

**ISOLASI DAN SEKUENSING GEN 16S rRNA DARI GENOM
BAKTERI PENDEGRADASI INULIN PADA RIZOSFER
UMBI *Dahlia* sp.**

SKRIPSI

sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh gelar sarjana sains



**Oleh:
AHADUL PUTRA
NIM. 14036001/2014**

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2018**

PERSETUJUAN SKRIPSI

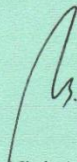
**ISOLASI DAN SEKUENSING GEN 16S rRNA DARI GENOM BAKTERI
PENDEGRADASI INULIN DARI RIZOSFER UMBI *Dahlia* sp.**

Nama : Ahadul Putra
Nim : 14036001
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juli 2018

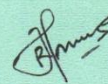
Disetujui Oleh:

Pembimbing I



Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si
NIP. 19641124 199112 2 001

Pembimbing II



Dra. Iryani, M.S
NIP. 19620113 198603 2 001

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Ahadul Putra
NIM : 14036001
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

dengan judul

**ISOLASI DAN SEKUENSING GEN 16S rRNA DARI GENOM BAKTERI
PENDEGRADASI INULIN PADA RIZOSFER UMBI *Dahlia* sp.**

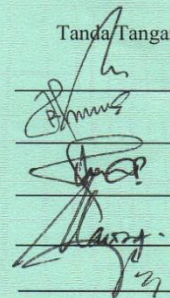
Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, Juli 2018

Tim Penguji

	Nama
Ketua	: Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si
Sekretaris	: Dra. Iryani, M.S
Anggota	: Drs. Iswendi, M.S
Anggota	: Dr. Mawardi, M.Si
Anggota	: Budhi Oktavia, M.Si, Ph.D

Tanda Tangan



SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini.

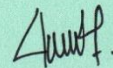
Nama : Ahadul Putra
TM/NIM : 14036001/2014
Tempat/Tanggal Lahir : Rangkiang Luluih/ 03 Maret 1996
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : MIPA
Alamat : Rangkiang Luluih, Kabupaten Solok
No.HP/Telepon : 085835293266
Judul Skripsi : Isolasi dan Sekuensing Gen 16S rRNA dari Genom
Bakteri Pendegradasi Inulin pada Rizosfer Umbi
Dahlia sp.

Dengan ini saya menyatakan bahwa.

1. Karya tulis/skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar baik di UNP maupun perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis/skripsi ini murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain kecuali arahan tim pembimbing dan penguji skripsi.
3. Pada karya tulis/skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain kecuali tertulis dengan jelas dicantumkan pada daftar pustaka.
4. Karya tulis/skripsi ini sah apabila telah ditandatangani **Asli** oleh tim pembimbing dan tim penguji

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh. Apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran di dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima **Sanksi Akademik** berupa pencabutan gelar akademik dan sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Padang, Juli 2018
yang membuat pernyataan,



Ahadul Putra
NIM : 14036001

ABSTRAK

Ahadul Putra (2018) : Isolasi dan Sekuensing Gen 16S rRNA dari Genom Bakteri Pendegradasi Inulin pada Rizosfer Umbi *Dahlia* sp.

Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara genotip menggunakan gen 16S rRNA. Langkah awal identifikasi bakteri dengan cara mengisolasi DNA kromosom bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi *Dahlia* sp. DNA kromosom bakteri digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan metode PCR. Amplikon yang dihasilkan dielektroforesis menggunakan gel agarosa. Pita gen 16S rRNA hasil elektroforesis dimurnikan menggunakan metode *Gel/PCR fragment DNA extraction kit*. Gen 16S rRNA dikloning menggunakan vektor pGEM-T *Easy* menghasilkan DNA rekombinan. DNA Rekombinan ditransformasikan ke dalam sel kompeten. Keberhasilan kloning dibuktikan dengan skrining koloni berwarna biru dan koloni berwarna putih. DNA rekombinan yang mengandung gen 16S rRNA diisolasi dan dimurnikan untuk disekuensing. Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan menggunakan metode *Dideoxy-Sanger*. Hasil sekuensing dianalisa urutan basa nukleotida menggunakan software DNASTar. Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA yang telah dianalisa terdiri dari 1501 bp (*base pair*). Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi bakteri menggunakan program BLASTn dan MEGA. Berdasarkan identifikasi, bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi *Dahlia* sp. termasuk kelompok genus *Klebsiella* dan spesies *Klebsiella pneumoniae*.

Kata kunci : *Inulin, Gen 16S rRNA, dan bakteri pendegradasi inulin.*

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya serta sholawat dan salam kepada nabi Muhammad SAW sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Sekuensing Gen 16S rRNA dari Genom Bakteri Pendegradasi Inulin pada Rizosfer Umbi *Dahlia* sp.”**. Skripsi ini diajukan untuk melengkapi dan memenuhi persyaratan mata kuliah Tugas Akhir 2 sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains pada program studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, petunjuk, arahan, masukan dan motivasi yang berharga dari beberapa pihak. Berdasarkan hal ini, dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada

1. Ibu Prof. Dr. Minda Azhar, M.Siselaku dosen pembimbing I dan penasehat akademik
2. Ibu Dra. Iryani, M.S selaku dosen pembimbing II
3. Tim riset Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Bandung
4. Bapak Drs. Iswendi, M.S., Bapak Dr. Mawardi, M.Si., dan Bapak Budhi Oktavia, Ph.D selaku dosen pembahas dan penguji skripsi
5. Orang tua penulis dan keluarga tercinta.
6. Staf laboratorium jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

7. Tim riset Biokimia jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

8. Sahabat- sahabatku dan mahasiswa jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Penulisan skripsi ini telah dilakukan sebaik-baiknya, namun untuk kesempurnaan skripsi ini, diharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Atas kritik dan saran penulis mengucapkan terima kasih.

