

AMPLIFIKASI FRAGMENT GEN 18S rRNA PADA DNA METAGENOMIK MADU DENGAN TEKNIK PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Satriya Putra Prakoso^a, I Nengah Wirajana^a, dan I Wayan Suarsa^a

^a) Program Studi Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran Kuta Selatan, Badung, Bali

*Email: nengah_wirajana@unud.ac.id

ABSTRACT

The aim of this research was to amplify 18S rRNA gene fragment from honey's metagenomic DNA using *Polymerase Chain Reaction* (PCR). The honey sample was collected from Seraya Tengah village, Karangasem regency. The best result of primer design from *in silico* test was continued to *in vitro* test using PCR method. The optimum conditions for amplification was obtained as follows: pre-denaturation at 95°C for 3 minutes and continued with 30 of amplification cycle (denaturation at 95°C for 1 minutes, annealing at 55°C for 1 minutes and elongation at 72°C for 1 minutes) and the last step continued with extension process at 72°C for 2 minutes. The size of DNA fragment band of amplified product was about 100 bp which obtained from the honey's metagenomic DNA.

Keyword: *Honey's metagenomic DNA, PCR, 18S rRNA gene, primer design*

PENDAHULUAN

Madu memiliki warna, aroma dan rasa yang berbeda-beda, tergantung pada jenis tanaman yang banyak tumbuh di sekitar peternakan lebah madu. Sebagai contoh madu mangga (rasa yang agak asam), madu bunga timun (rasanya sangat manis), madu kapuk/randu (rasanya manis, lebih legit dan agak gurih), madu lengkeng (rasa manis, lebih legit dan aromanya lebih tajam). Selain itu dikenal pula madu buah rambutan, madu kaliandra, dan madu karet [1], [2]. Madu yang dihasilkan oleh masing-masing daerah memiliki kualitas, keunikan, serta ciri khas yang berbeda-beda. Berdasarkan hal tersebut, karakteristik spesifik yang dimiliki madu dari masing-masing daerah sangat penting untuk digali. Salah satu caranya adalah dengan mengembangkan teknik sidik jari yang secara khas sehingga dapat mencirikan profil dari suatu madu.

Metode yang berkembang saat ini cenderung hanya dapat dipergunakan untuk menganalisis komposisi kandungan kimia pada madu sebagai acuan untuk membedakan antara madu asli dengan madu palsu. Kandungan yang dimaksud adalah kadar gula pereduksi, kadar HMF (hidroksimetilfurfural), nilai pH, sukrosa, dan kadar air [3]. Salah satu metode yang dapat dikembangkan dalam bidang biokimia adalah kandungan biomolekul DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) dalam madu, yang merupakan molekul utama kehidupan pembawa materi informasi genetik. Pada penelitian ini, isolasi DNA total dari madu dicoba dilakukan secara langsung dengan menggunakan metode metagenomik. Metagenomik merupakan metode baru dalam analisis keseluruhan genom dengan cara mengisolasi DNA total secara langsung

dari sampel atau lingkungan tertentu [4]. Isolasi DNA metagenomik dari madu pernah dilakukan dan diduga berasal dari sel eukariotik [5].

Gen 18S rRNA merupakan komponen kecil dari subunit ribosom sel eukariotik yang merupakan salah satu komponen dasar semua sel eukariotik. Pemilihan gen 18S rRNA dalam amplifikasi dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) disebabkan perannya sebagai marka (*marker*) yang penting dalam penentuan filogeni suatu spesies acak (*random target*) dalam suatu biodiversitas eukariotik [6]. Tujuan penelitian ini, adalah untuk mengamplifikasi fragmen gen 18S rRNA dari DNA metagenomik yang diisolasi dari madu. Hasil penelitian ini sebagai langkah awal dalam pengembangan profil sidik jari DNA metagenomik madu.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan penelitian yang digunakan adalah madu yang baru dipanen yang berasal dari salah satu tempat penghasil madu di Bali, yaitu di Desa Seraya Tengah, Kabupaten Karangasem. Bahan kimia yang digunakan mempunyai kualitas pro-analisis (p.a) dan biologi molekuler. Bahan kimia yang digunakan yaitu, Na₂EDTA.2H₂O, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), fenol, NaCl, HCl, kloroform, isoamil alkohol, isopropanol, Na-asetat, etanol, agarosa, *Flourescent*, basa Tris, asam asetat glasial, akuades steril, *loading bufer* 1x [*loading bufer* 6x : *bromophenol blue* 0,25% (b/v) dan sukrosa 40% (b/v)], primer *forward* dan *reverse* (*Integrated DNA Technologies, Singapore*), *KAPA Taq Extra HotStart with dye* 2x (buffer PCR, dNTP

