

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Termofilik Asidofil

Termofilik asidofil merupakan bakteri yang dapat tumbuh optimum pada suhu diatas 50 °C (Trent, 2000) dan pada pH rendah (2-4), bahkan lebih rendah dari rentang tersebut (van den Burg, 2003; van de Vossenberg, 1998). Bakteri ini dapat diisolasi lingkungan termoasidik dari sumber air panas yang bersifat asam dan daerah solfatarik (Crossman *et al.*, 2004). Organisme termofilik asidofil mampu menghasilkan enzim yang bersifat termostabil (Irwin dan Baird, 2004) yang aktif pada pH rendah dan resisten terhadap pendenaturan protein dan pelarut organik (Parvaresh *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 2003). Bakteri ini mempunyai kemampuan untuk menjaga pH internalnya dan enzim ekstraselulernya dapat berfungsi baik sesuai dengan pH lingkungannya (van den Burg, 2003).

Sejauh ini penelitian terhadap mekanisme adaptasi termofilik terhadap suhu tinggi menunjukkan adanya perbedaan struktur serta fenomena yang berbeda dengan bakteri mesofilik (D'Auria *et al.*, 2000), meliputi membran dan dinding sel, protein (Friedman, 1992; Bullock, 2000), serta asam nukleat (Friedman, 1992). Membran sel bakteri pada termofilik asidofil tersusun atas eter derivat lipid yang akan meningkatkan stabilitasnya, sehingga resisten terhadap hidrolisis termal dan pH asam (Stetter, 1999; Bullock, 2000). Membrannya memiliki permeabilitas yang rendah terhadap proton, sehingga pH internalnya tidak terpengaruh oleh lingkungan yang asam (van de Vossenberg, 1998).

Makromolekul pada termofilik dimodifikasi secara intrinsik. Modifikasi struktur secara intrinsik akan meningkatkan termostabilitas makromolekul pada termofilik dan modifikasi secara ekstrinsik akan meningkatkan termostabilitas intraseluler. Modifikasi ini melibatkan pertukaran garam-garam intraseluler, interaksi hidrofobik, dan pemakaian pelarut yang sesuai serta sintesis protein spesifik (Trent, 2000; Bruins *et al.*, 2001). Kelas protein itu disebut dengan *heat shock proteins* (HSPs). HSPs ini diproduksi secara melimpah dan menjadi sesuatu yang esensial bagi kelangsungan hidup termofilik (Trent, 2000). HSPs akan mempertahankan konformasi protein dan memungkinkan terjadinya renaturasi (Stromer *et al.*, 2003; Macario *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997; Jakob *et al.*, 1993).

2.2. Mikrobiologi Konvensional Parsial

Identifikasi jenis-jenis bakteri secara mikrobiologi konvensional dapat dilakukan dengan menggunakan media selektif yang mampu membedakan antara jenis bakteri satu dengan yang lain. Media selektif tersebut merupakan media sintetik yang dirancang khusus untuk jenis bakteri tertentu sehingga bakteri yang tidak cocok dengan media akan memberikan reaksi yang berbeda. Akan tetapi cara identifikasi ini memiliki kekurangan dengan adanya keterbatasan media pengkulturan bakteri (Wise *et al.*, 1997).

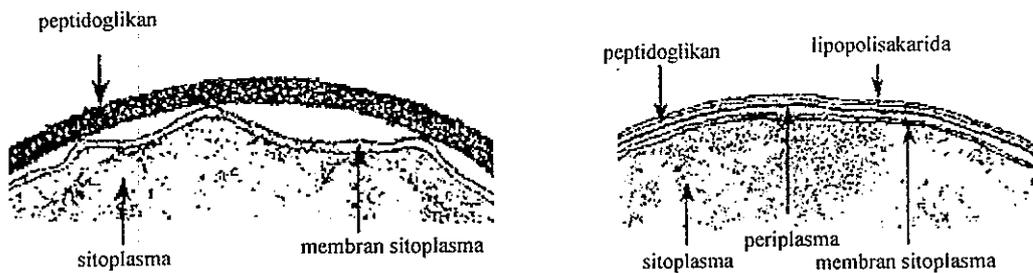
Identifikasi, penentuan serta pengelompokan bakteri dapat dilakukan berdasarkan studi morfologi, biokimia, dan karakteristik imunologi (Bavykin *et al.*, 2004). Studi morfologi mencakup uji pewarnaan Gram serta uji mikroskopis.

