



Pengaruh Mutasi D802N pada Aktivitas Polimerase DNA Pol I ITB-1

L. Ambarsari¹, F. Madayanti¹, M. R. Moeis² & Akhmaloka^{1*}

¹ Biokimia, FMIPA Institut Teknologi Bandung

² SITH, Institut Teknologi Bandung

Jl. Ganesha 10 Bandung 40132, Telp. (022)2502103,

Abstrak. Gen mutan D802N DNA Pol I ITB-1 telah dikonstruksi dan diekspresi secara heterolog di *Escherichia coli*. Ekstrak enzim kasar dari mutan ini telah dikarakterisasi dan menunjukkan adanya perbedaan sifat dibanding dengan ekstrak enzim kasar dari protein *wild-type*. pH dan suhu optimum enzim mutan berturut-turut adalah 9,0 dan 50°C; Sedangkan enzim *wild-type* 7,4 dan 65°C. Perubahan kondisi optimum ini menyebabkan turunnya aktivitas spesifik enzim mutan hingga 2,7 kali, yaitu dari 3,71 unit/mg protein untuk enzim *wild-type* menjadi 1,34 unit/mg protein untuk enzim mutan. Hal yang sama terjadi pada penentuan nilai K_m dan V_{maks} terhadap substrat (dNTP), sehingga efisiensi katalitik (k_{cat}/K_m) enzim mutan menurun ± 2 kali dibanding enzim *wild-type*. Mutasi D802N pada gen penyandi DNA Pol I ITB-1 menyebabkan afinitas enzim-substrat berkurang sehingga aktivitas enzim menurun dan enzim menjadi kurang stabil.

Kata kunci: DNA pol I ITB-1; mutan D802N; karakterisasi; aktivitas spesifik; efisiensi katalitik.

Abstract. D802N mutant gene of DNA Pol I ITB-1 was constructed and expressed in *Escherichia coli*. The crude enzyme was characterized and compared to that the wild-type. The optimum pH and temperature of the mutant was slightly differences with those the wild-type. The optimum pH and temperature of the mutant were 9.0 and 50°C, while the wild-type were 7.4 and 65°C, respectively. The differences of the above properties were followed by decreasing of specific activities of the mutant (1.34 unit/mg protein) 2.7 times lower to that the wild-type (3.71 unit/mg protein). Meanwhile the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of the mutant decreased 2 times lower compared to that the wild-type. Mutation at D802N of DNA pol I ITB-1 caused decreasing on the mutant affinity to the substrate and thus loss activity and instability of the enzyme.

Keywords: DNA pol I ITB-1; D802N mutant; characterization; specific activity; catalytic efficiency.

*Penulis korespondensi: E-mail: loka@chem.itb.ac.id

1 Pendahuluan

Secara *in vivo*, DNA polimerase mempunyai peranan yang sangat penting yaitu dalam proses replikasi dan perbaikan kesalahan DNA (*repair*). Fungsi utama aktivitas enzim tersebut adalah mengkatalisis penambahan unit mononukleotida dari deoksiribonukleosida 5'-trifosfat (dNTP) pada ujung 3'-OH bebas suatu untai primer. Dalam reaksi tersebut diperlukan satu untai DNA yang digunakan sebagai cetakan (*template*) yang mengarahkan enzim dalam menyeleksi nukleotida yang masuk ⁽¹⁾.

Beberapa DNA Polimerase telah diidentifikasi dan dikarakterisasi baik dari eubakteria maupun archaea termofilik. *Taq* Pol I (*Thermus aquaticus* Pol I) merupakan enzim polimerase yang pertama kali diisolasi dari eubakteria termofilik ⁽²⁾. Umumnya DNA polimerase yang berasal dari genus ini tidak mempunyai aktivitas eksonuklease 3' → 5' yang merupakan aktivitas *proofreading*. Hal yang sama juga terdapat pada DNA Pol I dari genus *Bacillus*, seperti *B. caldotenax* dan *B. stearothermophilus* ^{(2) (3)}.

