kemudian disentrifugasi secara singkat lalu dipindahkan ke dalam kolom GFX yang sebelumnya telah ditempatkan pada tabung koleksi, dan di inkubasi pada suhu ruang selama 1-5 menit. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan penuh (10.000-16.000 rpm) selama 0,5 menit sehingga cairan yang ada pada kolom akan pindah ke tabung koleksi. Cairan pada tabung koleksi ini dibuang dan kolom GFX ditempatkan kembali ke dalam tabung koleksi. Kemudian ke dalam kolom

GFX ditambahkan 500 μ L buffer pencuci ("wash buffer") lalu disentrifugasi kembali secara singkat (1 menit) sampai semua buffer pencuci berpindah dari kolom ke tabung koleksi. Selanjutnya, kolom GFX dipindahkan ke dalam tabung 1,5 mL steril. DNA pada kolom di resuspensi dengan 50 μ L ddH₂O, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama 1 menit sehingga diperoleh DNA murni. Fragmen DNA hasil pemurnian, di analisis dengan elektroforesis agaros 1 %, dan diperkirakan konsentrasinya melalui perbandingan dengan marker DNA.

4.7. Sekuensing (penentuan urutan DNA)

Penentuan urutan DNA (sekuensing) produk PCR dilakukan menggunakan metoda dideoxy Sanger dengan Dye terminator. Primer yang digunakan untuk sekuensing adalah primer untuk gen 16S rRNA (BactF I dan UniB I) serta primer untuk gen *ftf* (5FTF dan 6FTF)

BAB V. HASIL PEMBAHASAN

5.3. Kultivasi bakteri asam laktat dari sampel yohurt.

Penelitian ini berhasil memisahkan 3 jenis bakteri dari dua sampel yohurt yang diperoleh dari Kabupaten Garut. Koloni bakteri-bakteri tersebut dipisahkan sampai terbentuk koloni bakteri yang seragam dengan menggunakan media selektif MRS. Penumbuhan dilakukan pada 37 °C selama 24 jam, pada kondisi anaerob. Contoh bentuk koloni bakteri yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 5.1.



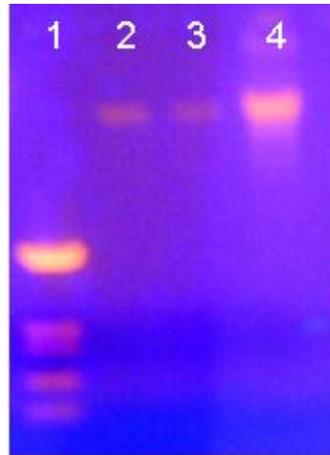
Gambar 5.1. Contoh bentuk koloni bakteri dari sampel 1. Bakteri ditumbuhkan dari sampel yohurt pada media MRS. Penumbuhan dilakukan pada 37 °C selama 24 jam, pada kondisi anaerob.

Koloni-koloni bakteri ini kemudian ditumbuhkan dalam media MRS cair untuk disimpan sebagai stok gliserol dan untuk proses isolasi DNA genom.

5.4. Hasil isolasi DNA genom.

Hasil isolasi DNA genom yang ditunjukkan pada gambar 5.2 menandakan bahwa seluruh tahap isolasi DNA genom berlangsung dengan baik karena memperlihatkan adanya satu pita DNA yang berada jauh diatas pita pertama penanda DNA pUC19/*Hinf* I pada gel agaros. DNA genom bakteri merupakan satu DNA sirkular yang berukuran lebih dari satu juga pasang basa. Sedangkan penanda DNA pUC19/*Hinf* I merupakan fragmen-fragmen berukuran 1419 pb, 517 pb, 396 pb, 214

pb, 75 pb, dan 65 pb. Jadi dari gambar ini tidak dapat diperkirakan ukuran DNA genom yang telah berhasil di isolasi, namun dari posisinya pada gel agaros, sudah dapat dipastikan bahwa DNA genom sudah berhasil di isolasi.

