

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL
INULINASE PADA RIZOSFER *Dahlia hybrida* Hort.**

SKRIPSI

untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar sarjana sains



**LAILA KURNIATI
NIM. 84046**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2011**

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Laila Kurniati
NIM : 84046
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

dengan judul

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL INULINASE PADA RIZOSFER *Dahlia hybrida* Hort.

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

Padang, 20 Juli 2011

Tim Penguji

Nama

Tanda Tangan

Ketua : Dr. Yuni Ahda, M.Si.
Sekretaris : Drs. Mades Fifendy, M.Biomed.
Anggota : Dr. Azwir Anhar, M. Si.
Anggota : Dr. Linda Advinda, M.Kes.
Anggota : Dr. Ramadhan Sumarmin, M.Si.



The image shows four handwritten signatures, each written over a horizontal line. The signatures are in black ink and appear to be the names of the examiners listed in the table to the left.

PERSETUJUAN SKRIPSI

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil
Inulinase Pada Rizosfer *Dahlia hybrida* Hort.

Nama : Laila Kurniati

NIM : 84046

Program Studi : Biologi

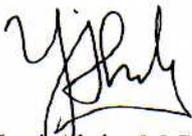
Jurusan : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 20 Juli 2011

Disetujui oleh:

Pembimbing I



Dr. Yuni Ahda, M.Si.
NIP. 19690629 199403 2 003

Pembimbing II



Drs. Mades Fifendy, M. Biomed.
NIP. 19571130 198802 1 001

ABSTRAK

Laila Kurniati: Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Inulinase Pada Rizosfer *Dahlia hybrida* Hort.

Penggunaan enzim pada dunia industri semakin berkembang, salah satunya inulinase. Enzim ini dapat menghidrolisis inulin menjadi fruktosa. Pemakaian fruktosa sebagai bahan pemanis makanan atau minuman lebih menguntungkan dari pada sukrosa. Inulinase dapat dihasilkan oleh tanaman yang mengandung inulin dan mikroorganisme. Kemampuan bakteri menghasilkan inulinase lebih efektif dan efisien karena mampu hidup pada lingkungan yang ekstrim dan mudah dimanipulasi genetik. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan menentukan karakteristik bakteri penghasil inulinase dari rizosfer *Dahlia hybrida* Hort.

Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif yang dilaksanakan dari bulan November 2010 sampai Mei 2011 di laboratorium Mikrobiologi, Bioteknologi, dan Biokimia FMIPA UNP serta Laboratorium Bioteknologi BDP UNAND. Prosedur kerjanya yaitu ekstraksi inulin, isolasi bakteri, pengamatan morfologi, mikroskopis, dan molekuler yang meliputi proses isolasi DNA bakteri dan amplifikasi menggunakan gen 16S rRNA. Data karakteristik bakteri dianalisis secara deskriptif meliputi morfologi, mikroskopis, dan molekuler.

Pada penelitian ini berhasil ditemukan empat isolat bakteri penghasil inulinase yang tergolong gram negatif dengan sel berbentuk basil. Namun memiliki morfologi koloni yang berbeda yaitu bakteri LK1 berbentuk tidak teratur dan tepi koloni tidak rata, bakteri LK2 berbentuk bulat dan tepi koloni rata, bakteri LK3 berbentuk akar dan tepi koloni bercabang seperti benang-benang halus dan bakteri LK4 berbentuk bulat dan tepi koloni rata. Isolasi DNA bakteri penghasil inulinase berhasil dilakukan, namun amplifikasi gen 16S rRNA tidak berhasil dilaksanakan. Hal ini kemungkinan disebabkan tidak optimalnya suhu annealing pada siklus PCR.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kehadiran Allah SWT karena rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Inulinase Pada Rizosfer *Dahlia hybrida* Hort.”

Dalam menyelesaikan skripsi ini penulis banyak mendapat bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih setulusnya kepada yang terhormat:

1. Kedua orang tua penulis dan keluarga yang selalu memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis.
2. Ibu Dr. Yuni Ahda, M.Si. selaku pembimbing I yang telah banyak membimbing, meluangkan waktu dan menuntun penulis hingga menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Drs. Mades fifendy, M. Biomed. selaku pembimbing II, Penasehat Akademik, dan Ketua Program Studi Biologi yang telah memberikan nasehat, arahan, bantuan, dan saran selama perkuliahan dan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Dr. Azwir Anhar, M.Si., ibu Dr. Linda Advinda, M.Kes., dan bapak Dr. Ramadhan Sumarmin, M.Si., selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Dra. Minda Azhar, M.Si. yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penulisan skripsi ini.
6. Bapak Dr. sc. agr. Ir. H. Jamsari, MP. sebagai koordinator bahan, alat, dan fasilitas Laboratorium Budi Daya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Andalas beserta staf.
7. Ibu Dr. Hj. Ulfa Syukur, M.Si. dan ibu Dra. Helendra, M.S. selaku Ketua dan Sekretaris Jurusan Biologi Universitas Negeri Padang.
8. Staf pengajar dan staf administrasi jurusan Biologi Universitas Negeri Padang.

