

**IDENTIFIKASI MOLEKULER GEN 16S rRNA ISOLAT BAKTERI
MESOFILIK PENDENGGRADASI INULIN**

SKRIPSI

*Diajukan Kepada Tim Penguji Skripsi Jurusan Kimia
sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains*



Oleh:

**YOZA GUSTARIA NINGSIH
NIM.1201545**

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2016**

HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

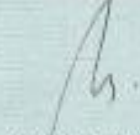
IDENTIFIKASI MOLEKULER GEN 16S rRNA ISOLAT BAKTERI
MESOFILIK PENDEGRADASI INULIN

Nama : Yoza Gustaria Ningsih
NIM : 1201545
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juli 2016

Disetujui oleh

Pembimbing I



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

Pembimbing II



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

HALAMAN PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Dinyatakan Lulus setelah dipertahankan didepan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Kimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Judul : Identifikasi Molekuler Gen 16s rRNA Isolat Bakteri
Mesofilik Pendegradasi Inulin
Nama : Yoza Gustaria Ningsih
NIM : 1201545
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juli 2016

Tim Penguji

	Nama
1. Ketua	: Dr. Minda Azhar, M.Si
2. Sekretaris	: Dra. Iryani, M.S
3. Anggota	: Drs. Iswendi, M.S
4. Anggota	: Dra. Suryelita, M.Si
5. Anggota	: Edi Nasra, S.Si, M.Si

Tanda Tangan



SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Yoza Gustaria Ningsih
TM/NIM : 2012/1201545
Tempat/Tgl Lahir : Lubuak Batingkok/ 06 Agustus 2016
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Alamat : Lubuak Batingkok, Kecamatan Harau, Kabupaten
lima Puluh Kota
No. HP/Telp : 081267137145
Judul Skripsi : Identifikasi Molekuler Gen 16S rRNA Isolat bakteri
Mesofilik Pendegradasi Inulin

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Karya tulis/skripsi ini adalah hasil karya saya dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik (sarjana) 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.
3. Pada karya tulis/skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain kecuali tertulis dengan jelas dicantumkan pada kepustakaan.
4. Karya tulis/skripsi ini sah apabila telah ditandatangani Asli oleh tim pembimbing dan tim penguji.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran di dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima **Sanksi Akademik** berupa pencabutan gelar akademik yang telah diperoleh karena karya tulis/skripsi ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Padang, Agustus 2016

..... membuat Pernyataan



Yoza Gustaria Ningsih
1201545

ABSTRAK

Yoza Gustaria Ningsih, 2016 : Identifikasi Molekuler Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Mesofilik Pendegradasi Inulin

Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan spesies dari isolat bakteri mesofilik pendegradasi inulin. Metode isolasi DNA kromosom bakteri dilakukan berdasarkan metode yang dimuat dalam *Wizard Genomic DNA purification Kit*. Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan metoda *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA bakteri mesofilik ditentukan berdasarkan metoda *dideoxy-Sanger*. DNA kromosom bakteri hasil isolasi diidentifikasi dengan elektroforesis DNA. Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA dibaca menggunakan program DNASTAR dan dianalisis menggunakan program BLASTn, Custal Omega dan Mega 6. Konsentrasi DNA hasil isolasi ditentukan dengan cara membandingkan dengan ketebalan pita DNA *marker 1 kb Ladder*. Konsentrasi DNA kromosom bakteri mesofilik RZ-02 diperkirakan 50 ng/μL. Konsentrasi amplikon diperkirakan 3 kali lipat dibandingkan dengan DNA *marker 1 kb Ladder* yaitu sekitar 150 ng/μL. Hasil Identifikasi menunjukkan isolat RZ-02 bakteri mesofilik termasuk kedalam kelompok genus *Spingobacterium multivorum*.

Kata Kunci : Bakteri *Mesofilik*, Gen 16S rRNA, *Spescies*, inulin

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, Rabb semesta alam yang senantiasa memberi kekuatan dan kesabaran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Identifikasi Molekuler Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Mesofilik Pendengradasi Inulin”**. Shalawat dan salam senantiasa tercurah untuk nabi akhir zaman, Nabi Muhammad SAW, sosok yang mulia, suri teladan dalam segala sisi kehidupan.

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, petunjuk, arahan, dan masukan yang berharga dari berbagai pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tulus kepada :

1. Ibu Dr. Minda Azhar, M.Si selaku Pembimbing 1 sekaligus Penasehat Akademik penulis.
2. Ibu Dra. Iryani, M.S selaku Pembimbing II.
3. Bapak Drs. Iswendi, M.S; Ibu Dra. Suryelita, M.Si dan Bapak Edi Nasra, S.Si, M.Si selaku dosen pembahas dan penguji skripsi jurusan kimia FMIPA UNP.
4. Seluruh staf pengajar dan teknisi jurusan kimia FMIPA UNP.
5. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementrian Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini.
6. Kedua Orang Tua penulis yang telah memberikan semangat serta dorongan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi penelitian ini.

7. Teman-teman Kimia angkatan 2012 yang telah memberikan masukan dan dorongan kepada penulis.

Dalam penulisan skripsi ini penulis telah melakukan hal yang terbaik dan demi kesempurnaan skripsi ini kedepannya , maka penulis mengharapkan masukan dan saran yang membangun dari Bapak dan Ibu dosen penguji. Atas masukan dan saran yang diberikan penulis haturkan terima kasih. Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi pembaca dan bagi penulis khususnya.

