

SKRINING GEN GLUKOSILTRANSFERASE (GTF) DARI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL EKSOPOLISAKARIDA

Amarila Malik, Donna M. Ariestanti, Anandayu Nurfachtiyani, dan Arry Yanuar

Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

E-mail: amarila.malik@ui.edu

Abstrak

Glukosiltransferase (GTF) adalah enzim yang terlibat dalam sintesis polimer eksopolisakarida (EPS) pada mikroba. Contoh EPS yang telah banyak dimanfaatkan dalam bidang farmasi dan kesehatan adalah dekstran. Dextran digunakan sebagai matriks dalam sistem penghantaran obat bentuk konjugat. Bakteri asam laktat (BAL) sebagai suatu kelompok mikroba penghasil EPS, telah banyak dilaporkan mempunyai gen-gen sukrase glukosiltransferase (*gtf*) dan fruktosiltransferase (*ftf*). Dalam upaya pencarian gen-gen *gtf* yang baru sebagai tujuan dari penelitian ini, maka koleksi isolat BAL dari sumber lokal yang diperoleh dari penelitian terdahulu diskriminasi dengan teknik PCR menggunakan primer *degenerate* DegFor dan DegRev untuk melacak adanya gen *gtf*. Dengan sasaran *conserved region* pada ranah katalitik gen *gtf*, diperoleh amplicon berukuran kurang lebih 660 pasangan basa (pb) menggunakan DNA cetakan berupa DNA genomik isolat-isolat BAL tersebut. Dua dari 20 isolat tidak menghasilkan amplicon 660 pb yang diamati pada gel agarosa, sedangkan satu isolat menghasilkan pita-pita DNA amplicon nonspesifik berukuran berbeda dari 660 pb. Dua isolat yang tidak menghasilkan amplicon tersebut diisolasi dari tanah limbah susu dan dari limbah kecap pada penelitian terdahulu, sedangkan satu isolat BAL lainnya diisolasi dari limbah kecap.

Abstract

Screening for glucosyltransferase gene (*gtf*) from exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. Glucosyltransferase (GTF) is an enzyme involved in exopolysaccharide (EPS) polymer synthesis in microbes. One example of EPS that has been used in pharmaceutical and medical application is dextran. Dextran has been used in conjugated-drug delivery system as matrix. As a group of microbes producing EPS, lactic acid bacteria (LAB) have been well reported carrying sucrose genes glucosyltransferase (*gtf*), as well as fructosyltransferases (*ftf*). In an attempt to search for novel *gtf* genes as the aim of this study, LAB collection isolated from local sources yielded from previous study were screened performing PCR using degenerate primers DegFor and DegRev. An approximately 660 base pairs (bp) amplicons were obtained by using genomic DNAs of those LAB isolates as templates with conserved region of *gtf* genes catalytic domain as target. Two out of 20 LAB strains were yielded no amplicon as observed on agarose gel, while one strain exhibited non-specific amplicon DNA bands with sizes other than 660 bp. The two negative ones were isolated from soil obtained from dairy product waste field and from waste of soy sauce from previous study, while the latter was isolated from waste of soy sauce.

Keywords: glucosyltransferase, gtf, exopolysaccharide, lactic acid bacteria, degenerate primers

1. Pendahuluan

Glukosiltransferase (GTF, EC 2.4.1.5) adalah enzim yang tergabung dalam kelompok keluarga glikosida hidrolase 70, dan merupakan kelompok enzim sukrase yang disebut sebagai glukansukrase, disamping enzim sukrase lainnya yaitu fruktansukrase [1]. Enzim-enzim tersebut diketahui terlibat dalam sintesis eksopolisakarida (EPS) dari mikroba, sebagaimana yang dilaporkan [2-5].

Eksopolisakarida (EPS) adalah suatu polisakarida yang diproduksi dan diekskresikan dari mikroba. EPS telah lama dilaporkan memiliki potensi untuk aplikasi di bidang industri farmasi, kesehatan dan pangan. Beberapa EPS yang telah banyak digunakan dalam bidang kesehatan diantaranya β -glukan, β -mannan, xanthan, curdlan, gellan dan dekstran. Xanthan dan dekstran adalah dua contoh EPS yang telah menjadi produk komersial sejak bertahun-tahun yang lalu.