9. Semua pihak yang telah membantu dalam perkuliahan, penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini, tidak terlepas dari kesalahan dan kekeliruan. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran membangun untuk perbaikan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dalam menambah wawasan dan pengetahuan pembaca.

Padang, Juli 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Kontribusi Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Tanaman Dahlia	6
B. Rizosfer	8
C. Inulin	9
D. Inulinase	11
E. Bakteri	11
F. Isolasi dan Karakterisasi Molekuler Bakteri	16
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Jenis Penelitian.....	21
B. Waktu dan Tempat	21
C. Alat dan Bahan.....	21
D. Sampel Penelitian	22
E. Prosedur Penelitian	22
F. Teknik Analisis Data.....	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Isolasi Bakteri Penghasil Inulinase Pada Rizosfer <i>D. hybrida</i>	33
B. Isolasi DNA dan Karakterisasi Molekuler Bakteri Penghasil Inulinase ...	40

BAB V PENUTUP

A. Kesimpulan44

B. Saran44

DAFTAR PUSTAKA45

LAMPIRAN49

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Industri enzim sudah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam dunia perindustrian. Kepedulian masyarakat terhadap lingkungan yang semakin tinggi serta kemajuan teknologi yang ramah lingkungan menjadikan teknologi enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan berbagai proses kimiawi dalam bidang industri. Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak beracun.

Di Indonesia kebutuhan enzim dipenuhi dengan enzim impor. Diantara nilai perdagangan enzim dunia yang mencapai tiga sampai empat miliar dolar per-tahun, Indonesia mengimpor empat sampai lima juta dolar dari negara-negara produsen enzim. Padahal sumber daya alam merupakan peluang berharga bagi pengembangan industri enzim di Indonesia (Akhdia, 2003).

Enzim memegang peranan penting dalam berbagai industri pangan dan non pangan. Industri pangan seperti pembuatan sirup fruktosa (*High Fruktosa Syrup*), enzim pada sari buah, pengempukan daging, pengupasan kulit udang dan isi kerang, pencegahan perubahan warna udang, melarutkan kekeruhan pada warna teh, dan enzim cita rasa (Winarno, 1995). Peranan enzim dalam industri non pangan seperti industri detergen, industri kulit, industri tapal gigi, dan industri obat-obatan (Suhartono, 1989). Inulinase adalah salah satu

enzim yang berperan dalam pengolahan makanan (Wijanarka dan Pujiyanto, 2002).

Inulinase merupakan enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa atau fruktooligosakarida (Saryono dkk., 2002). Inulinase dapat meningkatkan produksi fruktosa yang bermanfaat sebagai pemanis alami yang dikenal sebagai *High Fruktosa Syrup* (HFS) dan dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengurangi ketergantungan gula tebu. HFS memiliki peluang pasar yang baik untuk dikembangkan, namun produksi HFS di Indonesia belum dapat dikembangkan dengan baik karena belum adanya produsen inulinase, biaya impor enzim mahal, enzim yang dihasilkan sangat sedikit, dan jika menghidrolisis enzim dengan menggunakan asam pada suhu tinggi menghasilkan fraksi warna yang gelap serta hasil samping yang tidak diinginkan seperti *difruktofuranc anhirida* (Wijanarka dkk., 2007).

Upaya mengatasi masalah ini perlu dicari alternatif sumber inulinase, salah satunya dari biosintesis mikroorganisme. Sebagai sumber enzim, mikroorganisme lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dibandingkan tumbuhan dan hewan (Akhdiya, 2003). Mikroorganisme yang mampu hidup pada suhu ekstrim untuk menghasilkan inulinase dan mudah dimanipulasi genetik adalah bakteri (Wijanarka dan Pujiyanto, 2002). Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme yang terdapat hampir diseluruh tempat baik lingkungan perairan, tanah

maupun udara dan paling banyak jumlahnya dibandingkan anggota mikroorganisme lainnya seperti jamur, protozoa ataupun actinomycetes (Handayanto dan Hairiah, 2007).

Bakteri penghasil inulinase yang terdapat pada tanah, dapat ditemukan pada daerah rizosfer akar dan umbi tanaman yang mengandung inulin. Rizosfer adalah daerah di sekitar perakaran dan umbi (sekitar 2-3 mm dari permukaan akar atau umbi akar) yang sifat kimia, fisik dan biologinya dipengaruhi oleh aktifitas perakaran. Sistem perakaran umumnya berasosiasi langsung maupun tidak langsung dengan bakteri tanah serta adanya interaksi biokimia antara akar dan bakteri (Handayanto dan Hairiah, 2007).