Padang, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Identifikasi Masalah.....	3
C. Batasan Masalah	4
D. Rumusan Masalah.....	4
E. Tujuan Penelitian	4
F. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Inulin	6
B. Bakteri Pendegradasi Inulin dari Rizosfer Umbi <i>Dahlia</i> sp.....	9
C. Gen 16S rRNA.....	11
D. <i>Polymerase Chain</i> Reaction (PCR)	14
E. Sekuensing DNA dengan Metode <i>Dideoxy-sanger</i>	17
F. Bioinformatika.....	19
BAB III METODE PENELITIAN.....	23
A. Waktu dan Tempat Penelitian	23
B. Objek Penelitian.....	23
C. Alat dan Bahan Penelitian	23
1. Alat	23
2. Bahan.....	23
D. Prosedur Kerja Penelitian.....	24
1. Pembuatan Media Padat	24
2. Pembuatan Media Cair	25
3. Peremajaan Isolat	25
4. Isolasi DNA Kromosom Bakteri.....	26

5. Elektroforesis DNA Kromosom Bakteri	27
6. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Metode PCR.....	28
7. Pemurnian Produk PCR.....	29
8. Kloning Gen 16S rRNA Murni ke Vektor pGEM-T Easy.	30
9. Isolasi Plasmid DNA Rekombinan	32
10. Analisa Restriksi Hasil Isolasi Plasmid.....	34
11. Sekuensing Gen 16S rRNA dengan Metode <i>Dideoxy-Sanger</i>	34
12. Analisa Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	36
A. Hasil	36
1. Peremajaan Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin	36
2. Isolasi DNA Kromosom Bakteri Pendegradasi Inulin	37
3. Amplifikasi Gen 16S rRNA dan Pemurnian Amplikon	37
4. Kloning Gen 16S rRNA dengan Vektor pGEM-T <i>Easy</i>	38
5. Analisis Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Hasil sekuensing	39
6. Identifikasi Molekuler Bakteri Pendegradasi Inulin	41
B. Pembahasan	43
1. Peremajaan Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin	43
2. Isolasi DNA Kromosom Bakteri Pendegradasi Inulin	43
3. Amplifikasi Gen 16S rRNA dan Pemurnian Amplikon	46
4. Kloning Gen 16S rRNA dengan Vektor pGEM-T <i>Easy</i>	47
5. Analisa Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Hasil Sekuensing	52
6. Identifikasi Molekuler Bakteri Pendegradasi Inulin	53
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	55
A. Simpulan.....	55
B. Saran.....	55
KEPUSTAKAAN.....	56
LAMPIRAN	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Inulin.....	6
2. Tipe aksi exoinulinase dan endoinulinase	10
3. Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA E.coli.....	13
4. Siklus amplifikasi DNA	16
5. Tampilan Electropherogram Sekuen DNA	20
6. Contoh pohon filogenetika	22
7. Hasil Peremajaan Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin di Media Padat.....	36
8. (a) Kontrol dan (b) Hasil Peremajaan Bakteri Isolat UKG di Media Cair	36
9. Hasil Elektroforesis DNA Kromosom Bakteri Isolat UKG	37
10. (a) Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen 16S rRNA Metode PCR dan (b) Hasil Pemurnian Pita Elektroforesis Gen 16S rRNA	37
11. (a) Kontrol (b) Koloni Biru dan Putih.....	38
12. Hasil Elektroforesis Plasmid DNA Rekombinan.....	38
13. Hasil Elektroforesis Reaksi Restriksi DNA Rekombinan.	39
14. Potongan <i>Elektroforegram</i> Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Hasil Pembacaan DNASTar	39
15. Urutan Basa Nuklotida Hasil Pembacaan di Program DNASTar Menggunakan Primer SP6.....	40
16. Urutan Basa Nuklotida Hasil Pembacaan di Program DNASTar Menggunakan Primer T7.....	40
17. Sekuen Gen 16S rRNA Hasil Penjajaran di DNASTar.....	41
18. Hasil Identifikasi Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA Bakteri Pendegradasi inulin.	42
19. Pohon Filogenetika Bakteri Pendegradasi Inulin.....	42
20. Fragmen Sekuen Vektor pGEM-T <i>Easy</i>	48

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kebutuhan pangan merupakan suatu hal yang perlu disediakan oleh industri. Salah satu industri yang berkembang pesat adalah industri makanan dan minuman. Hampir semua industri makanan, khususnya minuman selalu berhubungan dengan gula atau pemanis. Tingkat kemanisan fruktosa lebih tinggi dari pada sukrosa sehingga sangat baik bagi penderita diabetes, oleh karena itu industri lebih memilih fruktosa sebagai pemanis dalam memproduksi makanan dan minuman. Hal ini mengakibatkan banyak peneliti melakukan penelitian untuk memproduksi fruktosa dalam jumlah besar (Martina, 2012).

Fruktosa dapat dihasilkan dari reaksi hidrolisis pati dan inulin. Fruktosa dapat dihidrolisis dari pati melalui beberapa proses yaitu mengubah pati menjadi glukosa, kemudian mengkonversi glukosa menjadi fruktosa. Penggunaan metode ini telah ditinggalkan karena tidak efektif dan efisien. Kekurangan hidrolisis pati karena randemen fruktosa yang dihasilkan lebih sedikit yaitu 45 %, waktu biokonversi lama (3-3,5 hari), dan memerlukan tiga enzim yaitu *α -amilase*, *glucoamilase*, dan *glukoisomerase*. Sebaliknya fruktosa yang dihasilkan dari hidrolisis inulin lebih menguntungkan yaitu randemen fruktosa yang dihasilkan 92-98%, biokonversi lebih singkat (10-12 jam), dan hanya menggunakan satu enzim. Berdasarkan hal ini, produksi fruktosa dari hidrolisis inulin lebih menjanjikan dan mendapat perhatian yang luar biasa beberapa tahun terakhir (Sirisansaneeyakul, 2007 dan Sari,

2005). Inulin, selain sebagai raw material untuk produksi fruktosa, juga mempunyai fungsi penting untuk memelihara kesehatan usus besar karena inulin adalah prebiotik yaitu menjaga kestabilan flora normal usus besar (Huang, 2016).

Inulin dapat dihidrolisis menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS) menggunakan enzim inulinase. Enzim inulinase dapat diisolasi dari tumbuhan dan mikroorganisme (Saryono, 2008), namun kebanyakan peneliti lebih memilih mengisolasi enzim dari mikroorganisme. Bakteri merupakan salah satu sumber mikroorganisme yang berpotensi penghasil inulinase (Singh, 2017). Bakteri yang memiliki enzim inulinase akan menghidrolisis inulin menjadi fruktosa dan FOS. Hidrolisis inulin menggunakan exoinulinase akan dihasilkan fruktosa dan sedikit glukosa, sedangkan hidrolisis inulin dengan enzim endoinulinase dihasilkan FOS. Campuran enzim exoinulinase dengan endoinulinase akan lebih menguntungkan untuk produksi sirup fruktosa. Salah satu sumber bakteri pendegradasi inulin adalah bakteri dari rizosfer umbi *Dahlia* sp. (Yuliana, 2014).

Bakteri pendegradasi inulin pada rizosfer umbi *Dahlia* sp. perlu diidentifikasi spesiesnya, karna identifikasi spesies bakteri merupakan langkah awal untuk mengisolasi gen pengkode inulinase pada bakteri. Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara fenotip dan genotip. Secara fenotip, bakteri diidentifikasi melalui morfologi seperti bentuk, warna koloni dan uji biokimia dari bakteri. Identifikasi ini membutuhkan waktu yang lama

dibandingkan identifikasi secara genotip. Identifikasi bakteri secara genotip ditujukan pada urutan basa nukleotida gen 16S rRNA (Azhar, 2016).