Dalam makanan, EPS mempunyai manfaat sebagai stabilisator, pengental, emulgator, pembentuk gel, dan memiliki kemampuan mengikat air yang baik sehingga dapat mempertahankan tekstur agar tetap lembut selama penyimpanan [6-10].

Dekstran merupakan salah satu contoh EPS yang banyak dimanfaatkan. Dekstran dilaporkan telah banyak diteliti di bidang farmasi sebagai salah satu matriks pada sistem penghantaran obat baru berbentuk konjugat [11]. Dekstran juga dilaporkan memiliki efek farmakologi sebagai anti *platelet*, antifibrin, dan *plasma volume expansion* pada kondisi hipovolemia, serta digunakan pada transplantasi *microvascular* dan *microsurgery* sebagai pelindung pembuluh darah dan meningkatkan sirkulasi mikro di dalam pembuluh darah [12]. Golongan β -D-glukan telah lama dilaporkan pula memiliki kemampuan memodulasi sistem imun dan tumorigenesis [13].

Glukansukrase bekerja mengkatalisis dua reaksi berbeda tergantung dari substrat akseptor, yaitu (i) hidrolisis, jika air sebagai substrat akseptor, dan (ii) transfer gugus glukosil, yang dapat dipilah menjadi: [a] polimerisasi (jika rantai glukukan sebagai substrat akseptor), dan [b] sintesis oligosakarida (jika oligosakarida sebagai substrat akseptor, seperti maltosa, isomaltosa).

Aktifitas dari GTF adalah mensintesis polimer glukukan yang berbobot molekul besar dari substrat sukrosa, yaitu suatu homopolisakarida. Homopolisakarida, selain heteropolisakarida, adalah suatu EPS yang tersusun atas suatu unit berulang yang mengandung satu tipe monosakarida. Sedangkan heteropolisakarida adalah EPS yang tersusun oleh suatu unit berulang yang mengandung dua atau lebih monosakarida yang berbeda [14]. Homopolisakarida glukukan dapat dibedakan berdasarkan strukturnya menjadi dua kelompok yaitu α -D-glukan dan β -D-glukan. Homopolisakarida golongan glukukan dan fruktan dilaporkan banyak terdapat pada kelompok bakteri asam laktat (BAL) [15,16], yaitu bakteri-bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat sebagai hasil fermentasi dalam metabolisemenya, namun beberapa galur diantara kelompok ini juga mempunyai kemampuan menghasilkan EPS.

Polimer glukukan yang dihasilkan dari BAL dibagi menjadi lima kelompok [3,5,16], yaitu reuteran, yang terdiri dari sejumlah besar ikatan α -(1 \rightarrow 4)-glikosida (*Lactobacillus reuteri* 121); dekstran, yang sebagian besar terdiri dari ikatan α -(1 \rightarrow 6)-glukopiranosil; mutan, yaitu suatu poliglukosa yang sebagian besar terdiri dari ikatan α -(1 \rightarrow 3); alternan, yang terdiri dari ikatan α -(1 \rightarrow 6)- dan α -(1 \rightarrow 3)-D-glukopiranosil; polimer glukukan, yang terdiri ikatan α -(1 \rightarrow 2), sebagian besar memiliki titik cabang α -(1 \rightarrow 2,6).

Semua GTF dari BAL memiliki pola organisasi struktural gen yang umum dan tersusun atas empat ranah yang berbeda, yaitu: (i) ujung terminal-N dengan suatu sinyal peptida, diikuti dengan (ii) daerah dengan sekuens yang sangat variabel, (iii) ranah pengikatan sukrosa dan katalitik yang sangat *conserved*, dan (iv) sebuah ranah terminal-C [2].

Gen-gen penyandi enzim sukrase yang baru yang belum pernah dilaporkan sebelumnya kemungkinan dapat diperoleh dari galur-galur BAL penghasil EPS yang masih belum banyak diteliti dari sumber lokal. Disamping itu, dapat pula diperoleh kemungkinan mendapatkan EPS dengan struktur unik. Struktur EPS yang unik berpotensi untuk dikembangkan dalam pemanfaatan di bidang farmasi dan pangan.