Enzim DNA Pol I dari *B. stearothermophilus* telah dikarakterisasi dan dimurnikan. Hasil karakterisasi diketahui bahwa enzim hasil pemurnian mempunyai suhu optimum 65 – 72°C dengan nilai *k_{cat}* enzim tersebut 35 kali lebih tinggi dibanding enzim yang berasal dari KF (*Klenow Fragment*) dan 4 kali lebih tinggi dibanding *Taq* Polimerase. Enzim ini juga mempunyai aktivitas spesifik yang lebih besar dibandingkan *Taq* dan KF Polimerase, dengan menggunakan substrat M13 dan *calf thymus* ⁽⁴⁾. Hal yang sama juga terjadi pada prosesivitasnya yaitu 14 kali lebih tinggi dibanding KF Polimerase dan 2 kali lebih tinggi dibanding *Taq* Polimerase ⁽⁴⁾. DNA Polimerase yang berasal dari archaea termofilik antara lain dari *Pyrococcus furiosus*, *Pyrodictum occultum*, dan *Sulfolobus solfataricus*, dikenal sebagai DNA Pol α yang umumnya mempunyai aktivitas eksonuklease 3' → 5' namun tidak mempunyai aktivitas eksonuklease 5' → 3' ⁽³⁾.

Gen penyandi DNA Pol I yang berasal dari bakteri termofilik isolat lokal telah diklon dan dikarakterisasi. Hasil penentuan urutan nukleotida diperoleh panjang gen adalah 2631 pb yang mengkode 876 asam amino ⁽⁵⁾. Gen tersebut telah diekspresi secara heterolog di *E.coli* namun struktur - fungsinya belum diketahui ⁽⁶⁾. Studi mutagenesis pada gen penyandi DNA Pol I telah dilakukan, antara lain mutasi tunggal pada residu asam amino Asp⁸⁰² dan gen mutannya (D802N) telah dikonstruksi dan diekspresikan secara heterolog di *E.coli* ⁽⁷⁾. Tulisan ini melaporkan karakterisasi enzim mutan D802N DNA Pol I ITB-1 yang dibandingkan dengan enzim *wild-type* DNA Pol I ITB-1.

2 Metode

2.1 Peremajaan *E.coli*

E.coli GI724 yang membawa plasmid rekombinan (pITB-9A) dan (pITB-9MN) yang telah termutasi digoreskan dalam medium RMG-A (1 X M9 salts, 2% *casamino acid*, 0,5% glukosa, 1 mM $MgCl_2$, 100 $\mu g/ml$ ampicilin, dan 1,5% *bacto-agar*) langsung dari stok gliserol kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 12-16 jam (sesuai manufaktur, Invitrogen).

2.2 Isolasi Enzim *Wild-type* dan Mutan D802N DNA Pol I ITB-1

Enzim *wild-type* dan mutan D802N DNA Pol I ITB-1 diperoleh dengan menumbuhkan masing-masing koloni tunggal *E. coli* yang membawa plasmid rekombinan pITB-9A dan pITB-9MN dalam medium RMG-A selama 16 jam dengan pengocokan 150 rpm pada 30°C (sesuai manufaktur, Invitrogen). Selanjutnya kultur sel dipindahkan ke dalam media induksi (0,2% *Casamino Acids*, 0,5% Glukosa, 1 mM $MgCl_2$, Garam M9 1X, 100 $\mu g/ml$ ampicilin) hingga OD_{550} mencapai 0,1 dan inkubasi dilanjutkan hingga OD_{550} mencapai 0,5. Selanjutnya ke dalam media tersebut ditambahkan triptofan hingga konsentrasinya 100 $\mu g/ml$, dan dilakukan pengocokan selama 3 jam pada 37°C. Pelet sel diperoleh dengan cara memisahkan sel dari media, yaitu dengan cara sentrifugasi pada 6000 x g selama 10 menit, 4°C. Pelet sel dicuci dengan bufer Tris-Cl (50 mM KCl; 10 mM Tris-Cl pH: 7,4; 0,1% Triton X-100; 2,5 mM $MgCl_2$), kemudian disentrifugasi kembali pada 6000 x g selama 10 menit pada 4°C (pencucian dilakukan 2 kali) dan diperoleh pelet sel yang sudah bebas dari media. Ekstrak enzim kasar diperoleh dengan cara memecah pelet sel yang sudah bersih menggunakan ultrasonikator pada keadaan dingin 4°C. Debris sel dipisahkan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 12000 x g selama 10 menit pada 4°C dan supernatannya merupakan ekstrak enzim kasar.