Identifikasi secara genotip dapat dilakukan dengan cara mengisolasi DNA kromosom bakteri, kemudian diidentifikasi molekuler gen pengkode rRNA, yaitu gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA sering digunakan sebagai penanda molekuler penentuan spesies bakteri pada saat ini. Hal ini disebabkan ukuran gen 16S rRNA cukup memadai yaitu sekitar 1500 pasang basa (pb) dan memudahkan dalam proses amplifikasi gen tersebut secara PCR. (Ranjard *et al.*, 2001 dan Nuroniyah, 2012). Identifikasi sekuen gen 16S rRNA diawali dengan mengisolasi gen 16S rRNA menggunakan metode PCR. Produk PCR (Amplikon) dikloning ke sel bakteri *Ecoli* TOP10 dan disekuensing menggunakan metode *Dideoxy-Sanger*, selanjutnya diidentifikasi menggunakan program komputer.

Skrining bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi *Dahlia* sp. telah dilakukan dan bakteri tersebut telah dikoleksi di laboratorium biokimia FMIPA UNP (Azhar dkk, 2017). Beberapa isolat tersebut belum diidentifikasi secara molekuler. Pada penelitian ini telah ditentukan sekuen gen 16S rRNA bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi *Dahlia* sp. untuk menentukan genus dan spesies bakteri tersebut sebagai langkah awal untuk isolasi gen pengkode inulinase.

B. Identifikasi Masalah

Pada penelitian yang telah dilakukan, dapat diidentifikasi beberapa masalah sebagai berikut.

1. Identifikasi jenis bakteri dapat dilakukan secara fenotip dan genotipe, namun identifikasi secara fenotip membutuhkan waktu yang lama
2. Sekuensing gen 16S rRNA bakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode *Maxam-Gilbert* dan metode *Dideoxy-Sanger*, tetapi metode *Maxam-Gilbert* jarang digunakan karena tidak sederhana dan waktu yang lama.
3. Isolat bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi *Dahlia* sp. tersedia di Laboratorium Biokimia FMIPA UNP, namun beberapa isolat belum diidentifikasi secara molekuler.

C. Batasan Masalah

Agar penelitian yang dilakukan lebih terfokus, maka peneliti membatasi masalah sebagai berikut.

1. Identifikasi bakteri hanya dilakukan secara genotip.
2. Proses sekuensing DNA hanya dilakukan dengan metoda *Dideoxy-Sanger*.

D. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah, dapat dirumuskan masalah penelitian yang dilakukan yaitu Apakah genus dan spesies dari isolat bakteri pendegradasi inulin pada rizosfer umbi *Dahlia* sp. berdasarkan sekuen gen 16S rRNA?

E. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah menentukan kelompok genus dan spesies dari isolat bakteri pendegradasi inulin pada rizosfer umbi *Dahlia* sp. berdasarkan sekuen gen 16S rRNA.

F. Manfaat Penelitian

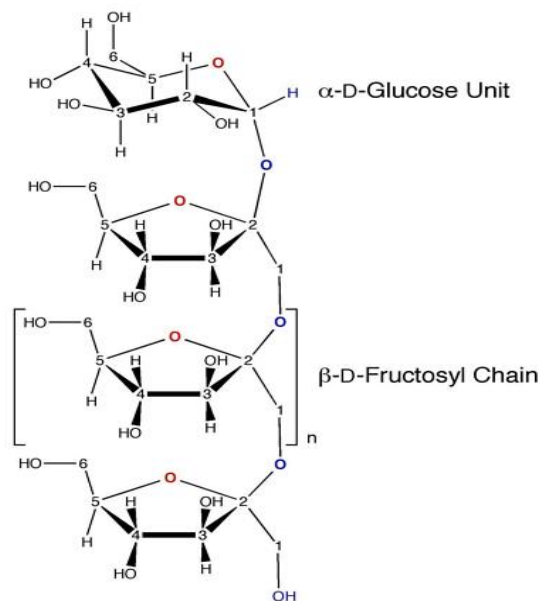
Hasil penelitian yang dilakukan diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut.

1. Memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu dan teknologi tentang gen 16S rRNA sebagai penentu spesies dan genus bakteri.
2. Dapat dijadikan sebagai sumber ide dan referensi untuk penelitian selanjutnya.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Inulin

Inulin merupakan polimer alami dari kelompok karbohidrat. Inulin tersusun dari 2- 60 molekul fruktosa yang dihubungkan oleh ikatan β -(2-1)glikosida dan umumnya memiliki sebuah molekul terminal yaitu glukosa yang terhubung dengan fruktosa melalui ikatan α -(1-2)glikosida. Struktur inulin dimuat pada Gambar 1. Inulin ditemukan dalam jumlah banyak pada tanaman *chicory*, *Dahlia* sp., dan *Jerusalem artichoke*. Inulin juga dapat dihasilkan oleh mikroorganisme seperti spesies *Streptococcus* dan *Aspergillus* (Krivorotova, 2014).



Gambar 1. Struktur Inulin (Ozturk dan Serdaroglu, 2017)

Inulin dalam struktur polimernya mengandung ujung terminal glukosa ditulis dengan GF_n, sedangkan tanpa mengandung ujung terminal glukosa

ditulis dengan F_n . Simbol n pada rumus tersebut adalah derajat polimerisasi (DP). Jumlah monomer yang dikenal dengan DP bergantung sumber inulin. Inulin yang memiliki $2 < DP \leq 10$ dikenal dengan oligofruktosa (FOS). Inulin yang berasal dari tumbuh-tumbuhan memiliki DP yang bervariasi, umumnya memiliki DP 70 unit. Inulin yang berasal dari bakteri memiliki DP yang tinggi yaitu 10.000 sampai 100.000 (Kulminskaya, 2003).

Inulin merupakan serbuk berwarna putih. Inulin tidak dapat dicerna oleh enzim dalam sistem pencernaan manusia (Wijanarka dkk, 2011). Pada lingkungan yang netral inulin stabil secara kimia. Stabilitas kimia dari inulin berkurang pada lingkungan asam ($pH \leq 4$) dan kenaikan suhu. Kelarutan inulin sangat mudah larut dalam air panas. Pada suhu $25^\circ C$ inulin dapat larut sebanyak 120 gram per liter (Ozturk dan Serdaroglu, 2017). Kelarutan inulin dalam air disebabkan interaksi gugus hidroksi dari molekul inulin dengan air. Kelarutan inulin juga dipengaruhi oleh DP inulin. Semakin besar DP inulin maka inulin semakin sulit larut (Azhar, 2009).