Berdasarkan hal-hal tersebut, maka isolat-isolat BAL penghasil EPS indigenos Indonesia berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai sumber gen-gen sukrase yang baru, baik itu glukansukrase maupun fruktansukrase. Sintesis beragam EPS homopolisakarida dilaporkan terdapat luas di kelompok BAL, sebagaimana dilaporkan oleh Tiekling *et al.* [17], yaitu sintesis kedua macam EPS glukukan dan fruktan pada *Weissella confusa*; dan oleh van Hijum *et al.* [16], yaitu teridentifikasinya gen *gtf* di dalam sekuens genom *Oenococcus oeni*. Keragaman gen *gtf* telah lebih dulu dilaporkan pada genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc* dan *Streptococcus*. Metode skrining yang efisien untuk melacak adanya enzim-enzim sukrase pada BAL penghasil EPS secara molekular dengan teknik *polymerase chain reactions* (PCR) menggunakan primer-primer *degenerate* yang dirancang berdasarkan sekuens homolog dari berbagai gen-gen penyandi GTF (*gtf*) dari berbagai BAL, yaitu DegFor dan DegRev telah dilaporkan [18]. Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian ini gen-gen *gtf* dilacak menggunakan primer-primer *degenerate* tersebut pada isolat-isolat BAL penghasil EPS indigenos Indonesia yang telah dikoleksi dan diidentifikasi pada penelitian terdahulu [19,20]. Isolat-isolat BAL yang masih jarang dilaporkan mempunyai gen *gtf* yang diperoleh dari penelitian ini akan bermanfaat menambah keragaman gen-gen *gtf* dan berpotensi dikembangkan untuk kloning gen dan isolasi enzim-enzim glukosiltransferase yang unik yang dapat menghasilkan EPS dengan struktur dan fungsi baru.

2. Metode Penelitian

Sejumlah isolat BAL yang digunakan dalam penelitian ini adalah penghasil EPS dalam jumlah besar berdasarkan skrining kemampuan menghasilkan produk EPS pada penelitian terdahulu [19,20]. Isolat-isolat BAL tersebut dipilih sebanyak 20 isolat yang mewakili setiap asal sumber, sebagaimana ditampilkan pada Tabel 1. Medium pertumbuhan adalah agar MRS (deMan Rogosa Sharpe) [21] untuk *working culture*,

dan ditumbuhkan pada medium cair MRS untuk ekstraksi DNA genomik, kemudian inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C selama 18-24 jam [19,20]. Untuk kontrol negatif digunakan galur *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 yang tidak menghasilkan EPS glukon yang ditumbuhkan pada medium dan kondisi yang sama, yang kemudian diisolasi DNA genomiknya. Sedangkan untuk kontrol positif digunakan DNA genomik yang diisolasi dari *Lactobacillus reuteri* BIO yang diidentifikasi sebagai penghasil EPS glukon (S. Kralj, data belum dipublikasikan).

Ekstraksi DNA genomik dilakukan dengan metode modifikasi Murray dan Thompson [22] menggunakan *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB). Isolat BAL yang telah dikultur dalam medium cair MRS kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL steril dan disentrifuse dengan mikrosentrifus pada suhu 20°C selama 3 menit, dengan kecepatan 10.000 x g. Selanjutnya dilakukan sebagai modifikasi dari metode ekstraksi yang dideskripsikan oleh Kralj, et al. 2003. Supernatan dibuang, kemudian pelet sel yang diperoleh disuspensikan kembali dalam 557 µL dapar STET (sukrosa, basa Tris, EDTA, Triton). Sebanyak 10 µL larutan *lysozim* 10 mg/mL, 30 µL SDS 10 %, dan 4 µL proteinase-K ditambahkan ke dalam suspensi tersebut. Suspensi dihomogenkan dengan cara membalikkan tabung mikrosentrifus selama beberapa kali dengan seksama, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Sebanyak 65 µL NaCl 4 M dan 80 µL CTAB ditambahkan ke dalam suspensi, kemudian divortex, dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30-60 menit. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan kloroform dan isoamilalkohol (24:1, v/v) dengan menambahkan sebanyak 650 µL (624 µL kloroform dan 26 µL isoamil alkohol) ke dalam suspensi campuran. Campuran tersebut divortex dan disentrifus pada suhu 20°C selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 x g. Bagian supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 mL yang baru dan steril. Ekstraksi dengan kloroform dan isoamilalkohol dilakukan sebanyak 2 kali sebagai modifikasi untuk menghindari penggunaan fenol yang toksik. Setelah itu supernatan ditambahkan dengan isopropanol dingin sebanyak 400 µL dan larutan dibalik-balikkan secara perlahan sampai terlihat benang-benang putih halus (benang DNA). Larutan tersebut kemudian disentrifus pada suhu 20°C selama 3 menit dengan kecepatan 10.000 x g. Pelet DNA yang diperoleh ditambahkan etanol 70 % dingin sebanyak 1 mL dan dibalik-balikkan beberapa kali secara perlahan. Larutan tersebut selanjutnya disentrifus pada suhu 20°C selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 x g. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringudarkan. Setelah kering, pelet DNA direhidrasi dalam 40 µL air *MilliQ* (ddH₂O) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit agar melarut sempurna, kemudian disimpan pada suhu 4°C.