2.3 Penentuan Aktivitas Enzim *Wild-type* dan Mutan D802N DNA Pol I ITB-1

Penentuan aktivitas enzim *wild-type* dan mutan D802N dilakukan dengan metode radioaktif ⁽⁸⁾ yang didasarkan pada pengendapan DNA dengan TCA (*Trichloroacetic Acid*) yang merupakan jumlah ³²P-dATP yang terkorporasi pada DNA (*calf thymus* teraktivasi), endapan yang terbentuk diukur dengan *Geiger Counter*.

Reaksi enzim dilakukan sebagai berikut: 20 μl campuran yang mengandung 1,25 μg DNA *calf thymus* teraktivasi, 10 mM bufer Tris-Cl, dan 4 μl ekstrak enzim kasar *wild-type* dan mutan D802N DNA pol I ITB-1. Campuran reaksi

diinkubasi pada 65°C selama 15 menit dan reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,5 M EDTA kemudian didinginkan pada 0°C. Selanjutnya sebanyak 5 µl campuran tersebut diteteskan pada kertas saring Whatman GF/C (dilakukan pada 2 kertas saring dan masing-masing dipipet 5 µl). Masing-masing kertas saring dikeringkan di bawah lampu *Wolfram* selama 5 menit, kertas saring pertama dicuci dengan 10 ml larutan 5 % TCA yang mengandung 20 mM natrium pirofosfat sambil digoyang (tahap pencucian ini dilakukan 2 kali), dan tahap akhir dicuci dengan etanol 75% kemudian dikeringkan kembali di bawah lampu *Wolfram* selama 10 menit. Kertas saring lainnya dibiarkan kering tanpa pencucian. Selanjutnya masing-masing kertas saring yang sudah kering dicacah dengan menggunakan *Geiger Counter*⁽⁹⁾.

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai unit aktivitas yang merupakan jumlah deoksinukleotida (pmol) yang terkorporasi per ml enzim x menit⁻¹ pada kondisi optimum.

2.4 Karakterisasi Enzim *Wild-type* dan Mutan D802N DNA Pol I ITB

Karakterisasi enzim meliputi: penentuan pH dan suhu optimum, penentuan kinetika enzim dengan menentukan nilai $K_m(dNTP)$, V_{maks} .

Penentuan pH dan suhu optimum dilakukan seperti pada percobaan 2.3 dengan melakukan variasi pH dan Suhu, sedangkan kinetika enzim dilakukan seperti percobaan di atas hanya dengan melakukan variasi konsentrasi substrat dNTP. Harga K_m dan V_{maks} ditentukan dengan persamaan LWB (*Lineweaver-Burk*).

2.5 Penentuan Kadar Protein

Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan metode Bradford⁽¹⁰⁾ dengan menggunakan BSA sebagai standar.