Kelarutan inulin yang besar dalam air merupakan sifat yang sangat menguntungkan, karena sifat ini dibutuhkan dalam reaksi hidrolisis inulin secara enzimatis. Satu molekul inulin ($G F_n$) jika dihidrolisis sempurna akan menghasilkan molekul fruktosa dalam jumlah besar dan sebuah molekul glukosa. Hidrolisis inulin dipengaruhi oleh suhu dan derajat keasaman (pH). Pada suhu kamar dan pH netral inulin dapat dihidrolisis pada sistem berair (Barclay *et al.*, 2012).

Inulin banyak diaplikasikan dalam skala industri seperti industri makanan, farmasi, kimia dan industri lainnya. Hal ini menyebabkan banyak peneliti untuk mempelajari inulin (Chi *et al.*, 2011). Inulin dan fruktooligosakarida (FOS) dikelompokkan sebagai *food ingredient* yang dikelompokkan sebagai prebiotik. Inulin merupakan prebiotik yang paling baik diantara prebiotik lainnya. Prebiotik merupakan substrat yang tidak dapat dicerna oleh enzim dalam sistem pencernaan manusia, sehingga sampai diusus besar tidak mengalami perubahan struktur. Hal ini akan dimanfaatkan oleh mikro flora dalam usus besar. Hal demikian akan memberikan dampak positif bagi inang baik hewan maupun manusia yaitu dapat mencegah patogen, absorpsi, menurunkan resiko kanker usus besar, mengurangi glukosa darah dan kolesterol (Li *et al.*, 2014).

Hasil hidrolisis dari inulin banyak dimanfaatkan di industri. Salah satu hasil hidrolisis yang digunakan adalah sebagai sirup fruktosa. Fruktosa merupakan salah satu jenis gula yang tingkat kemanisan 1,7 kali lebih manis dibanding sukrosa. Hal ini menyebabkan fruktosa banyak dimanfaatkan di industri minuman, makanan, dan obat-obatan (Susilowati, 2015). Jika dilihat dari struktur, inulin dapat diaplikasikan untuk produksi bioetanol dan fuel sel (Apolinario, 2014). Bahkan baru baru ini inulin dapat dijadikan sebagai raw material pada produksi hidrogen untuk bahan bakar yang ramah lingkungan (Jiang, 2017).

B. Bakteri Pendegradasi Inulin dari Rizosfer Umbi *Dahlia* sp.

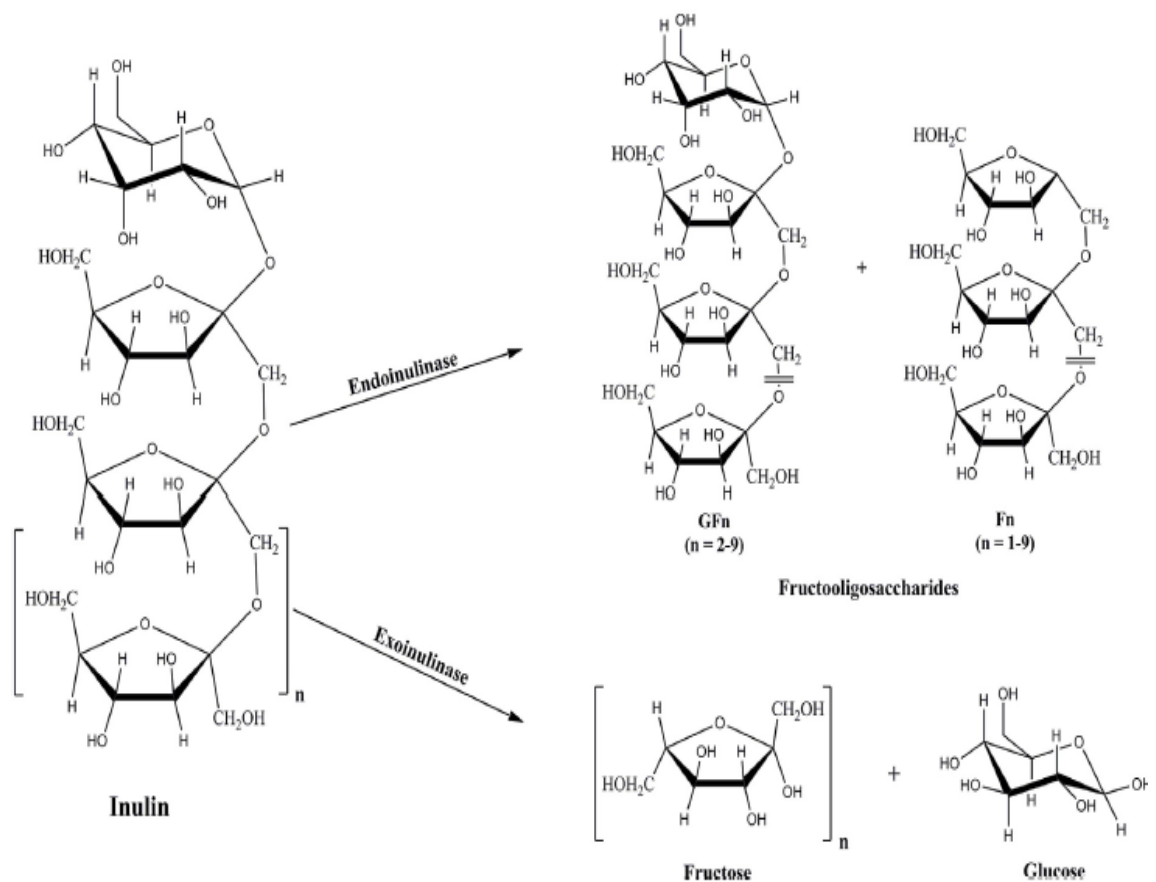
Bakteri merupakan organisme uniseluler yang memiliki ukuran yaitu 0,5-2 μm (Dagdag, 2015). Bakteri termasuk dalam kelompok sel prokariot, yaitu inti sel tidak dibungkus membran. Sel bakteri mengandung satu untai molekul DNA sirkuler yang dinamakan DNA genomik dan satu atau lebih molekul DNA *sirkuler* kecil yang dinamakan DNA plasmid. Di alam, beberapa plasmid resisten dengan racun dan antibiotik yang terdapat pada lingkungan bakteri tersebut. Bakteri sering ditemukan di tanah, permukaan air, dan jaringan organisme hidup atau organisme pembusuk. Bakteri juga ditemukan di lingkungan ekstrim seperti pada temperatur tinggi, kadar garam tinggi, dan kadar asam yang tinggi (Khiyami, 2012)

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhan, bakteri dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok yaitu *psikrofil*, *mesofil*, *termofil*, dan *hipertermofil*. Bakteri *psikrofil* adalah bakteri yang tumbuh optimal pada suhu rendah yaitu optimum pada 4 °C. Bakteri *mesofil* adalah bakteri yang tumbuh optimal pada suhu 37°C. Bakteri *termofil* tumbuh optimal pada suhu 60 °C. Bakteri *hipertermofil* tumbuh pada suhu optimal yang sangat panas yaitu suhu 88 °C dan 106 °C (Azhar, 2016).