Dahlia hybrida Hort. (*D. hybrida*) merupakan salah satu tanaman yang mengandung inulin pada akar dan umbinya. Untuk mengetahui bakteri yang berpotensi menghasilkan inulinase dari rizosfer *D. hybrida* maka perlu ditentukan karakteristik secara morfologi, mikroskopis, dan molekuler karena bakteri merupakan mikroorganisme yang tergolong prokaryot yang sulit diamati secara langsung oleh mata. Pengamatan morfologi bertujuan untuk melihat bentuk koloni suatu bakteri. Setiap bakteri memiliki bentuk koloni yang berbeda-beda. Perbedaan warna, ukuran, tepian, dan elevasi merupakan ciri khas yang menentukan karakteristik koloni bakteri (Dwidjoseputro, 1985). Sedangkan Karakteristik sel bakteri dapat ditentukan dengan pengamatan mikroskopis berdasarkan pewarnaan gram (Purwoko, 2007).

Menurut Pangastuti (2006) penentuan spesies bakteri tidak mudah. Bakteri memiliki karakter khusus, berukuran mikroskopis, dan memiliki

struktur yang relatif sederhana. Selain pengamatan morfologi dan mikroskopis. pendekatan genetik juga digunakan untuk menentukan karakteristik bakteri. Teknik yang banyak digunakan adalah teknik RNA ribosomal yaitu dengan analisis gen 16S rRNA. Penggunaan gen 16S rRNA sebagai sasaran penentu karakteristik molekuler suatu bakteri dapat menunjukkan hubungan filogenik suatu individu berdasarkan daerah konservatif dan variatifnya (Pangastuti, 2006).

Berdasarkan latar belakang di atas, penulis telah melakukan penelitian yang berjudul "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Inulinase Pada Rizosfer *Dahlia hybrida* Hort".

B. Rumusan Masalah

1. Apakah bakteri penghasil inulinase bisa didapatkan dari rizosfer *D. hybrida*?
2. Bagaimanakah karakteristik bakteri penghasil inulinase yang diisolasi dari rizosfer *D. hybrida*?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi bakteri penghasil inulinase dari rizosfer *D. hybrida*.
2. Menentukan karakteristik bakteri penghasil inulinase pada rizosfer *D. hybrida*.

D. Kontribusi penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai karakteristik bakteri penghasil inulinase yang hidup di rizosfer *D. hybrida*

berdasarkan isolasi dan karakterisasi sehingga dapat digunakan sebagai alternatif lain pembuatan fruktosa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Dahlia

Tanaman dahlia merupakan tanaman asli pegunungan Meksiko. Penyebaran perdana tanaman dahlia terjadi pada abad XVI ke Spanyol. Pada tahun 1789, umbi dan tanaman dahlia disebarluaskan ke negara–negara Eropa. Pada tahun tersebut, para pakar pemulia tanaman (*Plant Breeding*) merintis persilangan–persilangan tanaman dahlia untuk menghasilkan tipe-tipe dahlia baru. Sumber genetik tanaman dahlia yang pertama kali ditemukan adalah *Dahlia variabilis* (Willd.), tetapi setelah diseleksi dan dikawin silangkan di Eropa menghasilkan tipe-tipe dahlia baru, misalnya *Dahlia rosea*, *Dahlia japonica*, dan *Dahlia hybrida* (Rukmana, 2000).

Penyebaran tanaman dahlia ke Indonesia dibawa oleh orang–orang Belanda pada zaman kolonialisasi (Wijanarka dan Pujiyanto, 2002). Pada mulanya, penanaman dahlia terbatas di daerah-daerah yang berhawa sejuk (dingin), misalnya Lembang dan Cipanas (Cianjur). Selanjutnya, tanaman ini berkembang meluas ke berbagai daerah sentrum bunga potong di wilayah nusantara. Dahlia dapat beradaptasi luas di daerah tropis Indonesia sehingga penanamannya dapat dikembangkan di dataran menengah (medium) sampai dataran tinggi (pegunungan) (Rukmana, 2000).

Pada umumnya dahlia yang ada di Indonesia adalah *Dahlia hybrida* Hort (*D. hybrida*). Tanaman ini merupakan hasil persilangan dari nenek moyang dahlia seperti *Dahlia juarezii*. Karakteristik *D. hybrida* menurut Rukmana

(2000) adalah kuntumnya berbentuk bunga mawar dengan kelopak yang beranekaragam warnanya. Klasifikasi *D. hybrida* ini adalah:

- Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonea
Ordo : Asterales
Famili : Asteraceae
Genus : Dahlia
Spesies : *Dahlia hybrida* Hort. (Segall, 1997)



Gambar 1. *Dahlia hybrida* Hort.