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Isolasi Enzim *Wild-type* dan Mutan D802N DNA Pol I ITB-1

Dalam penelitian ini enzim DNA polimerase diekspresi setelah kultur diinduksi dengan triptofan, dan selanjutnya diinkubasi selama 3 jam pada 37°C. Enzim *wild-type* dan mutan D802N diisolasi dari *E.coli* yang membawa plasmid rekombinan DNA pol I *wild-type* dan DNA pol mutan yang ditumbuhkan dalam 50 ml medium induksi yang mengandung ampisilin. Ekstrak enzim kasar diperoleh setelah sel dipecahkan dengan menggunakan ultrasonikator dengan frekuensi 30.000-40.000 kC selama 15 menit. Untuk mempertahankan agar

enzim yang diisolasi tidak terdenaturasi, pemecahan sel dilakukan dalam keadaan dingin yaitu pada 4°C dengan interval waktu 1 menit. Dari 50 ml kultur sel *E.coli* GI724 yang membawa plasmid rekombinan DNA pol I *wild-type* diperoleh berat sel 242,40 mg dengan total protein 9,95 mg. Sedangkan kultur sel DNA pol I mutan D802N diperoleh berat sel 232,90 mg dengan total protein 8,90 mg (Tabel 1). Analisis lebih lanjut dilakukan untuk menentukan aktivitas polimerase yaitu dengan mengukur jumlah cacahan (DNA yang terkorporasi) dari aktivitas enzim mutan D802N yang dibandingkan dengan enzim *wild-type*. Dalam penentuan ini digunakan DNA *calf thymus* teraktivasi sebagai (*template-primer*). Hasil analisis aktivitas spesifik (unit/mg protein) dari masing-masing enzim diperoleh 3,71 unit/mg protein untuk enzim *wild-type* dan 1,34 unit/mg untuk enzim mutan D802N. Data analisis menunjukkan terjadi penurunan aktivitas spesifik pada enzim mutan D802N yaitu sekitar 63,88 % (Tabel 1).

Tabel 1 Penentuan berat sel dan total protein enzim *wild-type* dan mutan D802N.

No	Sampel	Berat Sel (mg)	Vol. (ml)	Total Protein (mg)	Aktivitas pmol/ml/men (10^3)	Total Unit	Akt. Spe (Unit/mg)
1	Wild-type	242,4	2,5	9,95	14,18	37,00	3,71
2	Mutan D802N	232,9	2,5	8,90	4,77	11,93	1,34

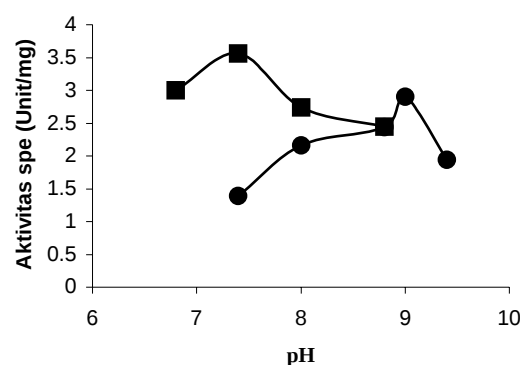
3.2 Karakterisasi Enzim *Wild-type* dan Mutan D802N DNA Pol I ITB-1

Untuk mengetahui lebih jauh pengaruh mutasi D⁸⁰² menjadi N⁸⁰², telah dilakukan karakterisasi terhadap enzim *wild-type* dan enzim mutan D802N. Karakterisasi meliputi penentuan pH dan suhu optimum, selain dari pada itu juga ditentukan kinetika enzimatikanya yang meliputi penentuan nilai K_m dan V_{maks} serta parameter kinetika lainnya seperti k_{cat} dan k_{cat}/K_m .

3.2.1 pH dan Suhu Optimum Enzim *Wild-type* dan Mutan D802N DNA Pol I ITB-1

Penentuan pH dan suhu optimum enzim dilakukan berkaitan dengan sifat-sifat protein seperti kelarutan, kekuatan interaksi antara asam-asam amino, dan secara umum akan menyebabkan protein menjadi tidak stabil. Hasil analisis diperoleh nilai pH optimum (Gambar 1) dan suhu optimum (Gambar 2) untuk