Padang, Juli 2016

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Identifikasi Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Rumusan Masalah	4
1.5 Tujuan Penelitian	5
1.6 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Karakteristik Bakteri Mesofilik	6
2.2 Inulinase dari Bakteri Mesofilik	8
2.3 Inulin	9
2.4 Gen 16S rRNA	11
2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	14
2.6 Sequencing DNA dengan metoda dideoxy-sanger	18
2.7 Bioinformatika	20
2.7.1 Program Basic Local Alignment Search Tool n (BLASTn)	21
2.7.2 Mega6	22

BAB III METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Jenis Penelitian	23
3.2 Objek Penelitian	23
3.3 Alat dan Bahan	23
3.3.1 Alat.....	23
3.3.2 Bahan	23
3.4 Prosedur Penelitian.....	24
3.4.1 Peremajaan Isolat Bakteri	24
3.4.2 Isolasi DNA Kromosom Bakteri.....	25
3.4.3 Elektroforesis DNA Kromosom Bakteri.....	26
3.4.4 Amplifikasi DNA dengan Metoda <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	27
3.4.5 Elektroforesis DNA hasil PCR	28
3.4.6 <i>Sequencing</i> gen 16S rRNA bakteri dengan metoda <i>dideoxy</i> –Sanger	28
3.4.7 Analisa urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Bakteri mesofilik hasil <i>sequencing</i>	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Isolasi Kromosom Bakteri dan Elektroforesis DNA	29
4.2 Amplifikasi Gen 16S rRNA Menggunakan Metode PCR.....	31
4.3 Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Mesofilik.....	33
4.4 Idenifikasi Molekuler Bakteri Mesofilik Pendegradasi Inulin	37
BAB V PENUTUP.....	40
5.1 Simpulan.....	40

5.2 Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Grafik suhu optimum dari mikroorganisme	7
Gambar 2. Aksi enzim inulinase pada inulin..	9
Gambar 3. Struktur kimia Inulin	10
Gambar 4. Struktur 16S rRNA dari <i>E.coli</i>	13
Gambar 5. Proses Tahapan PCR.	17
Gambar 6. Struktur DNA <i>double helix</i>	18
Gambar 7. <i>Sequencing</i> DNA dengan metode <i>dideoxy-Sanger</i>	20
Gambar 8. Elektroforegram DNA kromosom bakteri mesofilik	30
Gambar 9. Elektroforegram amplikon bakteri mesofilik	32
Gambar 10. Elektroforegram potongan gen 16S rRNA.....	33
Gambar 11. Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri	34
Gambar 12. Urutan basa nukleotida isolat bakteri mesofilik.....	35
Gambar 13. Urutan Nukleotida gen 16S rRNA	36
Gambar 14. Hasil BLASTn isolat bakteri mesofilik.....	37
Gambar 15. Pohon filogenetik bakteri mesofilik.	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Media Padat	44
Lampiran 2. Peremajaan Isolat Bakteri.....	45
Lampiran 3. Isolasi Kromosom Bakteri	46
Lampiran 4. Elektroforesis DNA	50
Lampiran 5. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan <i>Metode Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	51
Lampiran 6. Hasil Penjajaran (aligment) isolat bakteri mesofilik dengan spesies yang ada pada GenBank	52

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Enzim memiliki peran yang sangat menguntungkan dalam berbagai bidang kehidupan manusia. Sumber enzim dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Mikroorganisme merupakan sumber penghasil enzim yang terbaik, karena dapat menghasilkan enzim dalam jumlah banyak dan waktu yang cepat. Salah satu enzim yang dapat diperoleh dari mikroorganisme adalah enzim inulinase. Enzim inulinase salah satu enzim yang dimanfaatkan dalam industri pangan untuk pembuatan sirup.

Enzim inulinase merupakan biokatalis pada reaksi hidrolisis inulin untuk menghasilkan fructooligosakarida (FOS) dan fruktosa (Kochhar, Gupta, & Kaur, 1999). Fruktosa juga dapat dihasilkan dari hidrolisis pati, tetapi hidrolisis inulin lebih menguntungkan karena hanya memerlukan satu jenis enzim yaitu enzim inulinase, sedangkan hidrolisis pati membutuhkan enzim pemutus cabang yaitu enzim glukoamylase dan enzim invertase. Hidrolisis inulin menghasilkan kurang lebih 98% fruktosa (Zittan & Denmark, 1981).

Inulinase dapat diperoleh dalam jumlah banyak dengan mengisolasi mikroorganisme. Salah satu jenis mikroorganisme penghasil enzim inulinase adalah bakteri. Bakteri dapat dibedakan berdasarkan suhu pertumbuhannya yaitu bakteri *psychrophiles*, *mesophiles*, *thermophiles*, *hyperthermophiles*. Bakteri mesofilik merupakan salah satu jenis bakteri dengan suhu pertumbuhan optimumnya adalah 39°C (Madigan *et al*, 2012). Bakteri

mesofilik mudah hidup dan berkembang di daerah tropis. Bakteri mesofilik dapat menghasilkan enzim inulinase. Bakteri ini dapat diisolasi dari *rhizosphere* umbi dahlia (Lunggani et al., 2010). Bakteri pendegradasi inulin telah *discreening* dari *rhizosphere* umbi dahlia yang tumbuh di daerah Padang Panjang, tetapi bakteri tersebut belum diidentifikasi dan belum diketahui kelompok spesiesnya. Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan teknik genotipe dan teknik fenotipe. Teknik genotipe dilakukan berdasarkan materi genotip dan teknik fenotipe dilakukan berdasarkan morfologi dan uji biokimia organisme. Identifikasi dengan teknik fenotipe memerlukan waktu yang lama untuk dapat mengetahui kelompok spesies bakteri.

Identifikasi dengan teknik genotip lebih banyak dipilih karena dapat mengidentifikasi bakteri lebih spesifik dan tidak memerlukan waktu yang lama. Identifikasi secara genotipe dilakukan dengan cara mengisolasi kromosom DNA dari isolat bakteri. Molekul 16S rRNA adalah molekul yang sering digunakan sebagai penanda molekuler untuk penentuan kelompok spesies dari bakteri secara genotip. Ada beberapa alasan penggunaan gen 16S rRNA dalam mengidentifikasi spesies bakteri yaitu: (1) gen 16S rRNA adalah gen yang bersifat lestari yang ditemukan hampir pada seluruh mikroorganisme, (2) ukuran gen 16S rRNA cukup besar yaitunya 1500 pb yang mendukung untuk kajian informatika (Michael & Abbott, 2007). Dengan mengidentifikasi gen 16S rRNA bisa ditentukan kelompok spesies bakteri dan menentukan hubungan dengan spesies bakteri yang telah diidentifikasi sebelumnya. Ukuran gen 16S rRNA merupakan ukuran yang

memungkinkan untuk proses perbanyakan DNA atau yang biasa dikenal dengan amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA dilakukan secara PCR (*Polymerase Chain Reaction*), pada proses PCR terjadi proses pemutusan ikatan hidrogen antara basa nukleotida satu dengan basa nukleotida lainnya pada *double helix* menjadi dua untai DNA yang komplementer. Proses amplifikasi menggunakan beberapa primer yaitu BactF1 dan UniB1. Teknik PCR termasuk kedalam perbanyakan DNA secara *in vitro* yang mensintesis molekul DNA dalam jumlah yang banyak (Hongbao, 2005). Gen 16S rRNA yang telah diamplifikasi dapat ditentukan urutan basa nukleotidanya. Urutan basa nukleotida yang didapatkan akan analisis dengan menggunakan program komputasi DNASTAR.