Tanaman dahlia tumbuh sebagai perdu setinggi 1,5 m atau lebih. Susunan tubuh tanaman dahlia terdiri atas umbi, batang, daun, bunga, buah, dan biji. Bentuk umbi dahlia mulai dari bulat kecil sampai besar atau panjang hingga lonjong. Struktur umbi dahlia terdiri atas kulit umbi berwarna putih kekuning-kuningan sampai kecoklatan, daging umbi tebal berwarna putih atau bening, dan mata tunas. Umbi dahlia dapat digunakan sebagai bahan perbanyakan tanaman secara vegetatif (Rukmana, 2000).



Gambar 2. Umbi Tanaman Dahlia

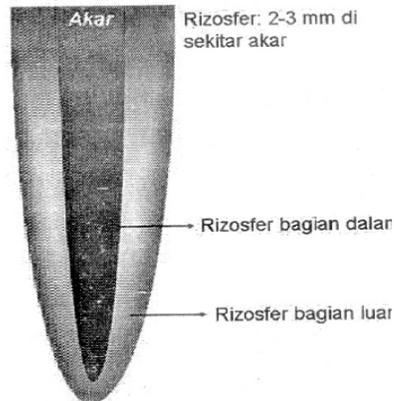
Umbi dahlia mengandung 70 % inulin yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan. Jika inulin dihidrolisis oleh enzim tertentu atau mikroba tanah, inulin akan berubah menjadi fruktosa, suatu gula yang banyak digunakan dalam pengawetan makanan dan pembuatan sirup fruktosa. Pada prinsipnya, semua jenis dahlia mengandung inulin, tetapi kadar dan sifatnya bervariasi. Widowati (2005) melaporkan bahwa lima jenis umbi dahlia dari daerah Cianjur, Jawa Barat, telah dikaji karakteristik inulinnya, didapatkan kadar air umbi segar berkisar antara 79,7% – 88,75% , sedangkan kadar inulinnya tiap 100 gr umbi dahlia mencapai 65,70%.

B. Rizosfer

Rizosfer merupakan selapis tanah yang menyelimuti permukaan akar tanaman yang masih dipengaruhi oleh aktifitas akar (sekitar 2-3 mm dari permukaan akar atau umbi akar). Akar tanaman menyediakan berbagai bahan organik yang umumnya menstimulir pertumbuhan mikroba (Handayanto dan Hairiah, 2007). Enzim utama yang dihasilkan oleh akar adalah oksidoreduktase, hidrolase, liase, dan transferase. Sedang enzim yang

dihasilkan oleh mikroba rizosfer adalah selulase, dehidrogenase, urease, fosfatase, dan sulfatase. Adanya berbagai senyawa yang menstimulir pertumbuhan mikroba menyebabkan jumlah mikroba di lingkungan rizosfer sangat tinggi (Ariningsih, 2009).

Pada umumnya pengaruh rizosfer lebih besar terhadap bakteri daripada terhadap jamur atau actinomycetes. Beberapa jenis bakteri yang sering dijumpai di rizosfer adalah *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Microccus*, *Agrobacterium*, *Flavor bacterium*, *Mycobacterium*, *Cellulomonas*, dan *Pseudomonas*. (Handayanto dan Hairiah, 2007). Pada tanaman dahlia yang mengandung inulin, dapat ditemukan bakteri penghasil inulinase yang dapat menghidrolisis inulin pada umbi dahlia tersebut (Widowati, 2006).



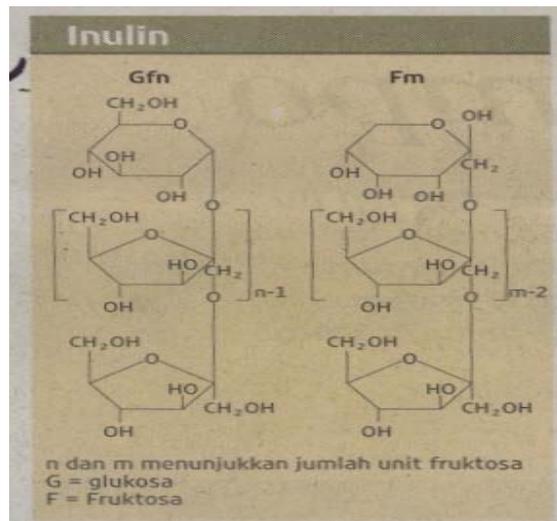
Gambar 3. Skema akar dan rizosfer (Handayanto dan Hairiah, 2007)

C. Inulin

Inulin merupakan suatu polisakarida dengan monomer fruktosa. Inulin bermanfaat dalam bidang pangan antara lain, sebagai pengganti lemak dan gula pada produk makanan rendah kalori serta sebagai bahan baku pembuatan sirup fruktosa. Sementara dalam bidang farmasi, inulin digunakan untuk uji fungsi

ginjal (Widowati, 2006). Inulin bersifat larut dalam air, tetapi tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim dalam sistem pencernaan mamalia sehingga mencapai usus besar tanpa mengalami perubahan struktur. Meskipun demikian, inulin dapat mengalami fermentasi akibat aktivitas mikroflora yang terdapat di dalam usus besar sehingga berimplikasi positif terhadap kesehatan tubuh. Menurut Allais *et al.*, (1986), inulin banyak dimanfaatkan oleh industri pangan yang memproduksi makanan ringan.