Beberapa spesies bakteri dapat menghasilkan inulinase. Inulinase memiliki peranan yang penting dalam bioteknologi untuk diaplikasikan di industri. Peneliti terdahulu telah melaporkan bahwa inulinase dapat memproduksi berbagai macam metabolit sekunder seperti asam sitrat, asam laktat, etanol, biofuel, dan butendiol (Singh, 2016). Inulinase memiliki

peranan penting dalam industri makanan yaitu suatu enzim yang mengkatalisis hidrolisis inulin menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS). Fruktosa dan FOS digunakan di industri makanan dan minuman (Laowklom, 2012).

Berdasarkan proses hidrolisis, inulinase memiliki dua tipe aksi terhadap substrat inulin yaitu endoinulinase (EC 3.2.2.7) dan exoinulinase (EC 3.2.1.80). Aksi exoinulinase pada inulin menghasilkan fruktosa sedangkan endoinulinase menghasilkan fruktooligosakarida (FOS). Tipe aksi exoinulinase dan endoinulinase dapat dilihat pada Gambar 2 (Nagem, 2004 dan Singh, 2017).



Gambar 2. Tipe aksi exoinulinase dan endoinulinase (Singh, 2017).

Inulinase dari bakteri lebih menguntungkan karena dihasilkan jumlah yang lebih banyak dan budidaya lebih mudah. Beberapa bakteri pendegradasi inulin adalah *Flavobacterium multivorum*, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus*, *Xanthomonas campestris*, *Streptomyces* spp. dan *Bacillus cereus* (Gavrilov & Ivanova, 2014). Salah satu sumber bakteri pendegradasi inulin adalah rizosfer umbi *Dahlia* sp. Rizosfer adalah tanah yang melekat pada permukaan akar umbi *Dahlia* sp. Tanah ini berfungsi sebagai perantara mikroorganisme ke pusat nutrisi dari tumbuhan. Rizosfer umbi *Dahlia* sp. dapat digunakan sebagai sumber bakteri pendegradasi inulin. Wijanarti telah mengisolasi bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi *Dahlia* sp. Hasil diperoleh 2 buah isolat bakteri yaitu bakteri yang bersifat termotabil (Wijanarka, 2002).

C. Gen 16S rRNA

Identifikasi spesies bakteri dapat digunakan metode secara fenotip dan genotip. Secara fenotip, bakteri diidentifikasi melalui morfologinya seperti bentuk, warna koloni dan uji biokimia dari bakteri. Metode ini membutuhkan waktu yang lama dalam proses identifikasinya. Dengan berkembangnya metode penelitian, bakteri dapat diidentifikasi secara genotip. Identifikasi bakteri secara genotip dapat ditujukan pada DNA total atau urutan basa nukleotida suatu gen (Azhar, 2016).

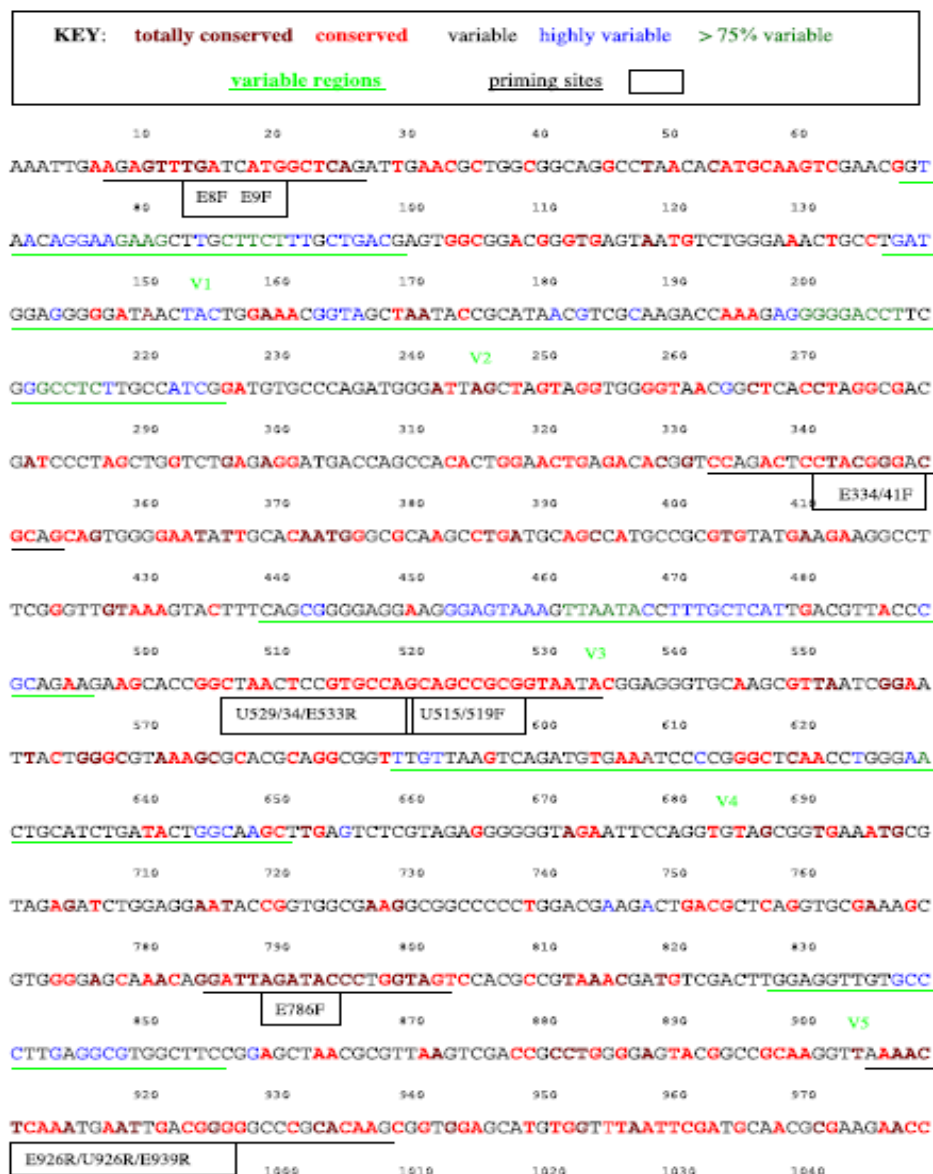
Gen adalah segmen pada DNA yang mengkode RNA yaitu tRNA, rRNA, mRNA dan molekul kecil RNA. Gen merupakan unit pewarisan sifat bagi setiap makhluk hidup (Nelson, *et al.*, 2013). Gen pengkode rRNA

merupakan gen yang menarik untuk diidentifikasi dalam menentukan spesies dari suatu bakteri. Gen pengkode rRNA dapat digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Perbandingan sekuens rRNA dapat menunjukkan hubungan evolusi antar organisme (Rinanda, 2011).