Biasanya kedua uji tersebut digunakan sebagai dasar dalam taksonomi serta uji pendahuluan yang akan mengarahkan untuk identifikasi yang lebih selektif (McClelland, 2001).

2.2.1. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan uji pendahuluan dalam identifikasi spesies dan sangat penting dalam taksonomi bakteri. Uji ini mengelompokkan bakteri menjadi dua golongan yaitu Gram-positif dan Gram-negatif, selain itu tidak menggambarkan kuantitas suatu kultur melainkan hanya bersifat kualitatif (McClelland, 2001; Saida *et al.*, 1998). Pewarnaan Gram didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri (Saida *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1995).

Bakteri Gram-positif memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan Gram-negatif. Dinding sel bakteri Gram-positif hanya tersusun atas lapisan peptidoglikan yang tebal, sedangkan Gram-negatif tersusun atas beberapa lapisan. Akan tetapi pada Gram-negatif memiliki peptidoglikan yang jauh lebih tipis dari Gram-positif serta memiliki kandungan lemak yang lebih besar. Pada bakteri Gram-negatif memiliki lipopolisakarida (LPS) pada bagian *outer membrane* di luar peptidoglikan, yang dapat rusak oleh adanya pencucian aseton ataupun alkohol (Beveridge, 1999; McClelland, 2001). Perbedaan komponen penyusun dinding sel pada bakteri Gram-positif dan Gram-negatif tercantum dalam gambar 2.1.



Gambar 2.1. Komponen penyusun dinding sel bakteri. Gram-positif (kiri) dan Gram-negatif (kanan) (Wolfe, 1993).

Reaksi kimia terjadi antara kristal ungu dengan iodin di dalam sel bakteri membentuk kompleks kristal ungu-iodin. Selama tahap pencucian, lemak pada bakteri gram-negatif akan terekstraksi oleh pelarut kemudian keluar dari dinding sel sehingga kompleks kristal ungu-iodin juga ikut keluar, selanjutnya dinding sel dapat diwarnai dengan *counterstain* (McClelland, 2001; Saida *et al.*, 1998), sedangkan pada bakteri gram-positif, kompleks tersebut akan tetap tertahan di dalam sel. Hal ini disebabkan oleh lapisan peptidoglikan yang tebal pada bakteri gram positif akan terdehidrasi oleh larutan pencuci sehingga pori-porinya akan menyempit, dengan demikian akan menyebabkan kompleks tidak dapat keluar dan *counterstain* tidak dapat masuk menembus dinding sel (Beveridge, 1999; Saida *et al.*, 1998).

2.2.2. Pengamatan mikroskopis

Bentuk sel bakteri dapat diamati dengan bantuan mikroskop. Berdasarkan penampakan morfologinya, Ferdinand Cohn mengelompokkan bakteri terdiri atas kokus, batang pendek, batang panjang dan spiral (Roble *et al.*, 2001) Bentuk ini dapat digunakan dalam penggolongan jenis-jenis bakteri secara garis besar.

2.3. Enzim Termostabil

Organisme termofilik mampu menghasilkan enzim yang aktif pada temperatur diatas 50 °C dan resisten terhadap denaturasi irreversibel pada temperatur tersebut. Enzim termostabil dari termofilik dapat mengkatalisis reaksi biokimia pada temperatur tinggi dan secara umum lebih stabil serta lebih rigid dibandingkan enzim dari mesofil. Rigiditas yang lebih besar dapat menjaga struktur katalitiknya tetap aktif. Rigiditas tersebut disebabkan oleh pembentukan jembatan disulfida (Bruins *et al.*, 2001).