mix, enzim *Taq* DNA polimerase), *PowerSoil DNA Isolation Kit* (*MO BIO Laboratories, Inc*).

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet volum, gelas beaker, gelas ukur, Erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, batang pengaduk, plastik polietilen, botol kaca, kertas indikator pH (Merck), spatula, sarung tangan, mikro pipet, tip mikro putih (10 μ L), kuning (200 μ L), dan biru (1000 μ L), tabung mikro 1,5 mL (Eppendorf), tabung mikro untuk PCR, *magnetic stirrer*, neraca analitik, freezer, alat elektroforesis horizontal (*Mupid-2Plus Advance*), autoklaf (*Sanyo Labo Autoclave*), vorteks (*Labnet ATT-101*), *Centrifuge Hettich EBA III*, *Microcentrifuge (TOMY MX-301 High Speed Refrigerated Micro Centrifuge)*, *GelDoc Enduro GDS*, *Thermocycle* (Sensoquest Gradien Thermal Cyler With Thermoblock 96).

Cara Kerja

Pemilihan Primer PCR

Program *Clone Manager Suite 6* digunakan dalam memilih primer *forward* dan *reverse* dan simulasi amplifikasi PCR. Pemilihan pasangan primer dilakukan dengan tahapan yang sudah ditentukan dalam program *Clone Manager Suite 6*. Beberapa urutan basa nukleotida primer *forward* dan *reverse* dengan mengacu pada urutan basa nukleotida DNA *template* dimasukkan dan diproses dalam program. Beberapa hasil pasangan primer terbaik digunakan untuk simulasi secara *in silico* amplifikasi PCR.

Pengambilan Sampel Madu

Sampel madu asli diambil langsung dari 2 peternak lebah Desa Seraya Tengah, Kecamatan Karangasem, Kabupaten Karangasem. Sarang lebah yang telah berisi madu dipotong menjadi beberapa bagian. Pengambilan madu dilakukan dengan cara pemerasan secara steril.

Isolasi DNA Metagenomik

Isolasi DNA metagenomik dilakukan dengan tiga metode. Pertama, isolasi dengan lisis sel secara langsung dari metode isolasi DNA metagenomik berdasarkan metode Kuske *et al.* (1997) [7] dan telah dikembangkan oleh Hartawan *et al.* (2014) untuk madu [5]. Kedua, isolasi DNA metagenomik menggunakan *PowerSoil DNA Isolation Kit* dari *MO BIO Laboratories, Inc* dilakukan sesuai dengan manual yang tersedia dalam kit. Ketiga, isolasi DNA metagenomik yang diawali dengan preparasi sampel berdasarkan protokol yang diusulkan oleh Waiblinger *et al.* (2012) [8] dan dipadukan dengan menggunakan

PowerSoil DNA Isolation Kit. Sebanyak 1,2 gram sampel madu didistribusikan ke empat tabung Eppendorf 1,5 mL (0,3 gram madu per tabung), diikuti dengan penambahan 960 μ L air steril untuk setiap tabung lalu diinkubasi pada suhu 40°C selama 10 menit. Setelah sentrifugasi selama 10 menit pada 11.000 x g, supernatan dibuang, pellet diresuspensi dengan 120 μ L akuadest steril dan digabungkan dalam satu tabung Eppendorf 1,5 mL. Suspensi diencerkan dengan dengan akuadest steril sampai volume sekitar 1080 μ L dan disentrifugasi selama 10 menit pada 11.000 x g. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dengan 50 μ L akuadest steril. Pelet resuspensi yang diperoleh dilanjutkan ke tahap isolasi dengan menggunakan *PowerSoil DNA Isolation Kit*.