Pada sel prokariotik terdapat gen pengkode rRNA yang terdiri dari tiga komponen yaitu 5S rRNA, 16S rRNA, dan 23S rRNA. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek yaitu 120 pb (pasang basa), sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang yaitu sekitar 2900 bp. Molekul 16S rRNA memiliki ukuran sekitar 1500 bp (Pangastuti, 2006). Di antara ketiganya, gen 16S rRNA yang paling sering digunakan sebagai penanda molekuler penentuan spesies bakteri pada saat ini. Hal ini disebabkan ukuran gen 16S rRNA cukup memadai dan memudahkan dalam proses amplifikasi gen tersebut secara PCR (Nuroniya, 2012). Analisis gen 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem (Clarridge, 2004).

Gen 16S rRNA memiliki daerah-daerah bersifat lestari. Daerah lestari adalah daerah urutan basa yang dimiliki oleh semua makhluk hidup (Mignard, 2006). Pada beberapa bagian lain terdapat daerah yang bersifat semi-lestari dan variabel. Pada gen 16S rRNA terdapat 9 daerah variabel yang ditandai dengan V1 sampai V9. Daerah-daerah variabel tersebut

memungkinkan untuk membedakan organisme dalam genus, bahkan spesies tetapi tidak antar strain dalam spesies yang sama. Pada daerah yang sangat lestari (*absolutely conserved*) dapat dijadikan primer universal untuk amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan metoda PCR. Daerah tersebut dapat dilihat pada urutan basa nukleotida 16S rRNA *E. Coli* pada Gambar 3 (Azhar, 2016).



Gambar 3. Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA *E.coli* (Smith, 2003)

D. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR merupakan metode perbanyakan (amplifikasi) suatu daerah spesifik DNA yang terletak antara dua daerah secara *in vitro*. Metode PCR ditemukan pada tahun 1985 oleh Kary Mullis dan pada tahun 1993 ia memperoleh hadiah nobel atas penemuannya. PCR merupakan metode yang sangat sensitif karena jumlah DNA yang diperlukan sangat sedikit. Metode PCR digunakan secara intensif untuk analisa dalam bidang molekuler genetik (Azhar, 2013).

Proses PCR pada prinsipnya melibatkan tiga proses yaitu:

1. Denaturasi DNA templat

Denaturasi DNA templat merupakan tahap awal dalam proses amplifikasi secara PCR. Templat adalah DNA yang akan diperbanyak. Denaturasi DNA merupakan proses pemutusan ikatan hidrogen antar basa nukleotida DNA *double helix*, sehingga untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Proses ini berlangsung sekitar 1,5 menit. Suhu yang digunakan untuk denaturasi adalah 94 °C. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda kembali) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim *polimerase* (Rahayu, 2015)

2. *Annealing* Primer

Annealing Primer adalah proses penempelan primer pada DNA templat yang telah terdenaturasi. Proses ini terjadi karena penurunan suhu

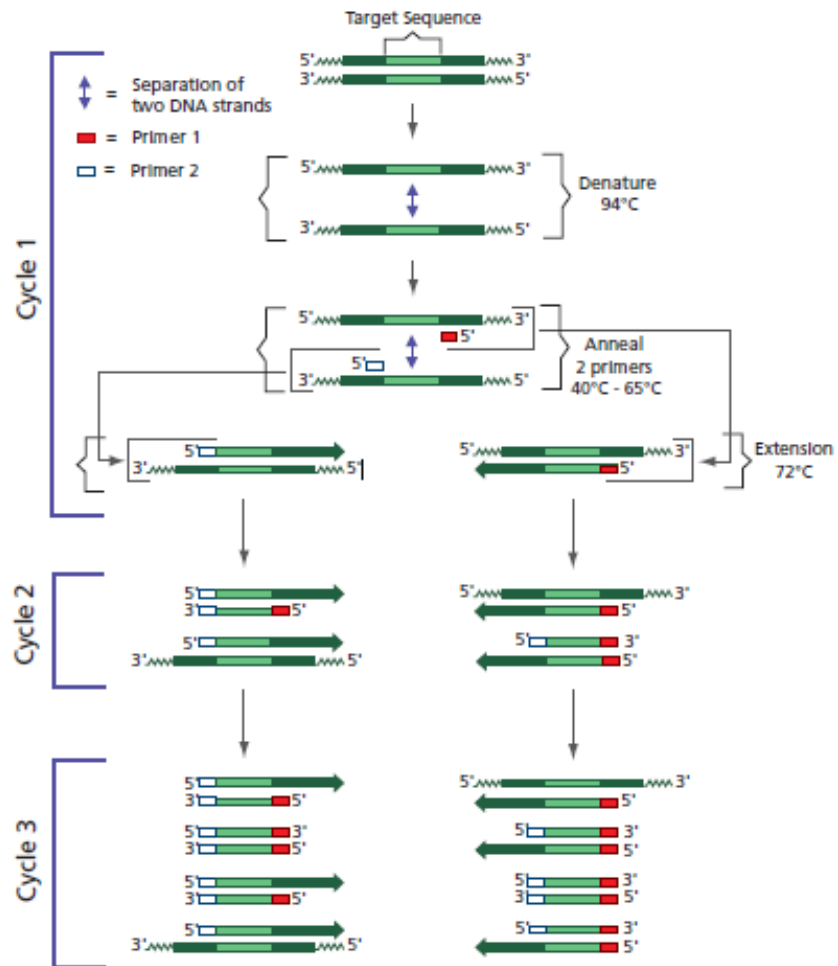
denaturasi. Suhu penempelan yang digunakan adalah antara 36°C-72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50–60°C. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Pada fase ini, primer dan DNA templat akan membentuk ikatan hidrogen secara terus-menerus yang menyebabkan terjadi penempelan primer ke templet DNA. Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa. Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik (Yusuf, 2010).

3. Perpanjangan (*extension*) primer

Perpanjangan primer adalah proses polimerisasi. Pada tahap ini primer berikatan dengan deoksi nukleotida tripospat (dNTP) yang urutannya merupakan komplemen dengan nukteotida templat dan prosesnya dikatalisis oleh enzim polimerisasi. Perpanjangan primer pada masing-masing templat dimulai dari arah 5' ke 3' dari untai DNA. Temperatur yang digunakan pada tahap ini biasanya 72°C. Untuk mengurangi kemungkinan proses baliknya template maka pada proses perpanjangan suhunya ditingkatkan dari suhu saat *annealing*. Hal ini bertujuan agar primer yang tidak persis sama akan lepas kembali oleh suhu yang tinggi sehingga tidak terjadi perpanjangan fragmen. Waktu yang digunakan pada tahap ini adalah 5 menit (Ajdukovic, 2017).