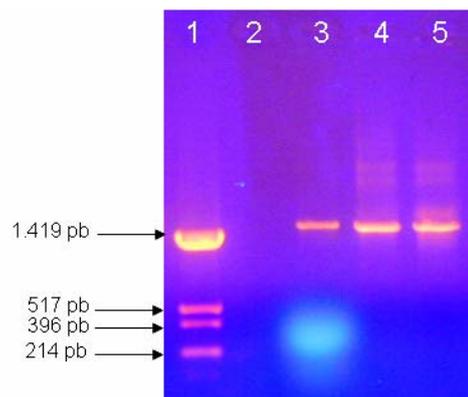


Gambar 5.2. Analisis hasil isolasi DNA genom. (1) Penanda pUC19/*Hinf* I, (2) DNA genom sampel 1; (3) DNA genom sampel 2; dan (3) DNA genom sampel 3.

5.3. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA.

Amplifikasi gen 16S rDNA terhadap DNA genom bakteri asam laktat dilakukan untuk memastikan keberhasilan proses isolasi DNA genom. Selain itu produk PCR gen 16S rRNA juga digunakan untuk identifikasi bakteri asam laktat yang telah berhasil di isolasi. Gen 16S rDNA merupakan gen pengkode rRNA 16S pada bakteri. Gen ini mempunyai beberapa urutan yang *conserved* (lestari) dan beberapa urutan yang bervariasi pada eubakteria, sehingga urutan nukleotida gen 16S rDNA dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. Primer BactF I dan UniB I merupakan primer oligonukleotida untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA yang telah digunakan oleh peneliti sebelumnya (Baker, G., et al. 2001).

Hasil PCR gen 16S rDNA ditunjukkan pada gambar 5.3. Gambar ini memperlihatkan bahwa fragmen gen 16S rDNA yang berukuran sekitar 1,4 kilo basa telah berhasil diamplifikasi dari bakteri 1, 2 dan 3 menggunakan primer BactF I dan UniB I. Hasil negatif pada kontrol negatif menunjukkan bahwa amplikon yang dihasilkan bukan berasal dari kontaminan.



Gambar 5.3. Analisis hasil PCR gen 16S rRNA. (1) Penanda pUC19/*Hinf* I, (2) Kontrol negatif, (3, 4 dan 5) 10 μ L produk PCR sampel 1, 2 dan 3 dengan menggunakan pasangan primer BactF1 dan UniB1, ukuran diperkirakan sekitar 1,4 kb.

Produk PCR gen 16S rRNA ini kemudian di murnikan menggunakan *GFXTM PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham) dan dilakukan sekuensing menggunakan metoda dideoksi Sanger. Hasil sekuensing dapat digunakan untuk identifikasi molekular bakteri asam laktat yang terdapat dalam sampel yohurt dengan cara membandingkan tingkat homologinya dengan urutan gen 16S rRNA yang terdapat di GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Saat ini proses sekuensing sedang dilakukan, dimana sampel dikirim ke Macro-gene (Korea) sehingga hasil sekuensing belum dapat ditampilkan pada laporan ini.

5.4. Hasil Amplifikasi fragmen gen *ftf*.

Amplifikasi fragmen gen *ftf* dilakukan menggunakan sepasang primer 5FTF dan 6FTF. Bila proses PCR berhasil dilakukan, maka akan diperoleh amplicon berukuran sekitar 234 pasang basa. Primer 5FTF dan 6FTF merupakan *degenerated* primer, yaitu primer yang dirancang berdasarkan hasil penjajaran urutan asam amino gen FTF yang konserve (lestari) dari sejumlah bakteri gram positif (van Hijum *et al.*, 2002). Urutan primer 5FTF dan 6FTF serta T_m -nya tercantum pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Urutan dan Tm primer 5FTF dan 6FTF

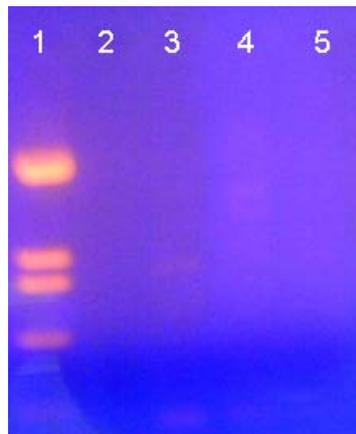
Nama primer	Urutan nukleotida	Tm
5FTF	5'-GAYGTNTGGGAYWSNTGGGCC-3'	53,1
6FTF	5'-GTNGCNSWNCCNSWCCAYTSYTG-3'	55,5

Lambang nukleotida yang digunakan berdasarkan pada *International Union of Biochemistry*, dimana N mengkode semua basa; M, A atau C; R, A atau G; W, A atau T; S, C atau G; Y, C atau T; K, G atau T; B, selain A; D, selain C; H, selain G; V, selain T.