Amplifikasi DNA Metagenomik Madu

Hasil isolasi DNA metagenomik madu diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan alat *thermocycle*. Hasil pemilihan primer digunakan pada proses amplifikasi dalam 10 μ L campuran reaksi dengan komposisi: 3 μ L ddH₂O (aquadest steril), masing- masing 0.5 μ L primer *forward* dan *reverse*, 1 μ L DNA metagenomik madu sebagai *template*, dan 5 μ L *KAPA Taq Extra HotStart with dye 2x master mix*. Kondisi amplifikasi PCR yang dilakukan adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit; siklus PCR 30 kali yang terdiri dari denaturasi (95°C, 1 menit), *annealing* (55°C, 1 menit), dan ekstensi (72°C, 2 menit); serta ekstensi akhir (72°C, 5 menit).

Analisis dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa 1,5% dibuat dengan melarutkan 0,52 g agarosa dalam 35 mL bufer TAE 1x (Tris-asetat 40 mM dan Na₂EDTA 1 mM pH 8) dengan pemanasan. Setelah agarosa terlarut dan didinginkan sampai kira-kira suhunya 45°C, selanjutnya gel agarosa ditambahkan 4 μ L *Flourescent* dituangkan pada cetakan dan dibiarkan memadat. Sampel DNA yang akan dielektroforesis dicampur dengan *loading bufer* 1x [*loading bufer* 6x: *bromophenol blue* 0,25% (b/v) dan sukrosa 40% (b/v)], dan dimasukkan kedalam sumur-sumur alat elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dalam bufer TAE pada tegangan 50 Volt. Elektroforesis dihentikan ketika *bromophenol blue* telah bermigrasi kira-kira 2/3 dari panjang gel. Pita DNA dapat diamati dengan sinar UV menggunakan *GelDoc Enduro GDS*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Primer PCR

Pada penelitian ini, program (*software*) *Clone Manager Suite 6* (*University of Groningen*) digunakan dalam pemilihan primer *forward* dan *reverse*, serta simulasi amplifikasi PCR. Penelitian ini menggunakan sekuen parsial gen 18S rRNA

yang diperoleh pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov (*GenBank Accession number*: AY012393.1; AB126807.1; AJ307465.1; AY703484.1; U89834.1; AY169434.1 pada Lampiran 1) sebagai *template* untuk mendesain beberapa pasang primer. Sekuen parsial gen 18S rRNA tersebut dimasukkan ke dalam program *Clone Manager Suite 6*, selanjutnya ditentukan panjang primer yang umumnya dapat dimulai dari panjang primer 18 hingga 24 basa nukleotida. Penggunaan rentang panjang primer tersebut karena primer dengan panjang kurang dari 18 basa nukleotida memiliki kemungkinan *mispriming* (penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan) yang tinggi. Hal ini akan mengurangi spesifisitas primer, sehingga produk yang dihasilkan tidak sesuai dengan yang diinginkan, jika primer yang digunakan terlalu panjang, maka spesifisitas primer tidak dapat ditingkatkan secara bermakna, hanya mengakibatkan biaya yang lebih mahal [9], sehingga primer yang digunakan untuk proses PCR dirancang dengan panjang 20-24 pb dan urutan basa

nukleotida ditunjukkan pada Tabel 1. Rentang panjang primer diharapkan cukup untuk dapat mengikat *template* pada daerah target amplifikasi secara spesifik.