Struktur inulin sebagai berikut:



Gambar 4. Struktur Inulin (Widowati,2006)

Inulin mengandung karbohidrat dengan gula rantai panjang yang digunakan untuk menyimpan energi di akar atau di umbi beberapa tumbuhan yang mengandung glukosa dan fruktosa, seperti Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), Chicori (*Chicoryum intybus. L*), Dahlia (*Dahlia sp. L*), Yacon (*Smallanthus sanchifolius*) dan Delion (*Taraxacum officinale*) serta dalam jumlah kecil terdapat dalam Bawang merah, Bawang putih, Asparagus,

Pisang, dan Gandum. Di luar negeri, inulin lebih banyak diproduksi dari umbi Chicory sedangkan di Indonesia inulin diproduksi dari umbi Dahlia (Widowati, 2006).

D. Inulinase

Inulinase adalah enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa atau fruktooligosakarida (Saryono, 2002). Inulin dihidrolisis oleh inulinase menghasilkan 90% fruktosa, karena itu inulinase merupakan komoditi yang sangat potensial untuk dikembangkan (Prayitno dkk., 2000). Pada awalnya hidrolisis inulin dilakukan secara kimia, tetapi cara ini ternyata lebih mahal dan menghasilkan bahan-bahan sampingan yang tidak diinginkan dibandingkan secara enzimatis (Ohta *et al.*, 2004). Menurut Prayitno dkk., (2000), produksi inulinase lebih tinggi pada mikroba terutama bakteri daripada tanaman penghasil inulin karena pertumbuhannya cepat, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan mudah dimanipulasi genetik (Wijanarka dan Pujiyanto, 2000). *Flavobacterium* sp merupakan bakteri penghasil inulinase yang berhasil diisolasi dari tanaman penghasil inulin (Allais *et al.*, 1987).

E. Bakteri

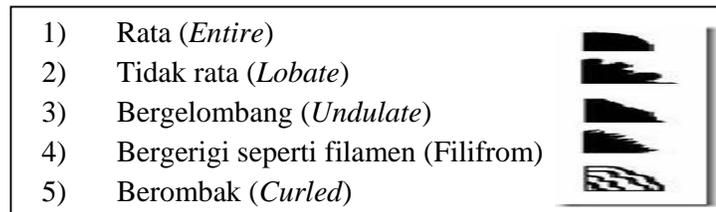
Bakteri adalah bentuk kehidupan tertua didunia sampai sekarang. Sampel fosil menunjukkan bahwa bakteri telah ada sejak $2-3 \times 10^9$ tahun lalu, dan tersebar diseluruh lingkungan dunia. Lamanya bakteri untuk bisa bertahan hidup karena ukurannya yang kecil. Walaupun ukurannya sangat kecil, jumlah

biomassa dan diversitas bakteri dalam tanah sangat besar. Satu sendok tanah produktif umumnya mengandung antara 100 juta sampai 1 milyar bakteri. Sebagian besar sel bakteri dapat dijumpai secara individu atau dalam bentuk koloni (Handayanto dan Hairiah, 2007). Karakteristik bakteri dapat ditentukan dengan pengamatan morfologi koloni dan mikroskopis (Dwidjoseputro, 1985).

1. Morfologi Koloni Bakteri

Karakteristik morfologi bakteri dapat dilihat berdasarkan ukuran, warna, dan bentuk dari sebuah koloni. Bila bakteri tumbuh di dalam medium padat, maka terjadilah suatu kelompok yang dinamakan koloni. Bentuk koloni berbeda-beda untuk setiap spesies. Bentuk tersebut merupakan ciri khas untuk spesies tertentu (Dwidjoseputro, 1985). Bentuk-bentuk koloni bakteri sebagai berikut :

a. Berdasarkan Bentuk Tepian Koloni (*Margin*)



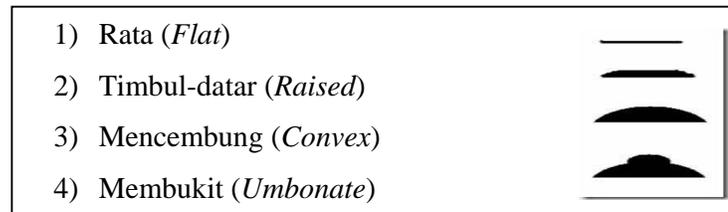
Gambar 5. Bentuk-bentuk tepian koloni bakteri (Ekmonsaurus, 2010)

b. Berdasarkan Bentuk Permukaan Koloni (*Shape*)



Gambar 6. Bentuk-bentuk permukaan koloni bakteri (Ekmonsaurus, 2010)

c. Berdasarkan Ketinggian Permukaan Koloni (*Elevasi*)



Gambar 7. Bentuk-bentuk ketinggian permukaan koloni bakteri (Ekmonsaurus, 2010).