Ketiga proses PCR dilakukan secara berulang, sehingga prosesnya disebut juga siklus PCR. Proses siklus ini biasanya diulang sebanyak 25-35 kali. Jumlah siklus PCR tergantung produk yang diinginkan hingga diperoleh

DNA target dan dapat diamati pada elektroforesis gel agarosa. Siklus amplifikasi DNA metode PCR dimuat pada gambar 4. (Handoyo, 2001).



Gambar 4. Siklus amplifikasi DNA ([www. Advotek. Com](http://www.Advotek.Com), diakses tanggal 25 November 2017)

Reagen yang digunakan pada PCR adalah DNA target (DNA template), dua primer, taq polimerase, buffer dan *Deoxy nucleotide triphosphates* (dNTP). DNA templat merupakan urutan basa nukleotida DNA yang akan diamplifikasi (DNA target) yang berupa untai tunggal atau ganda. DNA templat yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10^5 - 10^6 molekul.

Dua hal penting tentang *template* adalah kemurnian dan kuantitas (Rajalakshmi, 2017). Primer adalah oligonukleotida yang terdiri dari 18 – 28 basa nukleotida digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi pada ujung 3'. Deoksi ribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg^{2+} sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion (Yusuf, 2010). *Taq polimerase*, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA (Handoyo, 2001).

Keberhasilan amplifikasi dapat dilakukan dengan cara pengecekan dengan gelelektroforesis produk PCR pada gel agarosa, selanjutnya dilakukan visualisasi. Gel agarosa merupakan polisakarida yang berbentuk matriks dengan ukuran pori yang besar, sehingga gel agarosa cocok untuk memisahkan potongan DNA ukuran besar yaitu amplifikasi metode PCR. Metode dilakukan dengan cara menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa pada alat elektroforesis dan menghubungkan alat tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil akan pindah dengan cepat dibanding untai DNA panjang (Fatimawali, 2013).

E. Sekuensing DNA dengan Metode *Dideoxy-sanger*

Proses penentuan urutan basa nukleotida pada DNA disebut dengan sekuensing. Ada dua metode untuk menentukan urutan basa nukleotida pada DNA yaitu metode *Maxam-Gilbert* dan *Dideoxy-Sanger*. Metode yang lebih sering digunakan adalah metode *Dideoxy-Sanger*. Pilihan penggunaan metode

ini karena kesederhanaan dan kecepatannya. Prinsip Sekuensing dengan metode *Dideoxy-Sanger* adalah perpanjangan primer yang menempel pada templet yang akan disekuen sampai sebuah nukleotida pengakhir rantai berikatan.

Reagen yang digunakan dalam metode *Dideoxy-Sanger* adalah templat atau DNA yang akan disekuensing, primer, DNA polimerase, dNTP dan ddNTP. Primer merupakan oligopeptida yang komplemen dengan urutan nukleotida spesifik pada templat, biasanya primer yang digunakan memiliki 30 nukleotida. Templat merupakan untai tunggal DNA yang akan ditentukan urutan nukleotida yang akan berikatan dengan primer. dNTP yang digunakan dalam reaksi adalah dATP, dCTP, dGTP, dTTP, sedangkan ddNTP adalah ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP. dNTP berlabel digunakan untuk melihat fragmen DNA dengan mata (Obenrader, 2003 dan Walker, 2013).

Berdasarkan proses sekuensing, metode *Dideoxy-Sanger* terdiri dari 4 langkah yaitu :

1. Persiapan template

Template DNA yang akan ditentukan urutan basa nukleotidanya harus tunggal, untuk DNA ganda maka harus didenaturasi terlebih dahulu agar diperoleh rantai tunggal

2. Reaksi sekuensing

Reaksi sekuensing diawali dengan penempelan primer pada templat dan terjadinya perpanjangan primer pada templat yang terjadi selama 30

menit. Setelah terbentuk oligonukleotida, maka terjadi reaksi *labelling*, yaitu penambahan satu dNTP takberlabel dan yang sudah dilabel dengan isotop P atau S yang terjadi selama 5 menit. Tahap akhir dari reaksi sekuensing ini terjadi selama 30 menit, yaitu penambahan masing masing ddNTP pada dNTP. Pada reaksi *labelling* yang dilakukan dalam 4 tabung terpisah. Pada ddNTP tidak terdapat gugus hidroksil pada posisi 2' dan 3', sehingga tidak terbentuk ikatan fosfodiester dengan nukleotida sehingga reaksi pemanjangan primer terhenti (Walker, 2013).

3. Elektroforesis gel

Pemisahan DNA berlabel dapat dilakukan dengan elektroforesis gel poliakrilamid. Gel poliakrilamid digunakan karena mempunyai ukuran pori yang lebih kecil, sehingga cocok digunakan untuk memisahkan ukuran molekul DNA yang lebih kecil (Franca *et al.*, 2002).

4. Autoradiografi

Autoradiografi merupakan teknik yang digunakan untuk menampakkan pemisahan fragmen fragmen oligonukleotida hasil reaksi sekuensing pada gel poliakrilamid dengan menggunakan film yang peka terhadap sinar β .

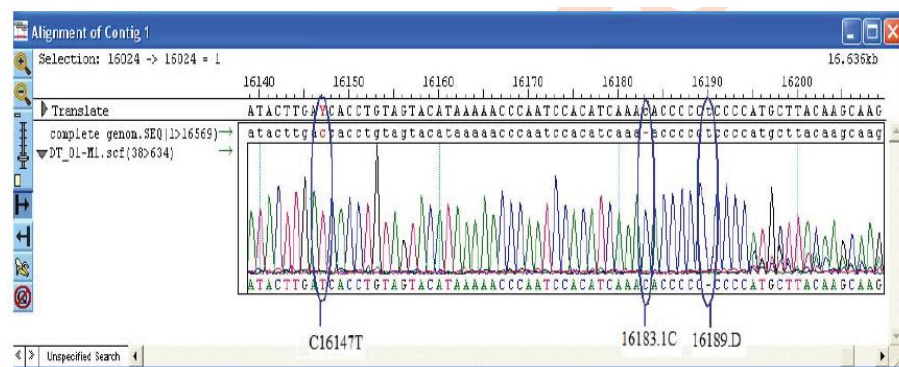
F. Bioinformatika

Bioinformatika adalah ilmu yang mempelajari penerapan teknik komputasi untuk mengelola dan menganalisis informasi hayati. Bidang ini mencakup penerapan metode matematika, statistika dan informasi untuk memecahkan masalah biologi, terutama terkait dengan penggunaan sekuen

DNA dan protein. Istilah bioinformatika mulai dikemukakan pada pertengahan era 1980-an, namun penerapan bidang dalam bioinformatika sudah sejak 1960-an. Peranan yang paling penting dari bioinformatika adalah untuk mempercepat penelitian bioteknologi modern dan mengelola informasi biologis (Kumar, 2017).