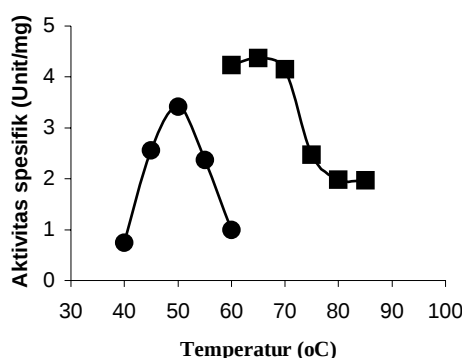
enzim *wild-type* dan enzim mutan D802N. Nilai pH dan suhu optimum enzim *wild-type* berturut-turut adalah 7,4 dan 65°C; Sedangkan enzim mutan D802N 9,0 dan 50°C. Pada keadaan optimum, enzim mempunyai aktivitas yang tinggi. Kondisi ekstrem seperti pH dan suhu tinggi (di atas kondisi optimumnya), enzim akan kehilangan aktivitas katalitiknya. Adanya penggantian gugus pada residu D menjadi N menyebabkan aktivitas enzim mutan turun bila dibandingkan dengan enzim *wild-type* (Tabel 1). Perubahan pH dapat menyebabkan ionisasi pada struktur primer dan struktur sekunder protein, juga menyebabkan perubahan interaksi antara satu asam amino dengan asam amino lainnya yang bertanggung jawab dalam pembentukan struktur tiga dimensi.



Gambar 1 Pengaruh pH terhadap aktivitas DNA Pol I ITB-1 *wild-type* dan mutan D802N. —■— (Wild-type); —●— (mutan D802N).

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa mutasi asam amino D⁸⁰² menjadi N⁸⁰² menyebabkan terjadinya pergeseran nilai optimum baik terhadap pH maupun suhu enzim. Pada penentuan pH optimum terjadi kenaikan pH enzim mutan D802N, perubahan ini mungkin disebabkan karena asam amino sebelum dimutasi D⁸⁰² mempunyai rantai samping dengan gugus R bermuatan negatif sedangkan setelah dilakukan mutasi menjadi N⁸⁰² dengan rantai samping mengandung gugus R polar dan tidak bermuatan. Perubahan ini dapat dijelaskan pada keadaan keseimbangan protonik dari asam amino D dan N. Pada pH sekitar 6-8 asam amino D bermuatan negatif 1. Hasil percobaan menunjukkan bahwa enzim *wild-type* mempunyai aktivitas polimerase pada pH optimum 7,4. Sedangkan asam amino N pada kondisi yang sama tidak bermuatan (mempunyai muatan netto/bersih nol), sehingga untuk meningkatkan agar bermuatan negatif 1 (sama seperti pada D) maka asam amino tersebut harus berada pada pH basa. Hasil percobaan diperoleh aktivitas enzim mutan D802N mempunyai pH optimum 9,0, hal ini menyarankan bahwa muatan pada residu asam amino posisi 802 penting untuk aktivitasnya.

Hal yang sama terjadi pada penentuan suhu optimum enzim. Pada keadaan ini kecepatan reaksi enzim paling cepat. Kenaikan temperatur menyebabkan enzim terdenaturasi sehingga aktivitas katalitiknya berkurang. Dari data yang dihasilkan terlihat pada suhu 60°C terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim mutan D802N sebesar 77% yaitu dari 4,23 unit/mg protein menjadi 1,0 unit/mg protein (Gambar 2).

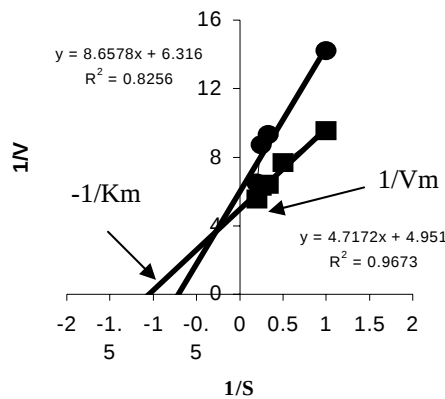


Gambar 2 Pengaruh suhu terhadap aktivitas DNA Pol I ITB-1 *wild-type* dan mutan D802N. —■— (wild-type); —●— (mutan D802N).