2. Mikroskopis Sel Bakteri

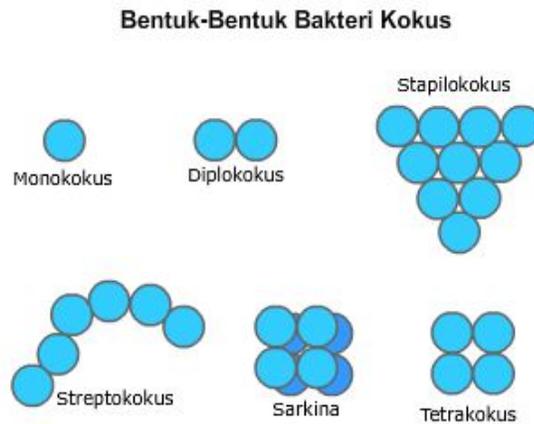
Karakteristik sel bakteri dapat diamati secara mikroskopis karena ukuran sel yang sangat kecil sehingga sulit diamati tanpa bantuan mikroskop dan pewarnaan bakteri (Sulistiyaningsih, 2008). Pewarnaan gram dapat menentukan bentuk sel dan golongan bakteri (Dwidjoseputro, 1985).

a. Bentuk- Bentuk Sel Bakteri

Menurut Dwidjoseputro (1985) bentuk-bentuk sel bakteri adalah:

- 1) Bakteri Kokus
 - a) Monokokus yaitu berupa sel bakteri kokus tunggal.
 - b) Diplokokus yaitu dua sel bakteri kokus berdempetan.
 - c) Tetrakokus yaitu empat sel bakteri kokus berdempetan berbentuk segi empat.
 - d) Sarkina yaitu delapan sel bakteri kokus berdempetan membentuk kubus.
 - e) Streptokokus yaitu lebih dari empat sel bakteri kokus berdempetan membentuk rantai.

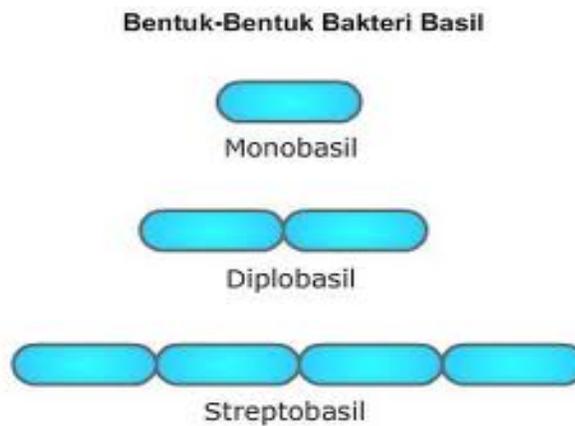
- f) Stapilokokus yaitu lebih dari empat sel bakteri kokus berdempetan seperti buah anggur.



Gambar 8. Bentuk-bentuk bakteri kokus (Ekmonsaurus, 2008)

2) Bakteri Basil

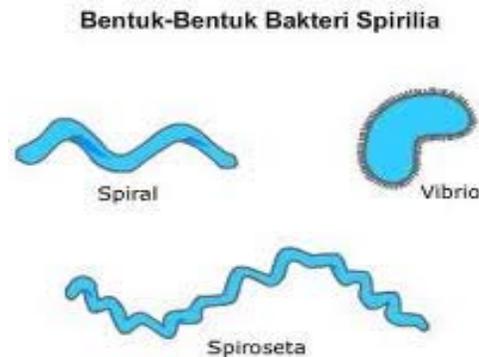
- a) Monobasil yaitu berupa sel bakteri basil tunggal.
- b) Diplobasil yaitu berupa dua sel bakteri basil berdempetan.
- c) Streptobasil yaitu beberapa sel bakteri basil berdempetan membentuk rantai.



Gambar 9. Bentuk-bentuk bakteri basil (Ekmonsaurus, 2008)

3) Bakteri Spirilia

- a) Spiral yaitu bentuk sel bergelombang.
- b) Spiroseta yaitu bentuk sel seperti sekrup.
- c) Vibrio yaitu bentuk sel seperti tanda baca koma.