Hasil PCR fragmen gen *ftf* ditunjukkan pada gambar 5.4. Gambar ini memperlihatkan bahwa proses PCR belum berjalan dengan sempurna, dimana pita fragmen DNA yang dihasilkan sangat tipis, sehingga tidak terlihat pada dokumentasi, disamping itu juga masih terlalu banyak terdapat pita DNA yang tidak spesifik. Proses PCR dilakukan dengan campuran reaksi terdiri dari: 1-2 μ L (20-50 ng) DNA genom, 2,5 Unit enzim Taq DNA Polimerase (Fermentas), buffer PCR 1X, 5 μ M primer 5FTF, 5 μ M primer 6FTF, 1,5-2,5 mM MgCl₂ dan ddH₂O, dengan volume total 50 μ L. Siklus PCR dimulai dengan denaturasi awal pada 95 °C selama 2 menit, diikuti dengan 30 siklus : (denaturasi pada 95 °C selama 1 menit; penempelan primer pada 45-55 °C selama 1 menit; dan polimerisasi pada 72 °C selama 1 menit) dan pemanjangan akhir pada 72 °C selama 10 menit. Untuk mengoptimalkan proses reaksi PCR, juga telah dilakukan variasi konsentrasi MgCl₂ yaitu 1,5 mM dan 2,5 mM (konsentrasi maksimal MgCl₂ fisiologis). Selain itu juga dilakukan variasi suhu annealing (penempelan primer) dari 45 – 58 °C. Tabel 2 memperlihatkan variasi suhu annealing dan hasil yang diperoleh.

Tabel 5.2. Optimasi suhu *annealing* untuk amplifikasi gen *ftf* dan hasilnya.

Suhu <i>annealing</i>	Konsentrasi MgCl ₂	Hasil
45	1,5	Banyak pita DNA tidak spesifik
45	2,5	Banyak pita DNA tidak spesifik
48	1,5	Banyak pita DNA tidak spesifik
48	2,5	Banyak pita DNA tidak spesifik
50	1,5	Tidak ada pita
58	1,5	Tidak ada pita



Gambar 5.4. Analisis hasil PCR fragmen gen *ftf*. (1) Penanda pUC19/*Hinf* I, (2) Kontrol negatif, (3, 4 dan 5) 10 μ L produk PCR sampel 1, 2 dan 3 dengan menggunakan pasangan primer 5FTF dan 6FTF.

Karena pita fragmen DNA yang diinginkan, diperoleh sangat tipis, maka proses purifikasi fragmen DNA produk PCR tidak dapat dilakukan, dan proses sekuensing fragmen gen *ftf* juga tidak dapat dilakukan. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diperkirakan proses optimasi kondisi reaksi PCR harus dilakukan lagi. Selain itu juga akan dicoba merancang primer lain untuk amplifikasi gen *ftf*.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Tiga jenis koloni bakteri asam laktat dari sampel yohurt telah berhasil di isolasi dan dikulturkan dalam media MRS.
2. DNA genom dari koloni-koloni bakteri tersebut telah berhasil di isolasi.
3. Amplifikasi gen 16S rRNA dari koloni-koloni bakteri sampel yohurt dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer BactF1 dan UniB1 telah menghasilkan fragmen DNA berukuran 1,4 kb.
4. Amplikon fragmen gen 16S rRNA telah dimurnikan dan sedang ditentukan urutan nukleotidanya.
5. Amplifikasi fragmen gen *ftf* dari koloni-koloni bakteri sampel yohurt teknik PCR menggunakan pasangan primer 5FTF dan 6FTF, menghasilkan pita DNA yang tipis dan banyak pita yang tidak spesifik.