Kesamaan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri mesofilik dengan gen 16S rRNA bakteri lainnya yang telah teridentifikasi, dapat diketahui menggunakan program yaitu *Basic Local Alignment Search Tool* (Blastn). Apabila kesamaan yang didapatkan kurang dari 97% maka dapat dikatakan bakteri yang diisolasi merupakan kelompok bakteri spesies baru (Stackebrandt & Goebel, 2015). Untuk itu peneliti merasa perlu melakukan identifikasi bakteri hasil *screening* yang didapatkan dari *rhizosfere* umbi dahlia yang tumbuh di Padang Panjang, agar dapat diketahui bakteri mesofilik pendegradasi inulin merupakan bakteri dengan spesies baru atau masuk kedalam spesies yang telah diketahui sebelumnya, dan untuk menentukan hubungan filogenetiknya dengan bakteri yang telah diketahui sebelumnya yang telah ada pada GenBank.

1.2. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang ada, maka dapat diidentifikasi beberapa masalah sebagai berikut:

- a. Identifikasi jenis bakteri dilakukan secara fenotip dan genotipe.
- b. Identifikasi genomik dilakukan pada DNA total dan urutan basa nukleotida.
- c. Mengidentifikasi isolat bakteri mesofilik dengan Gen 16S rRNA dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode *Maxam-Gilbert* dan metode *dideoxy-Sanger*.
- d. Primer yang dapat digunakan dalam proses amplifikasi DNA mempunyai banyak jenis.

1.3. Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini adalah

- a. Proses amplifikasi gen 16S rRNA bakteri mesofilik menggunakan primer BactF1 dan UniB1.
- b. Penggunaan metoda *dideoxy-Sanger* untuk sekuensing DNA .
- c. Penggunaan program Blastn untuk penentuan kelompok spesies bakteri mesofilik dengan melihat perbandingan urutan segmen gen 16S rRNA.

1.4. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang ada maka penulis melakukan rumusan masalah yaitu penggunaan gen 16S rRNA dalam menentukan kelompok spesies isolat bakteri mesofilik pendegradasi inulin.

1.5. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah dapat menentukan spesies bakteri mesofilik pendegradasi inulin berdasarkan urutan sekuen gen 16S rRNA hasil sekuensing DNA.

1.6. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui spesies bakteri pendegradasi inulin.
- b. Memberikan informasi kepada pembaca tentang gen 16S rRNA sebagai penanda molekular untuk penentuan spesies dari isolat bakteri mesofilik.
- c. Memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu dan teknologi tentang 16S rRNA sebagai penentu spesies bakteri.
- d. Dapat dijadikan sebagai sumber ide dan referensi untuk penelitian selanjutnya.

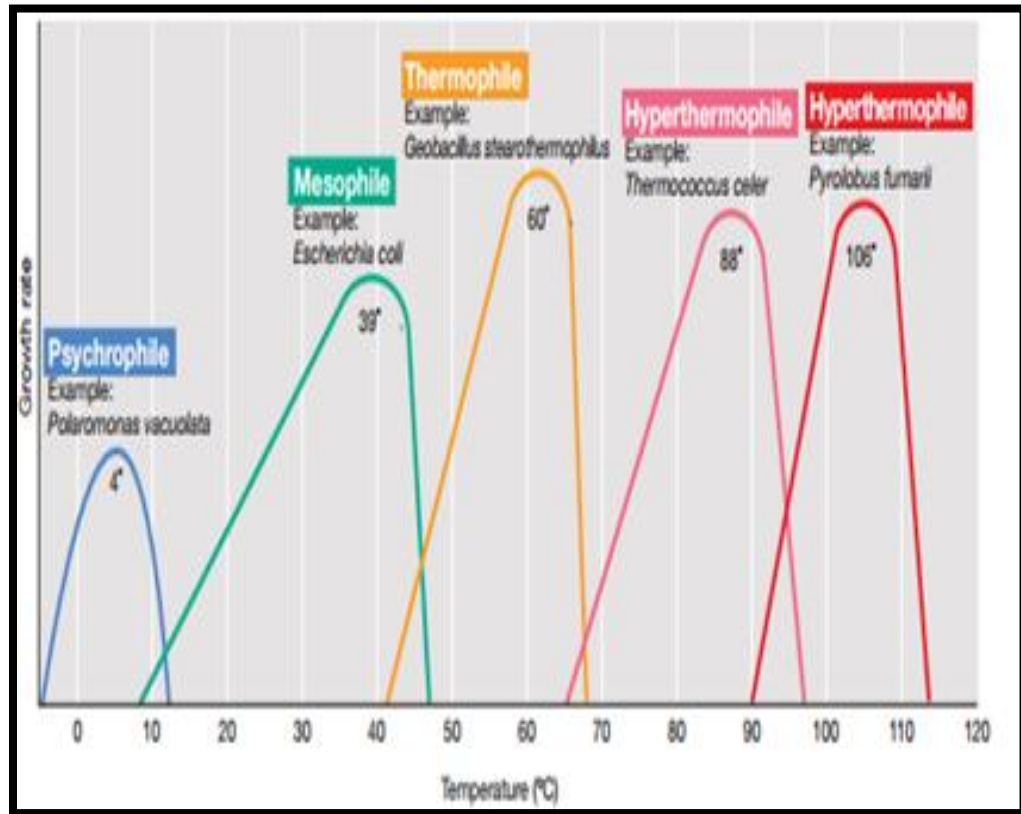
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Bakteri Mesofilik

Lingkungan tempat mikroorganisme hidup memberikan karakteristik tersendiri untuk membedakan mikroorganisme satu dan yang lainnya. Keadaan kimia dan fisik lingkungan memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme. Ada 4 faktor lingkungan yang mempengaruhi dan mengontrol pertumbuhan dari mikroorganisme yaitunya: suhu, pH, ketersediaan air dan oksigen. Diantara faktor yang mempengaruhi tersebut, suhu merupakan salah satu pengaruh yang sangat penting terhadap kelangsungan hidup mikroorganisme. Setiap mikroorganisme memiliki suhu pertumbuhan maksimum dan minimum yang bervariasi (Madigan *et al.*, 2012).