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan adanya penurunan suhu optimum yaitu dari 65°C untuk enzim *wild-type* menjadi 50°C untuk enzim mutan D802N. Turunnya suhu optimum pada enzim mutan D802N hanya disebabkan oleh adanya mutasi D⁸⁰² menjadi N⁸⁰² sehingga kemungkinan perubahan tersebut mengakibatkan perubahan konformasi pada struktur protein mutan yang mengakibatkan enzim mutan D802N menjadi tidak stabil dan aktivitas enzim berkurang.

3.2.2 Kinetika Enzim *Wild-type* dan Mutan D802N DNA Poli ITB-1

Kinetika enzim *wild-type* dan enzim mutan D802N ditentukan dengan mengukur aktivitas masing-masing enzim pada variasi konsentrasi substrat dNTP dengan konsentrasi substrat lainnya yaitu DNA *calf thymus* dalam keadaan jenuh dan nilai $K_m(dNTP)$ ditentukan dengan menggunakan kurva *Lineweaver-Burk* (Gambar 3). Nilai K_m menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat dan spesifik untuk setiap enzim. Semakin kecil nilai K_m maka afinitasnya semakin besar. Hasil analisis diperoleh nilai $K_m(dNTP)$ dan V_{maks} enzim *wild-type* berturut-turut adalah 0,95 μM dan $20,119 \times 10^3$ pmol/menit. Sedangkan nilai $K_m(dNTP)$ dan V_{maks} enzim mutan D802N adalah 1,37 μM dan $15,737 \times 10^3$ pmol/menit (Gambar 3).



Gambar 3 Nilai $K_m(dNTP)$ dan V_{maks} DNA Pol I ITB-1 *wild-type* dan mutan D802N. ● (*wild-type*); ■ (mutan D802N).

Selain nilai K_m dapat juga ditentukan nilai k_{cat} enzim yang menggambarkan jumlah maksimum molekul substrat yang dikonversi menjadi produk (*turn over number*). Berdasarkan hasil percobaan, mutasi D802N juga memberikan pengaruh terhadap nilai k_{cat} . Kenaikan nilai $K_m(dNTP)$ menyebabkan nilai k_{cat} berkurang 13% bila dibandingkan enzim *wild-type* (Tabel 2). Parameter kinetika lainnya yaitu k_{cat}/K_m yang menggambarkan efisiensi katalitik. Tabel 2 menunjukkan terjadi penurunan nilai k_{cat}/K_m untuk enzim mutan D802N ± 2 kali dibanding enzim *wild-type*.

Perubahan nilai K_m dan V_{maks} diduga karena terjadinya perubahan pH dan suhu optimum enzim. Berdasarkan hasil-hasil yang diperoleh, menunjukkan bahwa perubahan pH dan suhu optimum pada enzim mutan D802N menyebabkan nilai K_m meningkat 1,5 kali dibandingkan enzim *wild-type*. Peningkatan nilai menunjukkan penurunan afinitas enzim terhadap substrat dNTP demikian pula dengan pembentukan produk (dari data diperoleh nilai V_{maks} menurun). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Copeland⁽¹¹⁾ yaitu dengan melakukan mutasi pada daerah II (motif DFNSLYPSII) menunjukkan bahwa nilai K_m enzim mutan meningkat bila dibandingkan enzim *wild-type*. Kelompok peneliti lain juga telah melaporkan hasil-hasil penelitiannya dengan melakukan mutasi terhadap residu asam amino yang mengandung gugus karboksilat, yaitu mutasi (D705E, D705A); (E710D, E710A); (D882E, D882A); dan (E883D, E883A) pada polimerase yang berasal dari *Klenow Fragment* (KF). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan terhadap aktivitas polimerase baik yang dimutasi menjadi E maupun A dengan penurunan diantara 30-70%⁽⁸⁾.

Tabel 2 Parameter kinetika enzim *wild-type* dan enzim mutan D802N.