6.2. Saran

1. Untuk memperoleh pita DNA yang diinginkan dari proses PCR fragmen gen *ftf* dari koloni-koloni bakteri sampel yohurt, perlu dilakukan optimasi kondisi PCR dan atau perancangan primer baru.

DAFTAR PUSTAKA

- Baker G. C., Gaffar S., Cowon D. C., Suharto A. R., Microbial community analysis of Indonesian hot-springs. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001 Jun 12; 200(1): 103-109.
- Bergeron, L.J., E.M Bermudez, and R.A. Burne, (2000), Characterization of the fructosiltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45, *J. of Biotechnology*, 182, 13, 3649-3654.
- Du Toit, M., C.M. Franz, L.M.T. Dicks, U. Schilinger, P. Haberer, B. Warlies, F. Ahrens, and W.H. Holzapfel (1998), Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol level, faeces pH and faeces moisture content, *Int.J. Food Microbiol*, 40: 93-104.
- De Vuyst, L. and B. Degeest (1999), Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
- De Vuyst, L. and L.M. Marshall (2001), Special issue: first symposium on exopolysaccharides from lactic acid bacteria: from fundamentals to application, *Int.Dairy J.* 11.
- Gamar, L., K. Blondeau, and J.M. Simonet (1997), Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83, *J.Appl. Microbiol*, 83: 281-287.
- van Geel-Schuten, G.H., E.J. Faber, E. Smit, K. Bonting, M.R. Smith, B.T. Brink, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, and L. Dijkhuizen (1999), Biochemical characterization of the glucan and fructan exopolisaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild type strain and by mutant strains, *Appl. And Env. Microbiol.*, vol. 65 no.7, 3008-3014.
- van Hijum, S.A.F.T., G.H. van Geel-Schuten, , H. Rahaoui, , M.J.E.C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen (2002), Characterization of a novel fructosiltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides, *Appl. And Env. Microbiol.*, vol. 68, no.9, 4390-4398.
- van Hijum, S.A.F.T., G.H. van Geel-Schuten, , H. Rahaoui, , M.J.E.C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen (2002), Characterization of a novel fructosiltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides, *Appl. And Env. Microbiol.*, vol. 68, no.9, 4390-4398.

LAMPIRAN I
INSTRUMEN PENELITIAN

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini meliputi instrumen yang digunakan pada penelitian biologi molekuler yang terdapat di Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia, FMIPA, UNPAD.

No.	Nama Alat	Kegunaan
1.	<i>Thermocycler</i>	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
2.	Sentrifugasi	Pemisahan
3.	Spektrofotometer	Pengukuran konsentrasi DNA
4.	Elektroforesis DNA	Karakterisasi DNA
5.	Inkubator	Fermentasi
6.	Autoklaf	Sterilisasi
7.	<i>Shaker</i> inkubator	Pertumbuhan kultur
8.	<i>Vacuum concentrator</i>	Pemekatan
9.	<i>Laminar air flow</i>	Pengkulturan bakteri

LAMPIRAN II
PERSONALIA TENAGA PENELITI

1. Ketua peneliti

- a. Nama : Yeni W. Hartati, M.Si
- b. Golongan/ Pangkat/ NIP : III/c / Penata / 132 206 491
- c. Jabatan Fungsional : Lektor
- d. Jabatan Struktural : -
- e. Fakultas : MIPA
- f. Bidang keahlian : Kimia- Biokimia
- g. Perguruan tinggi : UNPAD
- h. Alokasi waktu : 8 jam/minggu

2. Anggota Peneliti

- a. Nama : Shabarni Gaffar, M.Si
- b. Golongan/ Pangkat/ NIP : III/a / Penata Muda / 132 313 560
- c. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
- d. Jabatan Struktural : -
- e. Fakultas : MIPA
- f. Bidang keahlian : Kimia- Biokimia
- g. Perguruan tinggi : UNPAD
- h. Alokasi waktu : 5 jam/minggu

3. Anggota Peneliti

- a. Nama : Iman Permana Maksum, M.Si
- b. Golongan/ Pangkat/ NIP : III/c / Penata / 132 169 937
- c. Jabatan Fungsional : Lektor
- d. Jabatan Struktural : -
- e. Fakultas : MIPA
- f. Bidang keahlian : Kimia- Biokimia
- g. Perguruan tinggi : UNPAD
- h. Alokasi waktu : 5 jam/minggu

LAMPIRAN III
KUALIFIKASI PENELITI

1. Ketua Peneliti

Nama lengkap dan gelar : Yeni Wahyuni Hartati, M.Si.