Mikroorganisme diklasifikasikan kedalam 3 domain yaitu: *bacteria*, *archaea*, dan *eukarya* (Mckee,Trudy dan Mckee, James R, 2003:5). Bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak memiliki membran inti sel. Bakteri berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya dapat dibedakan menjadi 4 kelompok yaitu: *psychrophiles*, *mesophiles*, *thermophiles*, *hyperthermophiles* (Madigan *et al.*, 2012). Setiap kelompok bakteri memiliki suhu optimum yang berbeda-beda. Ada kelompok bakteri yang mampu bertahan pada suhu yang ekstrim dan ada beberapa bakteri hanya mampu bertahan pada suhu sedang. Untuk perbedaan suhu optimum dari keempat jenis kelompok bakteri tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik suhu optimum dari mikroorganisme.(Madigan et al., 2012)

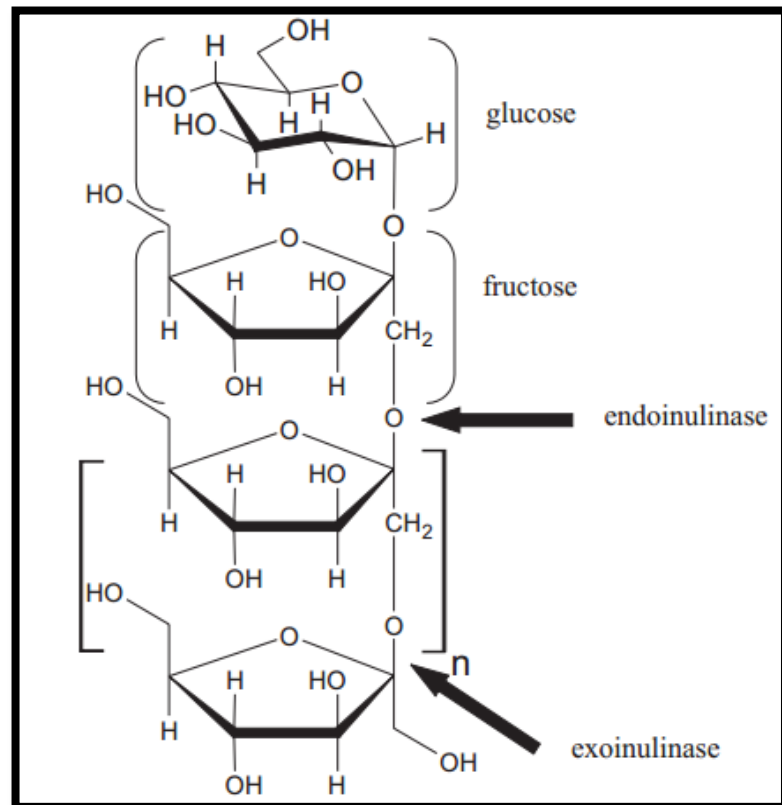
Dari Gambar 1 dapat diketahui bahwa suhu optimum pertumbuhan bakteri mesofilik adalah 39°C. Bakteri mesofilik banyak tersebar di alam, dan umumnya bakteri mesofilik dapat ditemukan pada daerah tropis. Contoh bakteri yang termasuk ke dalam kelompok mesofilik adalah *Escherichia coli*. Suhu optimum dari bakteri *Escherichia coli* mendekati 39°C, dan suhu minimum bakteri ini untuk hidup adalah 8°C, sementara untuk suhu maksimalnya adalah 48°C (Madigan et al., 2012). Bakteri mesofilik dapat ditemukan di rhizosfere umbi dahlia (Pakpahan et al, 2013). *Rhizosfere*

merupakan tanah yang menempel disekitar akar tumbuhan (Wasaki,j. *et al*, 2005).

2.2 Inulinase dari Bakteri Mesofilik

Inulinase dapat diisolasi dari tumbuhan dan mikroorganisme. Enzim inulinase dalam jumlah banyak dapat diperoleh dari mikroorganisme, karena budidayanya lebih mudah. Salah satu mikroorganisme penghasil enzim inulinase adalah bakteri mesofilik. Enzim Inulinase adalah biokatalis pada reaksi hidrolisis inulin menghasilkan FOS (fructooligosakarida) dan fruktosa. FOS dihasilkan dari pemutusan β -2,1, glikosida pada bagian internal secara acak dari inulin, sementara fruktosa dihasilkan dari pemutusan β -2,1, glikosida pada ujung non pereduksi secara berurutan (Singh & Singh, 2010)

Berdasarkan aksi enzim inulinase dalam memutus ikatan glikosida, aktivitas enzim inulinase ini dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu: eksoinulinase dan endoinulinase. Aksi enzim inulinase dalam menghidrolisis inulin akan membedakan produk utama. Aksi eksoinulinase menghasilkan fruktosa sebagai produk utama, sementara aksi enzim endoinulinase akan menghasilkan fruktooligosakarida (FOS) sebagai produk utama. Aksi enzim inulinase pada inulin dapat dilihat pada Gambar 2.