1. Program Seqmen DNASTar

Program Seqman DNASTar adalah sebuah *software* komputer yang digunakan untuk menganalisis atau mendeteksi data sekuen dari hasil *sequencing* DNA. Data yang diolah adalah data hasil *sequencing* DNA berupa *electropherogram*. Tampilan *electropherogram* sekuen DNA dimuat pada Gambar 5. Prinsip kerja program ini adalah hasil dari data *sequencing* yang berupa seperti grafik atau kromatogram diterjemahkan menjadi urutan-urutan basa nukleotida. Hasil data dari Seqman DNASTar ini adalah urutan dari basa nukleotida DNA sampel yang dianalisa.



Gambar 5. Tampilan Electropherogram Sekuen DNA (Gumilar dkk., 2013)

2. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Sekuen DNA/Protein yang diperoleh dari hasil penelitian di laboratorium dapat dibandingkan dengan data pada *GenBank*. Salah satu

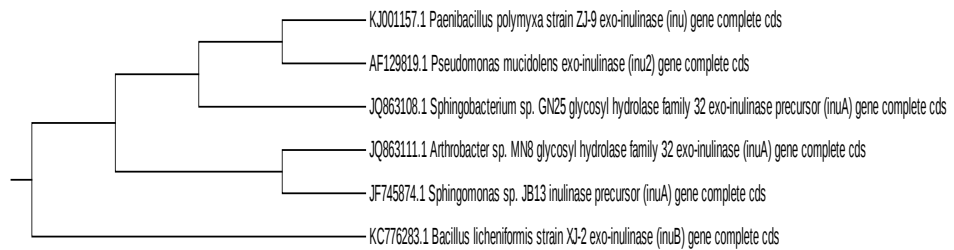
bentuk analisis yang dapat dilakukan adalah analisis penjajaran sekuen DNA. Analisis penjajaran dapat digunakan untuk membandingkan dua sekuen atau lebih. Program yang digunakan untuk analisis penyejajaran yaitu program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*). Program ini dapat diakses melalui website *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Program BLAST merupakan salah satu program yang paling banyak digunakan sebagai alat bioinformatika, karena program ini sangat penting dalam praktik bioinformatika (Vouzis, 2010).

BLAST adalah sebuah program untuk menemukan daerah dengan kesamaan lokal antara urutan nukleotida atau protein pada suatu *database* sasaran. Program ini membandingkan urutan basa nukleotida DNA/ asam amino pada protein ke database sekuens dan menghitung kecocokan secara statistik. Berdasarkan fungsinya, BLAST ada empat macam, namun pada penelitian ini digunakan nukleotida BLAST, yaitu penjajaran nukleotida hasil penelitian dengan nukleotida yang ada di database (Benson, 2016 dan Dharmayanti, 2011).

3. *Molecular Evolution Genetic Analysis* (MEGA)

Software MEGA dikembangkan sejak 1994 untuk analisa sekuen dari DNA dan protein yang bertujuan untuk menentukan hubungan kekerabatan dari gen, genom, dan spesies dari waktu ke waktu (Tamura *et al.*, 2013). MEGA merupakan *software* yang digunakan untuk menganalisis perbedaan atau kesamaan sekuen gen dari banyak *families* atau perbedaan

spesies. Hasil yang diperoleh dapat diketahui hubungan evolusi dari beberapa spesies. Hubungan tersebut dapat dilihat pada pohon filogenetika. Contoh pohon filogenetika dapat dilihat pada Gambar 6 (Kumar,2008)



Gambar 6. Contoh pohon filogenetika

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian bahwa gen 16S rRNA dari Bakteri pendegradasi inulin pada rizosfer umbi *Dahlia* sp. memiliki kesamaan sekuen 99% dengan spesies *Klebsiella pneumoniae*. Berdasarkan hal ini, disimpulkan bahwa Bakteri pendegradasi inulin pada rizosfer umbi *Dahlia* sp. termasuk ke dalam kelompok genus *Klebsiella* dan spesies *Klebsiella pneumoniae*.

B. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan agar peneliti berikutnya memperhatikan hal-hal berikut.

1. Alat, bahan dan lingkungan bekerja harus dalam kondisi steril untuk menghindari kontaminasi
2. Peneliti selanjutnya mengisolasi gen pengkode inulinase dari Bakteri pendegradasi inulin pada rizosfer umbi *Dahlia* sp. dan mengaplikasikan di Industri yang membutuhkan.

KEPUSTAKAAN

- Ajduković, T.K., Nagl, N., Ćurčić, Z., & Zorić. 2017. "Estimation of genetic diversity and relationship in sugar beet pollinators based on SSR markers". *Electronic Journal of Biotechnology*. [http:// dx.doi.org/ 10.1016/j. ejbt. 2017.02.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.02.001)
- Allais, J.J., G. Hoyos-Lopez and J. Baratti. 1987. "Characterization and Properties of an Inulinase from a Thermophilic Bacteria". *Carbohydrate Polymers* 0144-8617/87/S03.50
- Apolinário, A.C. *et al.* 2014. "Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology". *Carbohydrate Polymers* 101 (2014) 368– 378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.081>
- Azhar, M. 2009. "Inulin Sebagai Prebiotik". *SAINTEK Vol. XII, Nomor 1*
- Azhar , Minda., Dessy Natalia., Sumaryati Syukur, Vovien and Jamsari. 2015. "Gene Fragments that Encodes Inulin Hydrolysis Enzyme from Genomic *Bacillus licheniformis*: Isolation by PCR Technique Using New Primers". *International Journal of Biological Chemistry* 9 (2): 59-69, 2015. DOI: 10.3923/ijbc.2015.59.69
- Azhar, M. 2016. *Biomolekul Sel*. Padang : UNP Press
- Azhar, dkk. 2017. "Skrining bakteri pendegradasi inulin dari Rizosfer umbi dahlia menggunakan Inulin umbi dahlia". *Eksakta Vol. 18 No. 2*. E-ISSN : 2549-7464, P-ISSN : 1411-3724
- Barclay, T., *et al.* 2012. "Analysis of the hydrolysis of inulin using real time ¹H NMR spectroscopy". *Carbohydrate Research* 352 (2012) 117–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.001>
- Benson, A., *et al.* 2016. "GenBank". *Nucleic Acids Research*. vol 45. doi:10.1093/nar/gkw1070
- Brown Terry A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-8173-0
- Castro, G.R., M.D. Baigori and F. Sineriz, 1995. A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms. *J. Microbiol. Meth.*, 22: 51-56.
- Chi, M.Z. 2011. "Biotechnological potential of inulin for bioprocesses". *Bioresource Technology* 102 (2011) 4295–4303. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12. 086