Pemilihan primer dilakukan untuk memperoleh primer yang dapat digunakan pada amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Keberhasilan amplifikasi DNA tergantung dari ketepatan primer yang digunakan [10]. Sepasang primer yang digunakan untuk amplifikasi dirancang berdasarkan penyelarasan beberapa sekuen gen 18S rRNA yang diperoleh dari GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), dalam hal ini sekuen ujung 5' dari gen 18S rRNA digunakan sebagai acuan untuk menyusun urutan basa nukleotida primer *forward*, sedangkan sekuen 3' dari gen tersebut digunakan untuk menyusun primer *reverse*. Pemilihan gen 18S rRNA sebagai *template* atau DNA cetakan dalam tahap PCR disebabkan perannya sebagai *marker* sel eukariotik dalam penentuan filogeni suatu spesies acak (*random target*) dalam suatu biodiversitas [6].

Tabel 1. Hasil Pemilihan Primer *Forward* dan *Reverse* dengan Program *Clone Manager Suite 6*

| No | Panjang Primer | Nama Primer | Urutan Basa Nukleotida |
|----|----------------|-------------|---------------------------------|
| 1 | 24 | Euk-18SRG-F | 5'-CTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA-3' |
| 2 | 23 | Euk-18SRG-R | 5'-TTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCA-3' |
| 3 | 22 | Euk-20SRG-F | 5'-CGGTGCTCCGATGATTCATGAT-3' |
| 4 | 22 | Euk-20SRG-R | 5'-GCTGCCTTCCTTGGATGTGGTA-3' |
| 5 | 20 | Euk-22SRG-F | 5'-TGCCGGCGACGCATCATTCA-3' |
| 6 | 20 | Euk-22SRG-R | 5'-GCCTTCCTTGGATGTGGTAG-3' |

Kriteria primer PCR yang digunakan yaitu primer dengan persentase GC 40-60%, titik meleleh (T_m) 55-72°C, dimer yang terbentuk pada ujung 3' kurang dari tiga pasang, dimer lain yang terbentuk kurang dari tujuh basa, stabilitas ujung 5' dengan 3' (5' vs 3') lebih dari atau sama dengan 2,0 kkal, *annealing* 55°C, jumlah basa yang berurutan (*run of base*) kurang dari empat basa, dan basa nukleotida yang terulang (*repeats*) tidak lebih dari

tiga nukleotida. Semua kriteria primer yang standar tersebut (berdasarkan literatur utama PCR yang telah disarikan oleh tim pembuat program *Clone Manager Suite 6* dari *University of Groningen*) sudah termuat dalam program, sehingga dapat secara otomatis memberikan hasil analisis dari beberapa primer yang didesain. Berikut hasil analisis desain primer dengan program *Clone Manager Suite 6* yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Analisis Primer *Forward* dan *Reverse* dengan Program *Clone Manager Suite 6*

| Nama Primer | Panjang Primer | %GC | T_m (°C) | 3'-dimers | Stabilitas (kkal) |
|-------------|----------------|-----|------------|-----------|-------------------|
| Euk-18SRG-F | 24 | 45 | 64 | 2 | 2.0 |
| Euk-18SRG-R | 23 | 47 | 66 | 2 | 2.2 |
| Euk-20SRG-F | 22 | 50 | 64 | 5 | 2.4 |
| Euk-20SRG-R | 22 | 54 | 66 | 2 | 1.7 |
| Euk-22SRG-F | 20 | 60 | 69 | 5 | 3.5 |
| Euk-22SRG-R | 20 | 55 | 62 | 2 | 1.2 |

Beberapa kandidat primer yang telah dianalisis dengan menggunakan *Clone Manager Suite 6* dipilih sepasang primer yang memenuhi kriteria terbaik sebagai calon pasangan primer untuk digunakan pada amplifikasi PCR. Hasil

analisis pada Tabel 2 menunjukkan bahwa primer *forward* Euk-18SRG-F dan primer *reverse* Euk-18SRG-R merupakan pasangan primer terbaik. Pasangan primer ini tidak berkaitan dengan internal primer ataupun primer pasangannya (*dimers*).