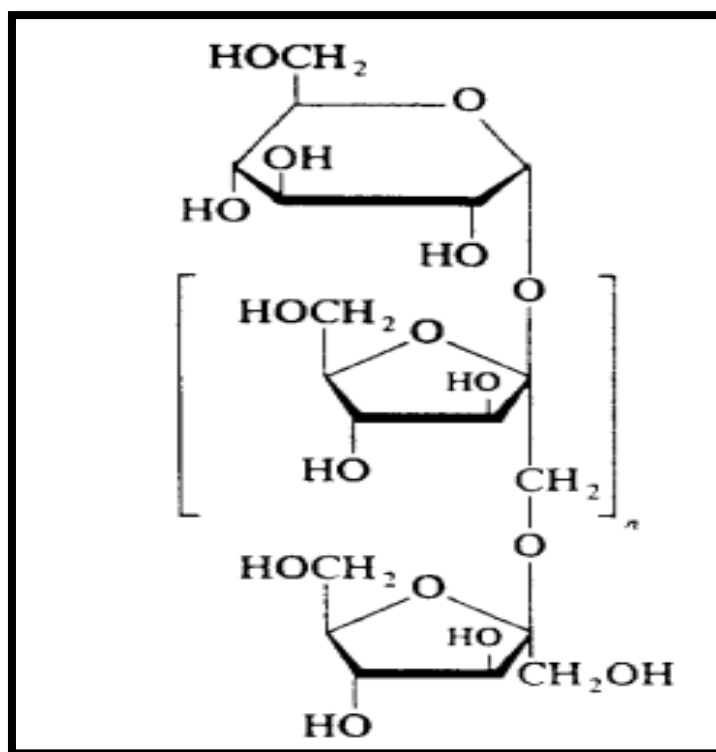
Gambar 2. Aksi enzim inulinase pada inulin (Singh & Singh, 2010).

2.3 Inulin

Inulin merupakan polimer karbohidrat yang monomernya fruktosa dan pada tiap ujung pereduksi untai polimer inulin terdapat glukosa. Monomer-monomer fruktosa pada inulin dihubungkan ikatan β -2,1 fruktofuranosida. Monomer fruktosa mempunyai derajat polimerisasi (DP) yang berbeda tergantung pada iklim dan kondisi pertumbuhan dari sumber inulin didapatkan (Gavrailov & Viara, 2014). Derajat polimerisasi dapat diartikan sebagai jumlah unit monomer dalam satu rantai polimer. Polimer inulin dapat ditulis GF_n yaitu fruktan yang mengikat glukosa pada tiap ujung pereduksi

atau Fn yaitu fruktan tanpa glukosa pada ujung pereduksinya. Simbol n pada rumus menunjukkan derajat polimerisasi.

Inulin memiliki kandungan D-fruktosa yang cukup tinggi, lebih kurang 75% oleh karena itu inulin dijadikan sebagai bahan baku pembuatan sirup fruktosa yang biasanya dikonsumsi oleh penderita penyakit diabetes (Zhengyu,2004). Inulin banyak terdapat di alam dan mempunyai manfaat yang besar. Sumber inulin di alam ditemukan dalam akar dan umbi-umbian dari berbagai macam tanaman, misalnya Yerusalem artichoke, Dahlia, Chicory dan lain sebagainya. Struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kimia Inulin (Franck & Leenheer, 2005)

Reaksi hidrolisis inulin untuk menghasilkan fruktosa yang tinggi, akan di katalis oleh enzim inulinase (Kochhar et al., 1999). Inulinase

diklasifikasikan kedalam endoinulinase (2,1- β -D fructan fructanohidrolase - EC.3.2.1.7) yang bertindak sebagai penghubung untai dalam inulin untuk melepaskan oligosakarida sebagai produk akhir. Aktivitas exo inulinase (β -D fructan fructanohidrolase- EC.3.2.1.80) akan menghasilkan fruktosa sebagai produk akhir.

Inulin mempunyai kelarutan yang baik pada temperatur tinggi (air panas) (Chi et al., 2011). Inulinase berbentuk serbuk putih dan akan sukar larut dalam air dingin dan pelarut organik seperti etanol (Bergner, 2004). Inulin merupakan salah satu senyawa yang termasuk kedalam kelompok prebiotik, yang akan membantu pertumbuhan bakteri baik di usus manusia (Pandiyan et al, 2012). Penambahan prebiotik inulin kedalam pembuatan yoghurt dari susu skim merupakan salah satu manfaat inulin sebagai prebiotik (Minda, 2006).