DNA hasil ekstraksi diukur kemurnian dan konsentrasinya menggunakan spektrofotometer GeneQuant^R RNA/DNA Calculator (GE). Sebanyak 100 µL ekstrak DNA diencerkan dengan air *MilliQ* (ddH₂O), dipipet turun-naik hingga homogen, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet mikro sebanyak 100 µL. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Yang pertama adalah mengukur konsentrasi, sedangkan yang berikutnya adalah mengukur kemurnian [23].

PCR dilakukan pada mesin *thermal cycler* model MJ Mini (Biorad), menggunakan RTG^R PCR *beads* (Amersham), yaitu suatu campuran siap pakai mengandung *Taq* polimerase beserta buffer dan dNTP. Komposisi untuk campuran reaksi PCR dengan total volum 25 ul adalah sebagai berikut, 1uM masing-masing pasangan primer, 50ng DNA yang diekstraksi, dan setengah dari 1 (satu) campuran RTG^R PCR *beads* (Amersham) dengan konsentrasi polimerase 1.25 Unit/*bead* yang telah diresuspensi dengan ddH₂O.

Sekuens primer yang digunakan adalah sebagai berikut, DegFor 5'-GAYAAAYWSNAAYCCNRYNGTNC-3' dan DegRev 5'-ADRTCNCRTARTANAVNYKNG-3' (Y= T atau C, K= G atau T, W= A atau T, S= C atau G, R= A atau G, N=inosin), koleksi Dr. S. Kralj, GBB, RuG, Belanda.

Sekuens target dari pasangan primer Deg adalah *conserved region* dari ranah katalitik berbagai gen *gtf* [18]. Kondisi PCR yang digunakan sebagaimana yang

Tabel 1. Isolat-isolat bakteri asam laktat (BAL) yang diskriminasi terhadap gen *gtf*.

Nomor sampel DNA	Identitas isolat	Sumber isolat
1	MBF 2-1	Asinan Bogor
2	MBF 2-2	Asinan Bogor
3	MBF 2-5	Asinan Bogor
4	MBF 3-1	Es Sekoteng
5	MBF 3-2	Es Sekoteng
6	MBF 3-5	Es Sekoteng
7	MBF 5-9	Tanah limbah susu
8	MBF 5-14	Tanah limbah susu
9	MBF 6-9	Tanah limbah susu
10	MBF 6-13	Tanah limbah susu
11	MBF 7-7	Tanah limbah susu
12	MBF 7-17	Tanah limbah susu
13	MBF 8-1	Ampas kedelai
14	MBF 8-2	Ampas kedelai
15	MBF 9-2	Limbah tahu
16	MBF 10-2	Limbah tahu
17	MBF 11-1	Limbah kecap
18	MBF 11-2	Limbah kecap
19	MBF 12-2	Limbah kecap
20	MBF 12-5	Limbah kecap

diuraikan oleh Kralj, *et al.* adalah sebagai berikut. Preinkubasi dilakukan pada 95 °C selama 5 menit, diikuti dengan 95 °C selama 30 detik, 42 °C selama 45 detik dan 72 °C selama 60 detik, sebanyak 35 siklus. Selanjutnya diinkubasi pada 72 °C selama 2 menit setelah siklus terakhir, dan tahap pendinginan pada 4 °C [18]. Amplikon yang dihasilkan mempunyai ukuran kurang lebih 660 pb yang diamati pada gel agarosa 2% dengan penanda ukuran molekular 1 KB (Invitrogen).