Gambar 10. Bentuk-bentuk bakteri spirilia (Ekmonsaurus, 2008)

b. Golongan Bakteri

Pengamatan mikroskopis dengan bantuan pewarnaan gram dapat menentukan golongan bakteri yaitu golongan bakteri gram positif atau gram negatif (Sulistiyarningsih, 2008). Menurut Purwoko (2007) karakteristik sel bakteri gram positif dan negatif berbeda, adapun perbedaannya sebagai berikut:

1) Golongan Bakteri Gram Positif

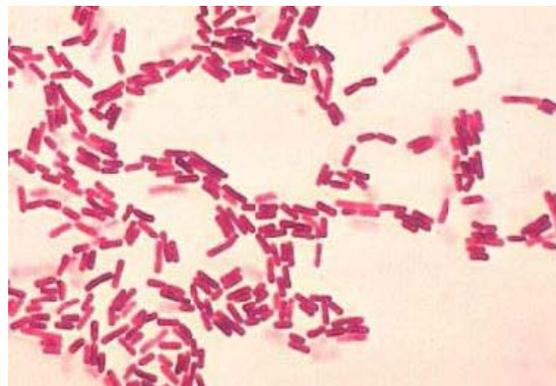
Bakteri yang tergolong gram positif memiliki dinding sel yang tersusun dari berlapis-lapis peptidoglikan. Pewarnaan gram akan menghasilkan warna biru keunguan akibat kristal violet yang mewarnai peptidoglikan.



Gambar 11. Bakteri gram positif (Suwanda, 2008)

2) Golongan Bakteri Gram Negatif

Bakteri yang tergolong gram negatif memiliki dinding sel yang tersusun dari beberapa lapis peptidolikan dan membran luar. Pewarnaan gram akan menghasilkan warna merah muda (*Pink*) akibat safranin yang mewarnai membran luar.



Gambar 12. Bakteri gram negatif (Suwanda, 2008)

F. Isolasi dan Karakteristik Molekuler Bakteri

1. Isolasi Mikroba

Isolasi mikroba merupakan proses untuk memperoleh suatu kultur murni dengan pemisahan satu jenis bakteri atau fungi dari suatu campuran dengan jenis lainnya. Isolasi mikroba dapat dilakukan dengan cara, yaitu :

a. Isolasi Pada Agar Cawan

Prinsip metode ini adalah mengencerkan mikroorganisme sehingga diperoleh individu yang dapat dipisahkan dari organisme lainnya. Setiap koloni yang terpisah berasal dari satu sel tunggal.

b. Isolasi Pada Medium Cair

Metode isolasi pada medium cair dilakukan bila mikroorganisme tidak dapat tumbuh pada agar cawan (medium padat), tetapi hanya dapat tumbuh pada kultur cair. Metode ini juga perlu dilakukan beberapa kali pengenceran karena semakin tinggi pengenceran, peluang untuk mendapatkan satu sel semakin besar.

c. Isolasi Sel Tunggal

Metode isolasi sel tunggal dilakukan untuk mengisolasi sel mikroorganisme berukuran besar yang tidak dapat diisolasi dengan metode agar cawan atau medium cair. Sel mikroorganisme dilihat dengan menggunakan perbesaran sekitar 100 kali. Kemudian sel tersebut dipisahkan dengan menggunakan pipet kapiler yang sangat halus ataupun *mikromanipulator* yang dilakukan secara aseptis (Dwidjoseputro, 1985 dan Sofa, 2008).

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA bakteri secara garis besar meliputi tahap-tahap perusakan dan pembuangan dinding sel, serta pemisahan DNA dari protein dan RNA. DNA hasil isolasi dikatakan baik apabila mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi dan tidak mengalami fragmentasi. DNA yang diperoleh

selanjutnya dipakai sebagai bahan dasar untuk proses PCR. PCR merupakan teknik replikasi DNA yang dilakukan secara *in vitro* dengan tujuan untuk amplifikasi bagian tertentu dari DNA sampel. Empat komponen utama pada proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah DNA cetakan, dNTP, enzim DNA polimerase dan oligonukleotida *primer* untuk mengawali sintesis rantai (Yuwono, 2006).

PCR perlu diikuti dengan suatu tahap akhir yang bertujuan untuk memvisualisasikan produk PCR, mengetahui ukuran produk PCR dan mengetahui apakah produk yang dihasilkan adalah benar seperti yang diinginkan. Salah satu metode deteksi yang umum dilakukan adalah elektroforesis (Gaffar, 2007). Prinsip dasar teknik elektroforesis ini adalah bahwa DNA dapat dipisahkan oleh medan listrik berdasarkan berat molekulnya (Alberts, 1994 dalam Riany, 2008 dan Yuwono, 2006).