Primer yang didesain juga tidak menempel pada banyak molekul, dan dapat menempel dengan baik pada daerah yang ditargetkan. Sekuen primer sebaiknya tidak memiliki daerah yang dapat berikatan dengan internal primer tersebut maupun dengan primer pasangannya. Menurut Diss (2003) primer sebaiknya menggunakan pasangan basa komplemen dan tidak memiliki banyak *binding sites* dalam genom target [10].

Secara berturut-turut primer *forward* Euk-18SRG-F dan primer *reverse* Euk-18SRG-R memiliki persen (%) GC 45 dan 47. Persentase GC dengan rentang 40-60% bertujuan agar penempelan primer dengan DNA cetakan lebih kuat. Primer dengan persentase GC rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju dengan demikian akan menurunkan efisiensi proses PCR. Burpo (2001) menyatakan keseimbangan persentase GC memungkinkan ikatan yang terbentuk lebih spesifik dan stabil dikarenakan pasangan basa G-C melibatkan tiga ikatan hidrogen, sedangkan untuk pasangan basa A-T terlibat dalam dua ikatan hidrogen [11].

Dimers menunjukkan adanya hibridisasi antara basa primer yang identik. Apabila terdapat *dimers* pada primer maka DNA *polimerase* dapat mengikat bagian yang identik dan memperpanjang kedua arah. Dimer pada ujung 3' primer sebaiknya tidak lebih dari 3 basa karena dapat menurunkan spesifisitas primer [9]. Primer sebaiknya tidak mempunyai 3 atau lebih basa G atau C pada 3'dimer, karena dapat menstabilkan *annealing* primer non spesifik [8]. Jumlah dimer pada ujung 3' pasangan primer *forward* Euk-18SRG-F dan primer *reverse* Euk-18SRG-R masing-masing memiliki 2 dimer, dimer tersebut tidak melebihi batas dari parameter dimer suatu primer.

Stabilitas suatu primer mempengaruhi penempelan primer pada *template*. Rentang stabilitas suatu primer adalah 2,0 – 2,4 kkal. Jika terlalu stabil maka primer akan menempel kuat pada *template* dan jika tidak stabil primer tidak dapat menempel dengan baik pada *template*. Pada primer yang telah didesain memiliki stabilitas 2 kkal pada primer *forward* dan 2,2 kkal pada primer *reverse*, stabilitas tersebut masih berada pada rentang stabilitas primer yang baik.

Spesifitas dan stabilitas dipengaruhi oleh T_m primer. T_m (titik meleleh) merupakan temperatur saat setengah untai DNA ganda terpisah. T_m primer seharusnya sama atau paling tidak perbedaan antara primer *forward* dan *reverse* tidak terlalu jauh. Hasil desain primer dengan menggunakan program *Clone Manager Suite 6* menghasilkan T_m masing-masing untuk primer Euk-18SRG-F dan Euk-18SRG-R adalah 64°C dan 66 °C, berbeda hanya 2°C. Perbedaan T_m yang kecil perlu diantisipasi ketika proses sintesis

primer. T_m primer hasil desain biasanya akan berbeda dengan hasil sintesis dan dengan selisih suhu yang sedikit akan memungkinkan perbedaan yang sedikit pula pada hasil sintesis. Suhu ini digunakan sebagai acuan untuk penentuan atau optimasi suhu *annealing*, tahap penting dalam proses amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi akan menghasilkan hibridisasi antara primer-DNA *template* sehingga mengakibatkan rendahnya produk PCR, sedangkan *annealing* yang terlalu rendah akan mengarah pada amplifikasi DNA yang tidak spesifik yang disebabkan oleh tingginya kemungkinan kesalahan penempelan primer pada DNA *template* [9].