Enzim termostabil tidak hanya memiliki stabilitas yang tinggi terhadap adanya bahan pendenaturasi protein misalnya detergen dan pelarut organik (Bullock, 2000; Choi *et al.*, 2003; Parvaresh *et al.*, 1990), tetapi juga aktivitasnya meningkat dengan adanya kenaikan temperatur (Choi *et al.*, 2003). Reaksi enzimatik pada temperatur tinggi akan meningkatkan transfer massa, menurunkan viskositas, meningkatkan kelarutan substrat dan meminimalisasi adanya resiko kontaminasi (Choi *et al.*, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa bentuk struktural dengan stabilitas yang tinggi melibatkan suatu perubahan yang akan mengurangi aktifitas secara keseluruhan.

Menurut Bullock (2001), termostabilitas pada enzim termostabil disebabkan oleh: 1). Substitusi asam amino yang berhubungan fleksibilitas konformasional (glisin, serin, alanin) dan berhubungan dengan rigiditas (treonin, valin, prolin), 2). Substitusi pada asam amino dengan gugus aktif secara kimia (sistein (-SH), metionin, glutamin dan asparagin (-CONH₂)) yang akan mempengaruhi sisi katalitik, 3). Rasio yang lebih tinggi antara arginin : lisin yang

dipengaruhi oleh interaksi polar yang kuat, 4). Immobilisasi pada matriks yang tidak terlarut.

Enzim termostabil yang telah berhasil diteliti dan digunakan untuk aplikasi bioteknologi diantaranya protease, amilase dan betagalaktosidase.

2.3.1. Protease

Protease merupakan enzim degradatif yang mengkatalisis hidrolisis protein secara menyeluruh dengan memutuskan ikatan peptida pada protein. Protease memiliki peran yang besar, mulai dari tingkat seluler hingga tingkat organ dan organisme. Secara fisiologi, protease sangat diperlukan oleh organisme, oleh karena itu protease dapat ditemukan pada hewan, tanaman maupun bakteri (Rao *et al.*, 1998). Protease termostabil diperlukan dalam industri minuman, makanan, dan detergen (van den Burg, 2003). *Thermus sp.* merupakan salah satu termofilik penghasil protease (Shaw *et al.*, 1995). Produksi protease ekstraseluler dapat diketahui dengan adanya hidrolisis gelatin oleh kultur bakteri pada media pertumbuhan yang telah diinduksi dengan gelatin (Juarez dan Stinson, 1999; Seely dan van Demark, 1971).

2.3.2. Amilase

Amilase merupakan enzim yang menghidrolisis molekul pati menghasilkan produk meliputi dekstrin-dekstrin dan polimer-polimer lebih kecil yang tersusun atas glukosa (Reddy *et al.*, 2003). Amilase dapat dibagi menjadi dua kategori, endoamilase dan eksoamilase. Endoamilase mengkatalisis hidrolisis secara acak pada bagian dalam molekul pati menghasilkan oligosakarida linier dan bercabang (Reddy *et al.*, 2003). Eksoamilase mengubah dari gugus bukan

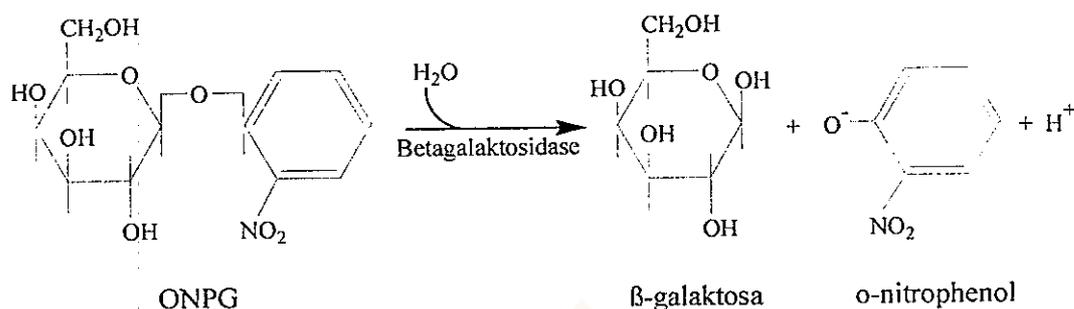
pereduksi menjadi produk akhir yang lebih pendek (Jørgensen *et.al.*, 1997). Teknik pewarnaan iodine terhadap kultur pada media yang telah diinduksi dengan amilum dapat digunakan untuk skrining produksi enzim amilase oleh kultur bakteri (Shaw *et al.*, 1995). Hasil uji positif jika tidak terbentuk warna ungu setelah penambahan iodine.