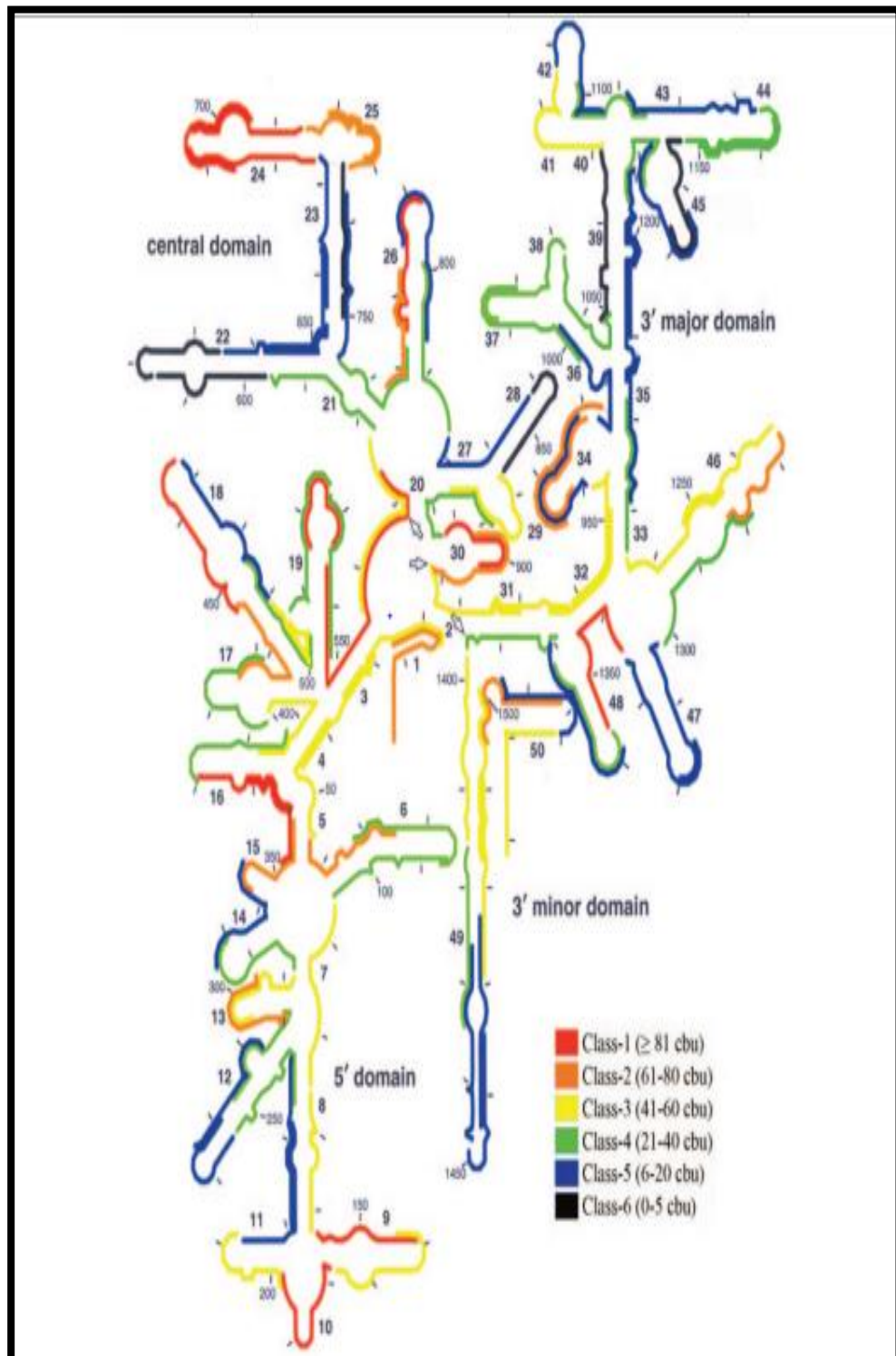
2.4 Gen 16S rRNA

Gen merupakan segmen DNA yang mengkode molekul mRNA, tRNA dan rRNA. Gen pengkode rRNA merupakan gen yang menarik untuk diidentifikasi dalam menentukan jenis dan spesies dari suatu bakteri. Perbandingan urutan basa gen rRNA merupakan teknik yang paling baik untuk menentukan hubungan filogenetik dan evolusi diantara bakteri, *archaebacteria* dan organisme eukariotik (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991). Molekul ribosomal RNA yang terdapat pada mikroorganisme prokaryota terdiri dari 3 jenis yaitu: 5S rRNA, 23S rRNA dan 16S rRNA.

Diantara ketiga ribosomal tersebut, gen 16S rRNA paling baik digunakan untuk mengidentifikasi kelompok dan jenis bakteri. Gen 16S rRNA

merupakan molekul penanda filogenetik yang sangat penting bagi setiap mikroorganisme yang ada di bumi, karena gen 16S rRNA ini tersebar secara menyeluruh pada mikroorganisme (Woese, Kandler, & Wheelis, 1990). Identifikasi Gen 16S rRNA dapat memberikan gambaran hubungan kekerabatan dari spesies bakteri yang belum teridentifikasi dengan bakteri yang telah teridentifikasi jenis dan spesiesnya.

Gen 16S rRNA memiliki daerah *conserved* dan *variable* yang terdiri dari susunan sekuens 16S rRNA. Daerah *conserved* adalah daerah yang lestari pada mikroorganisme, sementara *variable* adalah daerah yang bervariasi yang membedakan gen mikroorganisme satu dan lainnya (Baker, 2003). Keunggulan Gen 16S rRNA dibandingkan beberapa jenis ribosomal RNA yang terdapat pada mikroorganisme adalah sebagai berikut: 1. Gen 16S rRNA merupakan gen yang paling baik untuk diidentifikasi, guna untuk mengetahui spesies dari suatu mikroorganisme yang ditemukan, diantaranya adalah molekul ini bersifat ubiquitous dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. 2. Molekul ini juga dapat berubah berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat dijadikan sebagai kronometer evolusi yang baik. 3. Kesamaan urutan basa 16S rRNA yang baru diidentifikasi kurang dari 97 % dari bakteri yang telah teridentifikasi maka bakteri tersebut dapat digolongkan kedalam spesies baru (Stackebrandt & Goebel, 2015). Struktur dari gen 16S rRNA dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur 16S rRNA dari *E.coli* (Stiegler et al., 1981).

Hasil analisis urutan basa nukleotida dari gen 16S rRNA bakteri dapat menunjukkan hubungan kekerabatan suatu organisme yang ditemukan dengan mikroorganisme lainnya, sehingga dapat diketahui nenek moyang dan melihat hubungan kekerabatan yang paling mendekati suatu mikroorganisme. Apabila terjadi mutasi atau kerusakan pada gen 16S rRNA maka akan mempengaruhi kerentanan terhadap mikroorganisme, oleh karena itu gen 16S rRNA dapat membedakan resistensi fenotip untuk agen anti mikroba (Pfister, R, 1999). Untuk itu gen 16S rRNA juga dapat digunakan untuk pengembangan dibidang farmasi, khususnya perkembangan dalam penciptaan obat-obatan untuk mengobati penyakit tertentu yang disebabkan oleh virus dan bakteri.

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Perkembangan teknologi saat ini sangat berpengaruh terhadap perkembangan ilmu pengetahuan. Bioteknologi merupakan salah satu bidang pengetahuan yang sudah mengalami perkembangan yang cukup pesat, sehingga banyak ditemukan berbagai metoda yang akan memudahkan pekerjaan maupun penelitian yang dilakukan manusia. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknologi baru yang ditemukan untuk memperbanyak DNA dari mikroorganisme secara *in vitro* yang dilakukan dilaboratorium. DNA merupakan bagian yang terpenting dari sebuah sel karena mengandung informasi genetik dari makhluk hidup.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik yang dilakukan untuk memisahkan DNA *double helix* menjadi dua untai DNA yang

komplementer. Teknik PCR termasuk kedalam teknik replikasi DNA secara *in vitro* yang mensintesis molekul DNA dalam jumlah yang banyak dan waktu yang cepat. PCR dalam kerjanya menggunakan pompa peltier yang akan menyebabkan DNA dalam kondisi panas dan cepat kembali dingin. PCR merupakan teknik yang diciptakan pada tahun 1985 oleh Kary Mullis (Hongbao, 2005).