Tempat/ Tanggal lahir : Garut/ 24 September 1971

Alamat : Komp. Griya Cempaka Arum B10/108 Bandung

Riwayat Pendidikan

No.	Pendidikan	Tempat Pendidikan	Tahun Kelulusan
1.	Strata -1 FMIPA KIMIA	UNPAD- Bandung	1996
2.	Strata-2 FMIPA KIMIA	ITB- Bandung	1999

Pengalaman penelitian

No.	Judul Riset	Tahun
1.	Studi struktur fungsi gen sup45 mutan hipersensitif paramomisin di <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	1997-1999
2.	Penelitian DNA mitokondria manusia	2004
3.	Elektroda untuk deteksi DNA	2006

Publikasi:

1. **Hartati, Y.W.**, I.P. Maksum, (2004), Analisis urutan nukleotida hipervariabel I (HVI) DNA mitokondria pada lima generasi segaris keturunan ibu, Penelitian dosen muda, DIKTI.
2. **Hartati, Y.W.**, I.P. Maksum, Dian S.K., (2004), Amplifikasi fragmen 0,4 kb daerah d-loop DNA mitokondria dari sel efotel rongga mulut untuk keperluan forensik, DIKS, Lembaga penelitian UNPAD.
3. **Hartati, Y.W.**, Santhy. W., I.P. Maksum, (2000), Analisis keberadaan bakteri *Legionella pneumophila* dalam beberapa sumber air minum menggunakan metoda PCR, DIKS, Lembaga penelitian UNPAD.
4. **Hartati, Y.W.**, Mutagenesis terarah pada gen sup45 menggunakan metoda PCR, (2000), Proc. Seminar FMIPA UNPAD.

5. **Hartati, Y.W.**, Studi struktur fungsi gen sup45 mutan hipersensitif paramomisin di *S. cerevisiae*, (1999), Tesis magister ITB.

Bandung, November 2007

Yeni Wahyuni Hartati, M.Si.

2. Anggota Peneliti

Nama lengkap dan gelar : Shabarni Gaffar MSi

Tempat/ Tanggal lahir : Bukittinggi/ 25 April 1971

Alamat rumah : Jl. Gagak, gang Sadang Saip IV no. 123 Bandung

Riwayat Pendidikan

No.	Pendidikan	Tempat Pendidikan	Tahun Kelulusan
1.	Strata-1 FMIPA KIMIA	UNAND- PADANG	1995
2.	Strata-2 FMIPA KIMIA	ITB- BANDUNG	1998

Riwayat Pekerjaan

NO	PANGKAT	GOLONGAN	JABATAN	BERLAKU TERHITUNG
1.	PENATA MUDA	III / a	Asisten Ahli Madya	1 Januari 2005

Pengalaman penelitian

No.	Judul Riset	Tahun
1.	Varian Normal Urutan DNA Mitokondria Manusia Indonesia dan Produk Translasinya	1997-1999
2.	Identifikasi Bakteri Termofilik di Indonesia Melalui Sekuensing Gen 16S rRNA	1999-2000
3.	Produksi Insulin dari Gen Insulin Sintetik	2003
4.	Identification of Marine Organisms used as Traditional Medicine using 18s rRNA Sequences	2004-2005

Publikasi

Baker G. C., **Gaffar S.**, Cowon D. C., Suharto A. R., Microbial community analysis of Indonesian hot-springs. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001 Jun 12; 200(1): 103-109.