Amilase termotabil telah banyak digunakan dalam aplikasi secara luas diantaranya dalam bidang medis, dan kimia analitik, selain itu juga dalam industri makanan, tekstil, fermentasi, kertas, dan minuman (Reddy *et al.*, 2003). Amilase biasanya terdapat pada hewan, tanaman dan mikroorganisme seperti jamur dan bakteri (Shaw *et al.*, 1995). Beberapa spesies *Bacillus* dan *Actinomyces* termotabil dapat menghasilkan amilase (Reddy *et al.*, 2003). Akan tetapi, tidak semua jenis bakteri dapat menghasilkan enzim ini, hanya bakteri yang memiliki gen pengkode pembentuk amilase yang dapat memproduksi. *Sulfolobus solfataricus* P2 merupakan salah satu jenis bakteri yang tidak memiliki gen pengkode pembentuk amilase ekstraseluler (She *et al.*, 2001).

2.3.3. Beta galaktosidase

Beta galaktosidase mengkatalisis hidrolisis ikatan β -1,4-galaktosida. Enzim ini terdapat pada beberapa bakteri, tanaman dan jaringan hewan. Beta galaktosidase diaplikasikan untuk menghidrolisis laktosa pada pembuatan bahan pangan seperti susu dan keju (Vian *et al.*, 1998). Little *et al.*, (1989) telah berhasil menemukan enzim beta galaktosidase termotabil dari termofilik asidofil *Sulfolobus solfataricus*. Enzim ini dapat diidentifikasi dengan senyawa kromogenik *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) (Corbett dan Catlin, 1968).

Tes ONPG digunakan untuk mendeteksi adanya hidrolisis laktosa, yang tergantung pada dua enzim yaitu enzim ekstraseluler beta galaktosidase dan permease yang mengatur penetrasi dinding sel. Tes ini berdasarkan pada hidrolisis ONPG menjadi galaktosa dan orthonitrophenol (ONP) yang berwarna kuning (Cown, 1974). ONP sebagai indikator adanya aktivitas betagalaktosidase.



Gambar 2.2. Reaksi hidrolisis ONPG menghasilkan senyawa berwarna ONP (Miller, 1972).

2.4. Gen 16S ribosomal Ribonucleicacid (rRNA)

Analisis asam nukleat merupakan metode yang terbaik untuk mengelompokkan dan menentukan kekerabatan antar organisme baik prokariot maupun eukariot. Salah satunya dengan melihat urutan nukleotida pada gen 16S rRNA. Analisis ini dapat digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan pada bakteri dengan menentukan urutan gen 16S rRNA (16S rDNA) (Kwon *et al.*, 1997).

Ribosom berperan penting dalam sintesis protein. RNA ribosomal merupakan molekul yang telah berevolusi dan bersifat homolog baik secara fungsional ataupun evolusinya pada organisme yang berbeda (Millar *et al.*, 2002). Pada bakteri tersusun atas subunit kecil (*small subunit*, SSU) dan unit besar (*large unit*). Subunit kecil (30S; ~ 900 kDa) terdiri atas 16S rRNA (~ 1500 nukleotida)

dan 21 protein. Subunit besar (50S; ~ 1500 kDa) yang tersusun atas 23S RNA (~ 2900 nukleotida), 5S RNA (~ 120 nukleotida) dan 31 protein (Woodson dan Leontis, 1998).