3. Hasil dan Diskusi

Sebanyak 20 isolat BAL penghasil EPS dipilih berdasarkan perwakilan masing-masing asal sumber isolat dan kemampuan menghasilkan EPS. DNA genomik kedua puluh isolat tersebut digunakan sebagai cetakan pada teknik PCR untuk pelacakan gen-gen *gtf*. Hasil pelacakan gen *gtf* menggunakan primer Deg menunjukkan hasil sebagai berikut. Hampir semua isolat yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan amplikon berukuran lebih kurang 660 pb, yaitu 17 dari 20 isolat yang dianalisa. Dua isolat tidak menghasilkan amplikon, dan satu isolat menghasilkan amplikon-amplikon nonspesifik dengan ukuran selain 660 pb, sebagaimana ditampilkan pada Gambar 1.

Kedua isolat BAL tersebut, yang diisolasi dari tanah limbah susu (MBF7-7) dan limbah kecap (MBF11-1), kemungkinan merupakan isolat BAL yang tidak membawa gen *gtf* yang dapat dilacak oleh pasangan primer yang digunakan. Struktur *conserved region* daerah katalitik gen *gtf* pada kedua BAL tersebut kemungkinan berbeda dengan beberapa BAL referensi yang digunakan untuk merancang primer Deg. Ataupun, keduanya merupakan isolat yang tidak menghasilkan EPS glukon sebagaimana galur yang digunakan sebagai kontrol negatif *Lb. gasseri* DSM 20243. Sementara itu, satu isolat BAL yang diisolasi dari limbah kecap (MBF12-5) kemungkinan DNA genomiknya mempunyai beberapa daerah yang mirip dengan sekuen *conserved region* ranah katalitik, sehingga pasangan primer Deg melacak daerah-daerah yang nonspesifik yang teramati pada gel agarosa berupa pita-pita DNA amplikon.

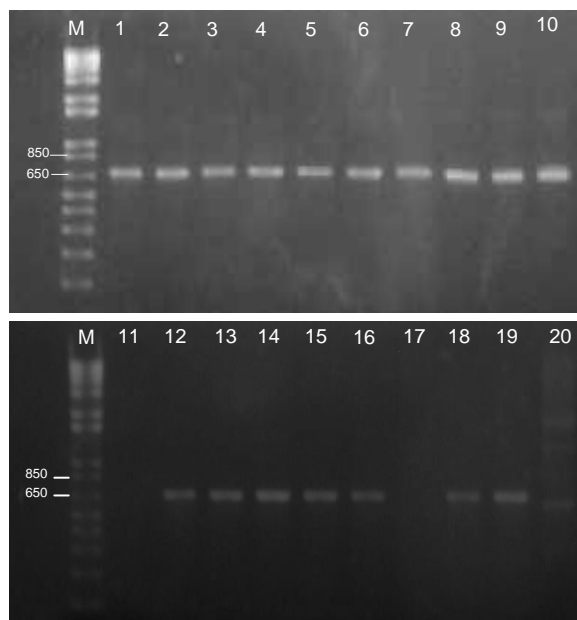
Pelacakan gen-gen *gtf* yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan primer Deg yang berupa primer *degenerate*. Primer *degenerate* adalah campuran oligonukleotida yang bervariasi dalam hal urutan basa nukleotidanya, tetapi mempunyai panjang atau jumlah nukleotida yang sama. Primer *degenerate* berguna dalam PCR jika ingin mengamplifikasi suatu fragmen DNA yang belum banyak diketahui urutan nukleotidanya sehingga primer yang spesifik tidak dapat dibuat [24]. Primer *degenerate* telah banyak digunakan untuk mengisolasi gen baru atas dasar kesamaan sekuen DNA dan atau sekuen asam amino, serta dapat pula digunakan untuk melacak gen-gen homolog yang

terdapat pada organisme sekerabat yang mempunyai kemiripan tinggi, sebagai contoh gen *gtf* [25].

Primer *degenerate* DegFor dan DegRev yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil rancangan berdasarkan kemiripan (*similarity*) sekuen antar *conserved regions* pada lokasi inti katalitik dari berbagai gen *gtf* yang terdapat pada berbagai bakteri asam laktat. Sekuens pasangan primer Deg tersebut dideduksi dari gen-gen *gtf* dari *gtfA* *Lactobacillus reuteri*, *gtfS* *Streptococcus downei*, *gtfC* *Streptococcus mutans*, *gtfI* *Streptococcus downei*, *gtfK* dan *gtfM* *Streptococcus salivarius*, dan *dsrA* *Leuconostoc mesenteroides* [18].