3. Karakteristik Molekuler Berdasarkan Gen 16s rRNA

Identifikasi bakteri dilakukan secara molekuler untuk menentukan karakteristik bakteri penghasil inulinase. Identifikasi secara molekuler paling banyak digunakan adalah RNA ribosomal yang merupakan salah satu komponen utama ribosom (Bayu, 2005). Pada prokaryot terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu; 5S, 16S dan 23S. Diantara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis (Pangastuti, 2006).

Gen 16S rRNA merupakan salah satu penyusun sub-unit 30S, yang penting untuk translasi, dan terdiri dari 1542 pasang basa. 16S rRNA adalah suatu jenis RNA yang dilibatkan dalam produksi protein. Sekuens gen 16S rRNA ini dapat digunakan untuk menentukan karakteristik bakteri yang mengalami penyimpangan strain fenotip. Analisis gen 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem. Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul ini juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif (Neli, 2010).

Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Jika urutan basa 16S rRNA menunjukkan derajat kesamaan yang rendah antara dua taksa, deskripsi suatu takson baru dapat dilakukan tanpa hibridisasi DNA-DNA. Biasanya jika derajat kesamaan urutan basa gen 16S rRNA kurang dari 97% dapat dianggap sebagai spesies baru. Analisis gen 16S rRNA praktis untuk definisi spesies, karena molekul ini bersifat ubikuitus,

sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal untuk seluruh kelompok. Data urutan basa gen 16S rRNA memungkinkan digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang dapat menunjukkan nenek moyang dan hubungan kekerabatan organisme (Purwoko, 2007).

BAB V PENUTUP

A. Kesimpulan

1. Didapatkan Empat isolat bakteri penghasil inulinase dari rizosfer *D. hybrida*.
2. Empat isolat bakteri penghasil inulinase tergolong gram negatif dengan sel berbentuk basil. Namun memiliki bentuk koloni yang berbeda yaitu bakteri LK1 berbentuk tidak teratur dan tepi koloni tidak rata, bakteri LK2 berbentuk bulat dan tepi koloni rata, bakteri LK3 berbentuk akar dan tepi koloni bercabang seperti benang-benang halus dan bakteri LK4 berbentuk bulat dan tepi koloni rata. Karakteristik secara molekuler tidak bisa ditentukan karena ketidakberhasilan dalam proses amplifikasi gen 16S rRNA.

B. Saran

Berdasarkan penelitian dan pembahasan, perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil inulinase pada rizosfer Dahlia yang berbeda, perlu optimasi pada reaksi PCR untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang lebih baik dan pengukuran kualitas DNA sehingga dapat diketahui kemurnian DNA hasil isolasi bakteri penghasil inulinase dari rizosfer *D. hybrida*.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhdiya, A. (2003). "Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Termotabil". *Buletin Plasma Nutfah*. (Vol.9 No.2).
- Allais, J.J., Gladis H. L., Sadok K., dan Jacques C.B." Isolation and Characterizatiion of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity". *Applied and Environmental Microbiology*. (Vol.53 No.5).
- Allais, J.J., Sadok, K., Philippe, B., dan Christel, G., dan Jacques, C. B. (1986)."Isolation and Characterizatiion of Bacterial Strains with Inulinase Activity". *Applied and Environmental Microbiology*. (Vol.52 No.5).
- Ariningsih, R.I. (2009). Isolasi Streptomyces dari Rizosfer Family Poaceace yang Berpotensi Menghasilkan Antijamur Terhadap *Candida albicans*. *Skripsi tidak diterbitkan*. Fakultas Farmasi-Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Asrizal, A. (2006). "Kualitas dan Kuantitas DNA Hasil Isolasi dari Beberapa Jaringan yang Berbeda Untuk Bahan Dasar Analisis DNA Fingerprint". *Tugas Akhir tidak diterbitkan*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Negeri Padang.
- Bayu, E. S. (2005). "Pengendalian Gen Transkripsional". Program Studi Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian-Universitas Sumatera Utara.
- Campbell. (2002). *Biologi Edisi Kelima Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Castro, G.R., Baigori, M.D. dan Sineriz, F. (1995). "A Plate Technique for Screening Of Inulin Degrading Microorganism". *Journal Of Microbiological Methods* 22. Hal 51-56.
- Dwidjoseputro, D. (1985). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Surabaya: Djambatan.
- Ekmonsaurus. (2008). "Gambar Teori Pewarnaan Bakteri". http://ekmonsaurus.blogspot.com/2008_11_01_archive.html. Diunduh Tanggal 6 oktober 2010.
- Ekmonsaurus. (2010). "Morfologi Koloni Bakteri". <http://ekmonsaurus.blogspot.com/2009/05/pentingnya-penggambaran-morfologi>. Diunduh Tanggal 6 Oktober 2010.
- Faatih, M. (2009). "Isolasi dan Digesti DNA Kromosom". *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. (Vol. 10 No. 1).