Gen SSU rRNA terdiri atas daerah yang *conserved* terhadap perubahan evolusi dan daerah variabel. Daerah yang *conserved* merupakan sisi pengikatan primer yang ideal dalam PCR, karena dapat diprediksikan sisi pengikatannya dengan DNA dari organisme *unknown*. Hasil amplifikasi (amplikon) DNA sampel dapat digunakan untuk identifikasi gen setelah kloning dan sekuensing (Schmalenberger *et al.*, 2001).

Daerah 16S rRNA merupakan sekelompok nukleotida diantara multi heliks yang dipertahankan secara turun temurun (Woodson dan Leontis, 1998). Molekul ini berada dalam jumlah besar di dalam sel sehingga mudah diisolasi dan merupakan molekul yang strukturnya terkonservasi. Selain itu dapat teramplifikasi secara alami bersama dengan sel (Bavykin *et al.*, 2004).

2.5. Amplifikasi secara *in vitro* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode khusus untuk identifikasi segmen unik pada DNA dengan cepat dan sensitif (Isaacman *et al.*, 1998), selain itu PCR juga merupakan metode amplifikasi DNA secara *invitro* dalam suatu tabung. Pada dasarnya PCR dan kloning memiliki fungsi yang sama yaitu mengamplifikasi DNA, tetapi PCR dilakukan secara *in vitro* sedangkan kloning secara *in vivo* (Brown, 1995).

Teknik PCR merupakan sarana yang akurat dalam analisis sampel dan penyusunan urutan *database*, serta dapat digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen 16S rRNA bakteri yang diisolasi dari habitat yang ekstrim dan beranekaragam (Hugenholtz *et al.*, 1998). Banyak organisme yang belum teridentifikasi dapat diidentifikasi hingga tingkatan filum baru, dan keluar dari garis keturunannya. Beberapa dari filum baru tersebut tidak dapat dikulturkan secara representatif, tetapi dengan analisis PCR mengindikasikan bahwa filum terbaru tersebut sangat melimpah di lingkungannya (Tanner, *et al.*, 2000).

Hal-hal yang mempengaruhi proses PCR terdiri atas komponen-komponen penting, antara lain: (1). DNA polimerase termotabil, (2). Oligonukleotida yang digunakan sebagai primer, (3). *Deoxynucleosida triphosphates* (dNTPs), (4). Ion divalen dan monovalen, (5). Bufer untuk menjaga kestabilan pH, dan (6). DNA cetakan (Sambrook dan Russel, 2001).

Proses PCR meliputi tahapan denaturasi oleh pemanasan, *annealing* primer dan *extension* oleh DNA polimerase termotabil.

2.5.1. Denaturasi

Denaturasi untai ganda DNA tergantung pada jumlah basa C+G yang ada. Jika basa C+G dalam perbandingan jumlah yang besar (>55%) dan ukuran molekul DNANYA relatif lebih panjang, maka diperlukan temperatur yang lebih tinggi untuk memisahkan untai ganda menjadi untai tunggal secara sempurna. Pada PCR yang dikatalisis oleh *Taq* DNA polimerase, denaturasi terjadi pada 94-95 °C (Sambrook dan Russel, 2001).

2.5.2. Hibridisasi/ *annealing*

Selama proses *annealing* terjadi hibridisasi antara primer dengan templatnya (Brown, 1995). Proses *annealing* terjadi pada temperatur yang bersifat kritis. Jika *annealing* terjadi pada temperatur yang terlalu tinggi maka DNA yang teramplifikasi sangat sedikit, tetapi jika terjadi pada temperatur yang terlalu rendah maka dimungkinkan akan terjadi amplifikasi pada fragmen yang tidak diinginkan. Kondisi *annealing* yang paling optimal terjadi pada temperatur sekitar 2 °C hingga 10 °C dibawah titik leleh (*melting temperatur*, T_m) atau dua primer (Sambrook dan Russel, 2001). T_m merupakan temperatur saat 50 % untai ganda DNA terdisosiasi. T_m dapat ditentukan dengan persamaan sebagai berikut:

$$T_m = (4 \times [G + C] + (2 \times [A + T])) \text{ } ^\circ\text{C}$$

[G + C] adalah jumlah nukleotida G dan C, sedangkan [A + T] adalah jumlah nukleotida A dan T dalam urutan primer (Brown, 1995).