Kemiripan sekuen enzim glukansukrase dari kelompok BAL adalah tinggi, namun mempunyai aktifitas yang bervariasi berdasarkan spesifitas ikatan glikosida yang berbeda-beda pada produk polimer EPS yang dihasilkan. Hasil studi perbandingan sekuen gen *gtf* dari 12 galur BAL yang diteliti menggunakan primer *degenerate* Deg tersebut melaporkan bahwa persen *similarity* yang diperoleh adalah antara 29 sampai dengan 99, sedangkan persen *identity* yang diperoleh adalah antara 49 sampai dengan 99 [18].

Jarak persen *similarity* dan persen *identity* yang cukup besar diantara gen-gen *gtf* tersebut menunjukkan bahwa pasangan primer Deg yang digunakan dapat mengantisipasi keragaman gen *gtf* diantara BAL.



Keterangan: Pita yang tampak berukuran di antara 650 dan 850 pb diperkirakan sesuai dengan 660 pb yang menunjukkan adanya gen *gtf*. M=penanda ukuran molekular 100bp (Invitrogen); 1-20= sampel DNA genomik isolat-isolat BAL yang digunakan (lihat Tabel 1).

Gambar 1. Gel elektroforesis amplikon hasil PCR dengan primer DegFor dan DegRev

Dengan mengamati data sumber asal isolat, terlihat bahwa isolat-isolat BAL yang berasal dari makanan mengandung gula sukrosa akan berpeluang besar mengandung gen *gtf* maupun gen-gen sukrase lainnya, sebagaimana yang dilaporkan pula pada penelitian mengenai metode skrining BAL penghasil EPS [6]. Isolat-isolat BAL yang berpotensi untuk diteliti lebih lanjut ini akan diidentifikasi terlebih dahulu pada penelitian selanjutnya untuk memastikan spesiesnya, dan bagi spesies-spesies yang unik akan sangat berpeluang besar untuk dieksplorasi lebih lanjut kandungan gen-gen sukrasenyanya. Diantara isolat-isolat yang menghasilkan ampikon 660 pb ada dua yang telah diidentifikasi pada penelitian terdahulu menggunakan metode 16S rDNA, yaitu MBF8-1 dan MBF8-2 sebagai *Weissella* sp [19]. *Weissella* sp merupakan BAL yang masih jarang dilaporkan sebagai penghasil EPS.

Walaupun informasi tentang EPS dari suatu BAL yang sudah sering dilaporkan sudah banyak, sebagai contoh *Leuconostoc* sp, dan demikian pula dengan gen-gen sukrase yang dimilikinya, namun potensi keunikan gen tersebut dari isolat lokal masih terbuka. Hal ini sebagaimana yang telah dilaporkan tentang ditemukannya gen sukrase unik dari *L. mesenteroides* yang mempunyai aktifitas pembentukan α 1 \rightarrow 2 glukukan yang jarang ditemukan [25]. Selain itu, informasi lainnya adalah bahwa di dalam satu BAL ada kemungkinan mengandung lebih dari satu gen *gtf* sebagaimana telah banyak dilaporkan [16].

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini terlihat bahwa keragaman galur BAL yang diisolasi dari berbagai sumber lokal dari kekayaan alam Indonesia berpeluang besar untuk ditemukannya enzim GTF yang baru. Enzim baru akan berdampak terhadap produk polimer EPS yang berstruktur dan berkarakter fisik unik yang dapat dimanfaatkan pada berbagai industri, khususnya industri farmasi, kesehatan dan pangan.