No	Sampel	k_{cat} Menit ⁻¹	Relatif k_{cat}	k_{cat}/K_m M ⁻¹ .menit ⁻¹
1	Wild-type	0,64	1,00	$6,7 \times 10^3$
2	Mutan D802N	0,56	0,87	$4,1 \times 10^3$

4 Kesimpulan

Berdasarkan hasil percobaan, enzim mutan D802N DNA Pol I ITB-1 mempunyai sifat berbeda dengan enzim *wild-type*. Enzim mutan D802N mempunyai pH dan suhu optimum pada 9,0 dan 50°C dengan aktivitas spesifik 1,34 unit/ mg protein; Sedangkan enzim *wild-type* mempunyai pH dan suhu optimum pada 7,4 dan 65°C dengan aktivitas spesifik 3,71 unit/ mg protein. Nilai $K_{m(dNTP)}$ dan V_{maks} enzim mutan D802N 1.37 mM dan 15.832×10^3 pmol/menit; Sedangkan nilai $K_{m(dNTP)}$ dan V_{maks} enzim *wild-type* 0,95 mM dan 20.197×10^3 pmol/menit. Hal ini menyarankan bahwa mutasi D⁸⁰² menjadi N⁸⁰² menyebabkan afinitas enzim terhadap substrat berkurang.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini tidak dapat dilaksanakan dengan baik tanpa bantuan dana dari Riset Unggulan Terpadu X, Kementrian Riset dan Teknologi.

Daftar Pustaka

1. Joyce, C.M., & Steitz, T.A., *Function And Structure Relationships In DNA Polymerases*, Annu. Rev. Biochem, **63**, 773 – 822 (1994).
2. Blondal, T., Thorbjarnardottir, S.H., Kieleczawa, J., Hjorleifsdottir, S., Kristjansson, J.K., Einarsson, J.M., Eggertsson, G. (2001). Cloning, Sequence Analysis and Functional Characterization of DNA Polymerase I from the Thermophilic Eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **34**:37 – 45.
3. Pisani, F.M., Felice, M.D., Manco, G., & Rossi, M., *Domain Organization and Biochemical Features of Sulfolobus solfataricus DNA Polymerase*, Extremophile, **2**, 171 – 177 (1998).
4. Kiefer, J.R., Mao, C., Hansen, C.J., Basehore, S.L., Hogrefe, H.H., Braman, J.C., & Beese, L.S., *Crystal Structure of a Thermostable Bacillus DNA Polymerase I Large Fragment at 2.1 Å Resolution*, Structure, **5**, 95-108 (1997).

5. Akhmaloka, Pramono H., Tika I.N., Suharto A., Retnoningrum D.S., Sindumarta M., Padmawinata K., dan Oei B.L., (2000b). Eksplorasi potensi bakteri termofilik isolat lokal: Studi kasus DNA polimerase termostabil, *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi III*, Cibinong 7-9 Maret 2000: 31-39.
6. Pramono H., *Kloning dan Ekspresi di Escherichia coli Gen DNA Polimerase I Bakteri Termofilik Isolat Cimanggu*. Disertasi Doktor, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung (2004).
7. Ambarsari, L., Pramono, H., Madayanti, F., Moeis, R.M., & Akhmaloka, *Konstruksi dan Overekspresi Gen Penyandi DNA Polimerase I Mutan dari Bakteri Termofilik Isolat Lokal*, J. Hayati, **11**, 115-120 (2004).
8. Gangurde, R., N., Kaushik, Singh, K., & Modak, M.J., *A Carboxylate Triad Is Essential for the Polymerase Activity of Escherichia coli DNA Polymerase I (Klenow Fragment)*, J. Biol. Chem, **275**, 19685 – 19692 (2000).
9. Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed., ke-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001).
10. Bradford, M.M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Anal. Biochem., **72**, 248-254 (1976).
11. Copeland, C., Dong, Q., Wang, T.S.F., *Rational for Mutagenesis of DNA Polymerase Active Sites: DNA Polymerase α* , Methods in Enzymology, **262**, 294-303 (1995).