2.5.3. *Extension* (pemanjangan) primer

Proses pemanjangan primer terjadi di dekat temperatur optimal DNA polimerase termostabil yang digunakan. *Taq* DNA polimerase optimum bekerja pada temperatur 72-78 °C. Enzim ini mampu mengkatalisis polimerisasi dengan kecepatan sekitar 2000 nukleotida per menit.

2.5.4. Jumlah siklus

Banyaknya siklus yang diperlukan dalam amplifikasi tergantung pada jumlah DNA pada awal reaksi, efisiensi primer serta amplifikasi (Sambrook dan Russel, 2001). Menurut Innis dan Gelfand (1990), Kesalahan yang umumnya terjadi disebabkan oleh banyaknya jumlah siklus. Jumlah siklus yang terlalu

banyak dapat meningkatkan jumlah produk tetapi juga memungkinkan banyaknya produk nonspesifik. Akan tetapi jika jumlah siklus terlalu sedikit, maka akan menghasilkan produk yang relatif kecil.

2.6. Identifikasi Spesies Bakteri dengan analisis *Single-Strand Conformational Polymorphism* (SSCP)

Bakteri memiliki urutan nukleotida pada gen 16S rRNA yang sangat *conserved* (Abu Al-Soud *et al.*, 2003). Oleh karena itu, pendekatan genetika sering digunakan untuk analisis dan membandingkan sampel dalam jumlah besar dalam suatu komunitas. Salah satu metode yang efisien untuk mengetahui perbedaan urutan gen hingga tingkat spesies adalah *Single-Strand Conformational Polymorphism* (SSCP) (Stach *et al.*, 2001). Melalui metode ini, produk PCR yang mempunyai ukuran sama tetapi urutannya berbeda dapat dipisahkan, karena pita tunggal atau profil genetiknya dapat diisolasi dan diidentifikasi dengan sekuensing (Schmalenberger *et al.*, 2001). SSCP dapat mengidentifikasi variasi urutan untai tunggal DNA biasanya sekitar 150-250 nukleotida (Humpries *et al.*, 1997), bahkan hingga 500 nukleotida (Markoff, 1997). Oleh adanya pengaruh kondisi nondenaturasi, untai tunggal DNA akan menunjukkan konformasi yang unik tergantung pada susunan urutannya. Perbedaan ini akan terdeteksi dengan adanya perbedaan mobilitas pada saat elektroforesis (Lee *et al.*, 1996; Humpries *et al.*, 1997; Hennesy *et al.*, 1998), biasanya dengan gel poliakrilamida (PAA) (Humpries *et al.*, 1997; Mittersky *et al.*, 2000). Selain bentuk konformasinya,

mobilitas DNA dalam gel juga dipengaruhi oleh panjang dan berat molekulnya (Lee *et al.*, 1996).

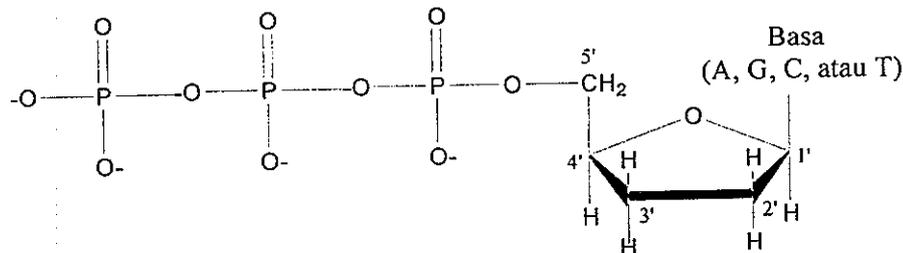
Selain untuk analisis komunitas, SSCP sering digunakan untuk skrining mutasi (Humpries *et al.*, 1997; Markoff *et al.*, 1997; Hennesy *et al.*, 1998; Mittersky *et al.*, 2000), polimorfisme dan variant urutan gen (Mittersky *et al.*, 2000). Menurut Hennesy *et al.* (1998), metode ini merupakan metode yang paling mudah dalam prosedur skrining, efektif, cepat dan memerlukan perlengkapan sederhana dengan keberhasilan deteksi yang tinggi.