Teknik PCR dapat digunakan untuk mempermudah memperbanyak DNA dalam jumlah yang banyak dan cepat. Teknik PCR menggunakan sepasang DNA primer (sekitar 20 pb masing-masing). Komponen yang dibutuhkan dalam teknik PCR adalah:

1. Template DNA, yang berisi fragmen DNA target.
2. Dua untai DNA primer yang akan menentukan posisi awal dan ujung daerah yang akan diperkuat.
3. *Taq* Polimerase (Polymerase DNA thermal) yang akan mensintesis DNA yang untuk amplifikasi dan dapat bertahan pada temperatur tinggi.
4. Empat deoksinukleotida-trifosfat (dNTP, yaitu dATP, dTTP, dGTP, dCTP) yang berasal dari DNA polimerase yang berguna untuk membangun molekul DNA baru.
5. Buffer yang berguna untuk menyediakan lingkungan kimia yang cocok untuk amplifikasi DNA.
6. Mesin yang digunakan dalam PCR yaitu mesin yang dapat memanaskan dan mendinginkan tabung reaksi dalam proses memperbanyak DNA (Hongbao, 2005).

Teknik PCR sangat membantu dalam berbagai aspek keilmuan, tidak hanya dalam bidang biologi molekular. PCR juga dapat bermanfaat dalam bidang kedokteran atau kesehatan. PCR dapat membantu penyelidikan dan mendiagnosis penyakit dalam waktu yang cepat dan dapat mendiagnosis banyak penyakit (T Faoud & Stellato, 2008). Dalam teknik PCR terdapat tiga tahapan utama yaitunya:

1. Denaturasi Template

Pada tahap ini DNA akan didenaturasi pada suhu tinggi yaitu sekitar 90-97°C. Struktur awal dari DNA adalah *double stranded* yang terdiri dari untai ganda, dengan proses denaturasi akan menjadikan DNA menjadi untai tunggal.

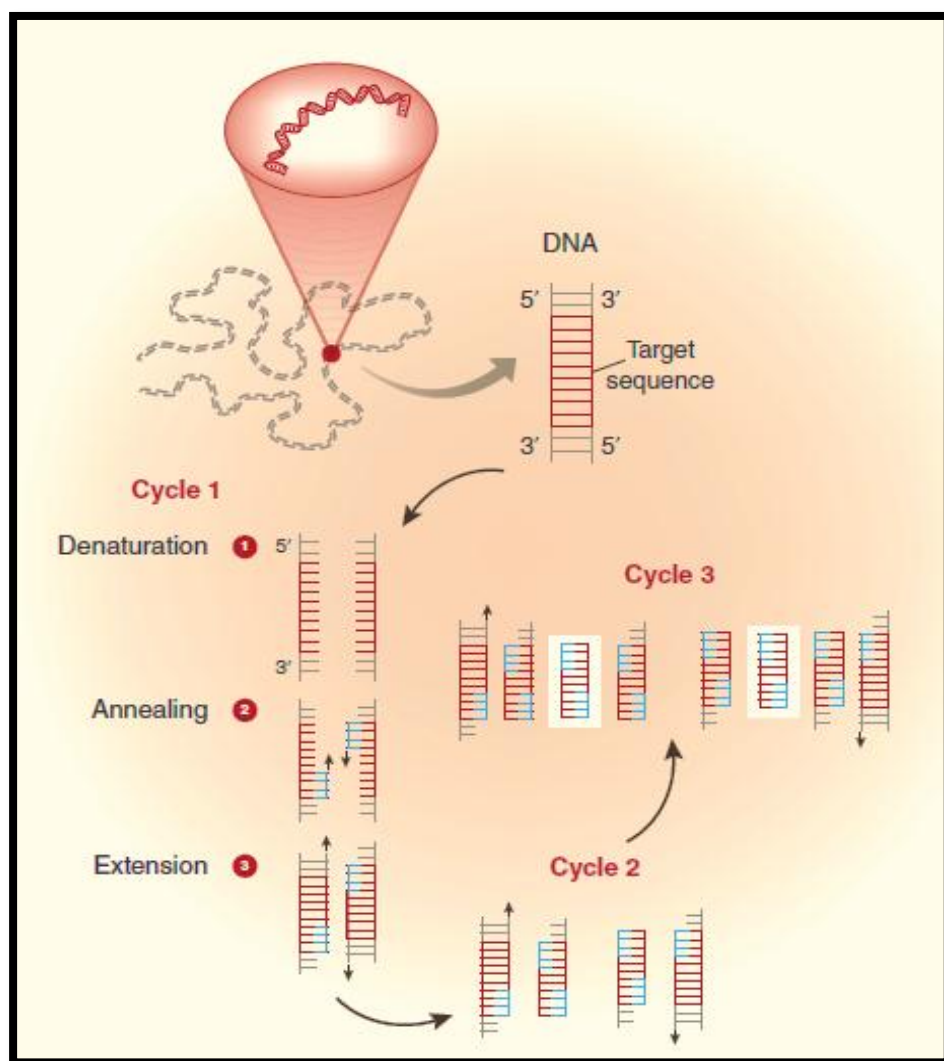
2. *Annealing*

Merupakan tahap penempelan primer pada DNA template yang telah didenaturasi. Temperatur yang digunakan pada proses *annealing* bervariasi, urutan DNA saat di amplifikasi merupakan faktor yang menentukan berapa besar temperatur yang akan digunakan saat proses *annealing*. Biasanya kisaran temperaturnya adalah 36- 70°C.

3. Pemanjangan Primer (ekstention)

Pada ekstention akan membuat salinan untai DNA komplementer. Pada proses perpanjangan primer enzim yang terlibat adalah enzim polimerase yang bisa disebut "*Taq Polymerase*". Lama proses perpanjangan tergantung pada ukuran DNA yang akan di amplifikasi.