Rachmayanti, R., **Gaffar, S.**, Puspasari, F., Rahardjo, J.T., Atiemah, E.S., Hernawan, T., Arbianto, P., dan Noer A.S., (2001), Analisis Variasi Fragmen 0,4 kb Daerah *D-loop* DNA Mitokondria Manusia dari Suku Sunda di Indonesia, *Kongres dan Simposium Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI)*, Juli 2001, Bogor, Indonesia.

Ratnayani, K., Noer, A. S., **Gaffar, S.**, Puspasari, F., Rachmayanti, R., dan Atiemah, E.S., (2001), 15 Jenis Varian Normal Ditemukan pada Gen ND4 dan ND5 DNA Mitokondria 10 Individu Indonesia, *Kongres dan Simposium Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI)*, Juli 2001, Bogor, Indonesia

Rachmayanti, R., **Gaffar, S.**, Puspasari, F., Rahardjo, J.T., Atiemah, E.S., Hernawan, T., Arbianto, P., dan Noer A.S., (2000), Analisis Homologi Urutan 9746 pb Nukleotida D-loop DNA Mitokondria 22 Individu Indonesia: 2 Keluarga (3 Generasi) dan 10 Individu yang tidak Mempunyai Hubungan Keluarga, *Prosiding Seminar Kimia Bersama ITB-UKM IV*, Yogyakarta, Indonesia

Gaffar S , Varian Normal Urutan Nukleotida Fragment 0.4 kb Daerah D-loop DNA mitokondria Manusia Indonesia, *Thesis Magister*, 1998.

Bandung, November 2007

Shabarni Gaffar, M.Si

3. Anggota Peneliti

Nama lengkap dan gelar : Iman Permana Maksum, MSi

Tempat/ Tanggal lahir : Garut/ 13 Juli 1971

NIP/ Golongan : 132 169 937/ IIIc

Pangkat/ Jabatan : Penata/ Lektor

Alamat : Jl. Singaperbangsa No. 2 Bandung

Riwayat Pendidikan

No.	Pendidikan	Tempat Pendidikan	Tahun Kelulusan
1.	Strata -1 FMIPA KIMIA	UNPAD- Bandung	1995
2.	Strata-2 FMIPA KIMIA	ITB- BANDUNG	2003

Pengalaman penelitian

No	Judul Penelitian	Tahun
1.	Tiga mutasi spesifik yang lestari daerah D-loop DNA mitokondria manusia indonesia pada Lima generasi segaris keturunan ibu, Peneliti Muda	2004
2.	Penggunaan PCR-RFLP dan DNA rekombinan untuk penderita DM tipe II manusia Indonesia, Hibah Bersaing XIII	2004-2005
3.	Analisis urutan Nukleotida 0,4 kb D-loop DNA mitokondria Suku Sunda, Project grant QUE Project	2004
4.	Analisis urutan nukleotida HVI mtDNA manusia Baduy, DIKS Unpad	2005
5.	Analisis urutan nukleotida HVI mtDNA manusia Kampung Lelea ; DIK Unpad	2005
6.	Amplifikasi 0,4 kb HVI hasil lisis dengan metode <i>mouth scrap</i> untuk keperluan analisis <i>forensic</i>	2004
7.	Analisis urutan nukleotida HVI mtDNA manusia Sumedang Larang ; DIPA Unpad	2006

Publikasi:

No.	Karya Ilmiah
1.	Analisis mutasi A(3243)G gen tRNA ^{leu} DNA mitokondria pada penderita DM tipe II (fenotip MIDD) ; pada prosiding dies natalis UGM, 2005
2.	Analisis urutan nukleotida HVI mtDNA manusia Baduy ; Bionatura, November 2005
3.	Amplifikasi 0,4 kb HVI hasil lisis dengan metode <i>mouth scrap</i> untuk keperluan analisis forensik ; Bionatura, Maret 2006
4.	Penggunaan PCR-RFLP untuk penderita DM tipe II manusia Indonesia, Prosiding HKI, 2006
5.	Pencarian potensi MIDD dan pewarisannya di Indonesia dengan PCR-RFLP Teknik DNA rekombinan, Prosiding Pemaparan Hibah Bersaing, 2006 (sudah submit pada Bionatura)

Bandung, November 2007

Iman Permana Maksum, MSi