2.7. Sekuensing dengan Metode Dideoxy -Sanger

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan DNA dan menjadi dasar dalam manipulasi gen. Ada beberapa metode yang dikembangkan dalam teknik sekuensing DNA, diantaranya dengan metode Maxam-Gilbert dan teknik terminator rantai. Selain itu ada beberapa teknik yang didasarkan pada teknik terminator rantai tetapi dengan modifikasi tertentu (Old dan Primrose, 1994). Pada sekuensing dapat digunakan fragmen DNA hasil PCR ataupun kloning. Tahapan proses sekuensing sama dengan proses PCR, hanya saja pada sekuensing ini diperlukan satu primer dan melibatkan terminator rantai ddNTP (Strachan dan Read, 1999).

Metode Dideoxy-Sanger berdasarkan pada sifat DNA polimerase yaitu kemampuannya dalam mensintesis komplemen cetakan DNA untai tunggal dan kemampuan untuk menggunakan 2',3'-*dideoxynucleoside triphosphates* (ddNTP) sebagai substrat (Brow, 1990). Penggunaan keempat ddNTP dapat menyebabkan

terjadinya terminasi pada proses *annealing*, karena ddNTP tidak memiliki gugus OH pada atom C 3' sehingga tidak dapat membentuk ikatan fosfodieter dengan nukleotida selanjutnya (Sambrook dan Russel 2001).



Gambar 2.3. Struktur 2',3'-*dideoxynucleoside triphosphates* (ddNTP) (Old dan Primrose, 1994).

2.8. Elektroforesis gel DNA

Elektroforesis merupakan transpor partikel oleh adanya medan elektrik, yang disebabkan oleh adanya gradien potensial. Elektroforesis lebih dipengaruhi oleh muatan makromolekul daripada massanya. Metode ini dapat digunakan untuk analisis dan separasi campuran (van Holde *et al.*, 1998).

Pada umumnya, makromolekul dipisahkan menggunakan gel poliakrilamida maupun gel agarosa. Pemilihan gel ini tergantung pada ukuran fragmen yang akan dipisahkan.

2.8.1. Gel poliakrilamida

Untuk fragmen yang lebih kecil (5-500 pasang basa) lebih efektif jika digunakan poliakrilamida karena poliakrilamida memiliki daya pisah yang tinggi dan dapat memisahkan fragmen DNA dengan jarak 1 pasang basa. Selain itu gel ini memiliki kecepatan pisah yang tinggi dan dapat memisahkan DNA dalam jumlah yang besar. Gel poliakrilamida digunakan untuk secara vertikal.

2.8.2. Gel Agarosa

Gel agarosa memiliki daya pisah yang lebih rendah dari pada gel poliakrilamida, akan tetapi memiliki jarak pemisahan yang lebih besar. Ukuran DNA yang dapat dipisahkan mulai dari 50 pasang basa hingga beberapa megabasa dalam berbagai variasi konsentrasi dan konfigurasi. DNA dengan ukuran fragmen 50-20000 pasang basa sangat baik jika dipisahkan dengan gel agarosa dengan elektroforesis secara horizontal. Beberapa faktor yang mempengaruhi mobilitas DNA pada gel agarosa antara lain konsentrasi agarosa, ukuran molekul DNA, konformasi DNA, adanya ethidium bromida dalam gel, tegangan listrik yang diaplikasikan, serta bufer elektroforesis (Sambrook dan Russel, 2001).