4. Kesimpulan

Primer *degenerate* DegFor dan DegRev dapat melacak dengan baik kandungan gen *gtf* pada isolat BAL koleksi asal sumber lokal dengan teknik PCR. Sumber dan spesies isolat BAL akan memberikan kontribusi akan kekayaan dan keragaman gen *gtf* yang berpotensi memproduksi polimer EPS unik. Penemuan gen-gen *gtf* maupun *fff* baru akan berkontribusi pada keragaman enzim yang terlibat dalam sintesis EPS. Struktur dan karakter EPS yang beragam akan dapat memperkaya jenis-jenis polimer dan kemanfaatannya baik di industri bidang farmasi, kesehatan dan pangan.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. L. Dijkhuizen dan Dr. S. Kralj, GBB, Rijksuniversiteit Groningen, Belanda atas pemberian primer *degenerate*

DegFor dan DegRev, penggunaan DNA genomik *Lactobacillus reuteri* BIO dan penggunaan galur *Lactobacillus gasseri* DSM 20243, serta diskusi yang sangat bermanfaat.

Daftar Acuan

- [1] B. Henrissat, A. Bairoch, J. Biochem. 316 (1996) 695-696.
- [2] V. Monchois, R.M. Willemot, P. Monsan, FEMS Microbiol. Rev. 23 (1999) 131-151.
- [3] S. Kralj, G.H. van Geel-Schutten, H. Rahaoui, R.J. Leer, E.J. Faber, M.J. van der Maarel, L. Dijkhuizen, Appl. Environ. Microbiol. 68 (2002) 4283-4291.
- [4] S.A.F.T. van Hijum, E. Szalowska, M.J. van der Maarel, L. Dijkhuizen, Microbiology 150 (2004) 621-630.
- [5] S. Kralj, G.H. van Geel-Schutten, M.M.G. Dondorff, S. Kirsanovs, M.J. van der Maarel, L. Dijkhuizen, Microbiology 150 (2004) 3681-3690.
- [6] G.H. van Geel-Schutten, F. Flesch, B. ten Brink, M.R. Smith, L. Dijkhuizen, Appl. Microbiol. Biotechnol. 50 (1998) 697-703.
- [7] P. Renault, Biochim. 84 (2002) 1073-1087.
- [8] F. Vaningelgem, M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings, L. De Vuyst, Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 900-912.
- [9] A. Savadogo, C.A.T. Ouattara, P.W. Savadogo, N. Barro, A.S. Ouattara, A.S. Traore, African J. Biotechnol. 3 (2004) 189-194.
- [10] Kusmiati, F. Rachmawati, S. Siregar, S. Nuswantara, A. Malik, J. Makara (Seri Sains) 10 (2006) 24-29.
- [11] F.M. Veronese, P. Caliceti, in: Meibohm (Eds.), Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs: Principles and Case Studies in Drug Development, Wiley-CH Weinheim, 2006, p. 272-273.
- [12] Anon., Dextran, <http://www.microsurgeon.org/dextran.html>, 2001.
- [13] I.W. Sutherland, Trends Biotechnol. 16 (1998) 41-46.
- [14] L. De Vuyst, F. De Vin, F. Vaningelgem, B. Degeest, Int. Dairy J. 11 (2001) 687-707.
- [15] P. Monsan, S. Bozonnet, C. Albenne, G. Joucla, R.M. Willemot, M. Remaud-Siméon, Int Dairy J. 11 (2001) 675-685.
- [16] S.A.F.T. van Hijum, S. Kralj, L.K. Ozimek, L. Dijkhuizen, G.H. van Geel-Schutten, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70 (2006) 157-176.
- [17] M. Tieking, M. Korakli, M.A. Ehrmann, M.G. Ganzle, R.F. Vogel, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 945-952.

- [18] S. Kralj, G.H. van Geel-Schutten, M.J.E.C van der Maarel, L. Dijkhuizen, *Biocatal. Biotransform.* 21 (2003) 181-187.
- [19] A. Malik, Felicia, M. Radji, A. Oetari, *Sains Indonesia* 12 (2007) 1-6.
- [20] Felicia, Skripsi Sarjana, Departemen Farmasi FMIPA, Universitas Indonesia, Depok, 2006.
- [21] J.C. de Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe, *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1960) 130-135.
- [22] M.G. Murray, W. F. Thompson, *Nucl. Ac. Res.* 8 (1980) 4321-4326.
- [23] S.R. Gallagher, P.R. Desjardins, *Curr Protocols Molec Biol*, John Wiley & Sons Inc. (2006) A.3D.1-A.3D.21
- [24] M. A. Innis, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc. San Diego 1990, p. 3-10; 13-17; 219-226.
- [25] S. Bozonnet, D. Dols-Laffargue, E. Fabre, S. Pizzut, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, R-M Willemot, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5753-5761.