Persentase GC dan besarnya T_m primer secara tidak langsung juga dipengaruhi oleh panjang primer. Primer Euk-18SRG-F dan Euk-18SRG-R hasil desain memiliki panjang masing-masing 24 pb dan 23 pb. Menurut Johnson (2000) primer-primer yang digunakan dalam PCR sebaiknya memiliki ukuran 17 hingga 28 nukleotida untuk dapat mengamplifikasi target DNA dengan spesifisitas yang bagus. Semakin pendek ukuran primer akan menyebabkan terjadinya *mispriming* tinggi sehingga menyebabkan spesifitas dari primer tersebut berkurang dan berakibat pada efektifitas dan efisiensi proses PCR, sedangkan panjang primer lebih dari 28 pb tidak menyebabkan bertambahnya spesifisitas dan akan berpengaruh pada T_m primer [9].

PCR *in silico* merupakan proses simulasi amplifikasi yang dilakukan dengan menggunakan program komputer. Data hasil simulasi PCR *in silico* menggunakan program *Clone Manager Suite 6* ditunjukkan pada Tabel 4.3. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semua desain primer mampu menghasilkan amplicon, sehingga dapat dilanjutkan ke tahap amplifikasi secara *in vitro*. Proses deteksi secara *in vitro* dilakukan untuk menguji keberhasilan primer dalam membentuk produk yang diinginkan. Namun demikian, jika semua pasangan primer dapat menghasilkan amplicon secara *in silico*, maka dipilih satu pasang primer dengan hasil analisis *in silico* terbaik seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.3, untuk disintesis oligonukleotidanya (sintesis dilakukan oleh *1st Base, Singapore*) yang digunakan dalam penelitian ini.

Berdasarkan hasil analisis *in silico* yang ditunjukkan pada Tabel 3, pasangan primer F1 dan R1 merupakan pasangan primer terbaik untuk menghasilkan amplicon dibandingkan dengan pasangan primer yang lain. Hal ini dapat ditunjukkan dari perbedaan T_m F1 dengan R1 hanya 2°C (semakin kecil perbedaan T_m antara pasangan primer maka semakin baik), kriteria adanya 3' *dimers* A:B (antara primer *forward* dan *reverse*) yang kecil, dan stabilitas primer tinggi.

| | | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| 2. Siklus | 30x | 30x | 40x | 40x | 40x | 40x |
| a. Denaturasi | 95°C | 95°C | 95°C | 95°C | 95°C | 95°C |
| b. Annealing | 55°C | 50°C | 40°C | 45°C | 55°C | 65°C |
| c. Ekstensi | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C |
| 3. Ekstensi akhir | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C |

Amplifikasi isolat DNA metagenomik

Amplikon dari DNA metagenomik madu ditunjukkan pada Gambar 1, hanya pada no 1-2 atau kondisi PCR I yang memberikan pita tunggal yang berada di bawah pita DNA *marker* berukuran 250 pb, yang diperkirakan pita tunggal ini memiliki ukuran sekitar 113 pb sesuai dengan prediksi hasil secara *in silico*. Perbedaan ukuran pita antara no 1 dan 2 menunjukkan adanya variasi genetik, yang menunjukkan dapat digunakan nantinya sebagai

data awal untuk sidik jari DNA madu berdasarkan ukuran amplikon yang berbeda. Kondisi pita tunggal yang diperoleh ini mengindikasikan bahwa isolat DNA yang teramplifikasi tidak mengalami degradasi. Hasil ini menunjukkan bahwa proses amplifikasi dengan teknik PCR telah berhasil dilakukan. Pita fragmen yang tipis diasosiasikan dengan kondisi kualitas DNA yang rendah atau *template* yang sedikit.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi DNA Metagenomik Madu Isolat Kit. (1,3,5,7,9,11) = Isolat DNA dari Sampel A; (2,4,6,8,10,12) = Isolat DNA dari Sampel B. (1-2) = Amplifikasi Kondisi I; (3-4) = Amplifikasi Kondisi II; (5-6) = Amplifikasi Kondisi III; (7-8) = Amplifikasi Kondisi IV; (9-10) = Amplifikasi Kondisi V; (11-12) = Amplifikasi Kondisi VI; (M) = Marker DNA 1 Kb.

Amplikon dari isolat metode *PowerSoil DNA Isolation Kit* dengan preparasi sampel ditunjukkan pada Gambar 5. Pada no 1-12 tidak tampak pita-pita dari amplikon DNA metagenomik, sedangkan pada no *marker* tampak pita-pita DNA. Tidak munculnya pita-pita DNA pasca proses PCR dengan berbagai variasi kondisi suhu untuk metode isolasi lisis secara langsung dapat disebabkan oleh rendahnya kualitas DNA *template*. Namun alasan tidak munculnya pita-pita DNA amplikon dengan berbagai variasi kondisi suhu untuk DNA metagenomik hasil dari metode *PowerSoil DNA Isolation Kit* dengan preparasi sampel belum dapat diketahui dengan pasti. Adanya preparasi sampel madu sebelum isolasi DNA diduga dapat menyebabkan sel-sel dan DNA bebas yang mungkin ada dalam madu terbuang saat perlakuan preparasi.

Kualitas DNA *template* sangat penting karena dapat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA polimerase. DNA *template* yang terkontaminasi dengan sisa-sisa zat saat proses isolasi (seperti buffer lisis, etanol, sisa debris sel) akan sulit teramplifikasi.

SIMPULAN

Primer terbaik hasil pengujian *in silico* digunakan pada proses amplifikasi, yakni primer *forward* F1 (Euk-18SRG-F) dengan sekuen 5'CTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3' dan primer *reverse* R1 (Euk-18SRG-R) dengan sekuen 5'TTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCA-3'. Ukuran amplikon diperoleh sekitar 100 pb dengan kondisi optimum amplifikasi sebagai berikut: denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus amplifikasi (denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada 55°C selama 1 menit dan *elongasi* pada 72°C selama 2 menit), dan

diakhiri dengan *extension* pada 72°C selama 5 menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala dan seluruh staf UPT Laboratorium Forensik Universitas Udayana atas penyediaan tempat dan sarana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sarwono, B., 2001, *Kiat Mengatasi Permasalahan Praktis Lebah Madu*, Agromedia Pustaka, Tangerang.
- [2] Suranto, A., 2004, *Khasiat dan Manfaat Madu Herbal*, Editor: T. Yulia. Cetakan Pertama, Jakarta: Agro Media Pustaka.
- [3] Sutami, A., 2003, *Pengaruh Waktu Penyimpanan dalam Refrigerator terhadap Komposisi Kimia Madu Asli dan Madu Palsu*, IPB, Bogor.
- [4] Handelsman J., 2004, Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68: 669–85.
- [5] Hartawan, IG.N.B.A, Arsa, M., Ariati, K., dan Wirajana IN., 2015, Isolasi DNA Metagenomik dari Madu dengan dan Tanpa Pengayaan Media LB (Luria-Bertani), *J. Kimia* 9 (2): 189-195.
- [6] Meyer A., Todt C., Mikkelsen N.T., and Lieb B., 2010, Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity, *BMC Evolutionary Biology* 10 : 10-70.
- [7] Kuske, C.R., Barns, S.M., and Busch, J.D., 1997, Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (9): 3614-3621.
- [8] Waiblinger, H.-U., Ohmenhaeuser, M., Meissner, S., Schillinger, M., Pietsch, K., and Goerlich, O., 2012, In-house and interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA from pollen in honey, *Journal of Consumer Protection and Food Safety*
- [9] Handoyo, D., dan Rudiretna, A., 2010, *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Surabaya.
- [10] Diss, T., 2003, The Polymerase Chain Reaction, Dalam: Crocker, J., and Paul, G.M., editors, *Molecular Biology in Cellular Pathology*, United Kingdom, John Willey and Sons, Ltd, 193-210.
- [11] Burpo, F.J., 2001, A Critical Review Of PCR Primer Design Algorithms And

Crosshybridization Case Study, *Biochemistry (Mosc.)*, 218 : 1–12.

- [12] Sulistyanyingsih, E., 2007, Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi, *Biomedis*, 1(1) : 17-25.