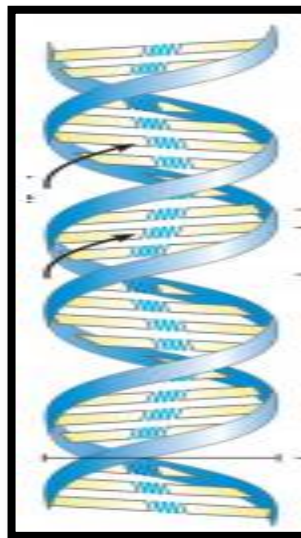
Pada akhir proses PCR akan menghasilkan duplikasi DNA asli dengan masing-masing mengandung satu untai DNA tua dan satu untai DNA baru (Ochman, Gerber, & Hart, 1988). Tahapan-tahapan PCR akan terjadi secara terus-menerus berjalan sampai didapatkan molekul DNA baru, seperti ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Proses Tahapan PCR (Garibyan & Avashia, 2013).

2.6 Sequencing DNA dengan metoda dideoxy-sanger

DNA adalah molekul yang mengandung informasi genetik makhluk hidup. DNA merupakan polimer yang terdiri dari beberapa unit nukleotida yang dihubungkan oleh ikatan fosfodiester. Nukleotida adalah monomer dari DNA yang terusun atas basa nitrogen, gula ribosa, dan phosphat (McKee dan McKee, 2003;563-564). DNA terdiri dari dua untai polynucleotida yang membentuk *double helix*. Penentuan urutan basa nukleotida dari DNA merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk analisa gen. Nukleotida satu dan nukleotida lainnya dibedakan oleh basa nukleotidanya. Struktur *Double helix* DNA dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur DNA *double helix* (Nelson & Cox, 1973)

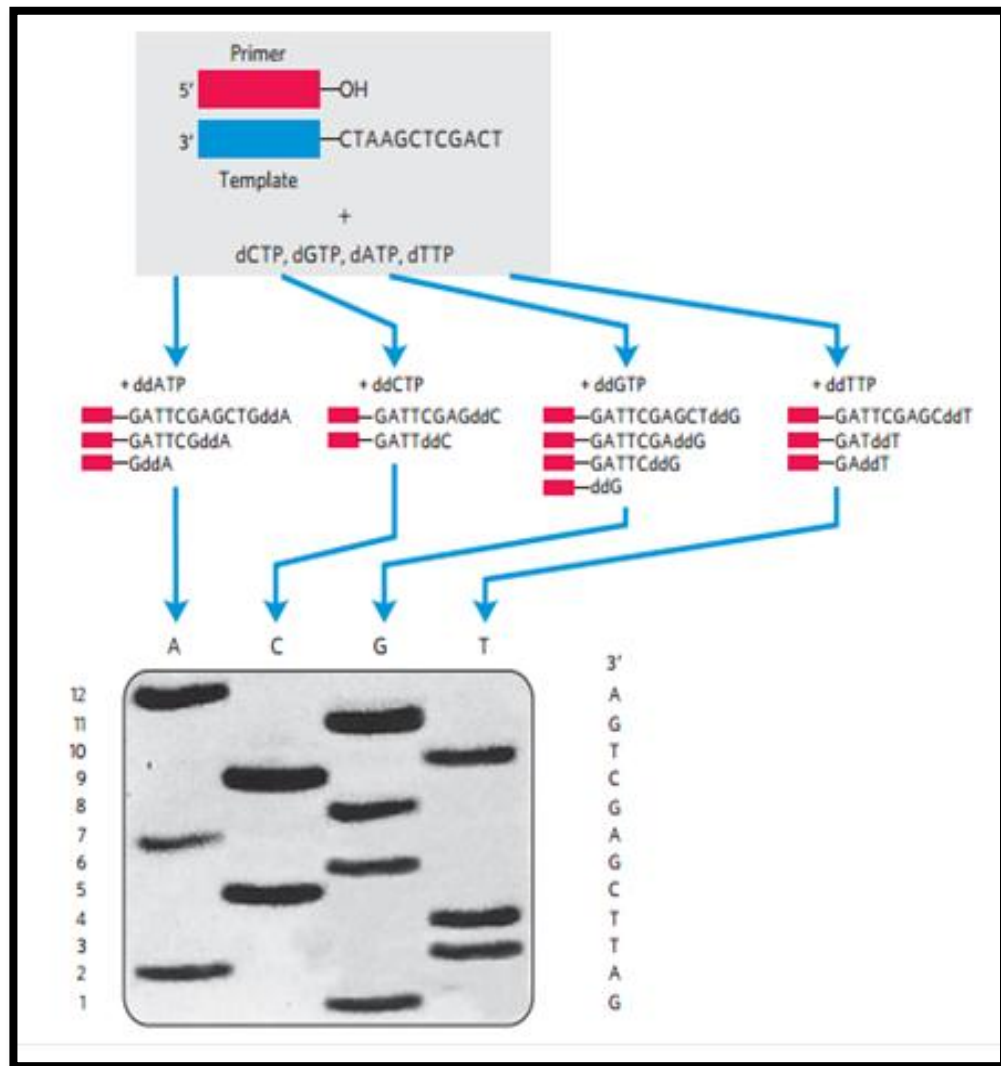
Proses penentuan urutan tepat nukleotida disebut dengan sekuensing DNA. Tujuan dari sekuensing DNA adalah untuk mentukan urutan oligonukleotida dari fragmen DNA agar dapat mengidentifikasi suatu spesies

dari mikroorganisme. Metoda yang paling sering digunakan untuk menentukan urutan DNA adalah metode *dideoxy*-Sanger. Metode sanger lebih sederhana dan mampu mengurutkan DNA dalam jumlah banyak dan cepat (Nelson & Cox, 1973).

Prinsip metoda *dideoxy*-Sanger adalah perpanjangan primer yang menempel pada templat yang akan disekuensing. Primer merupakan oligonukleotida rantai pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang spesifik terhadap template (Nelson & Cox, 1973). Template adalah untai tunggal DNA yang akan ditentukan urutan nukleotidanya pada proses *sequencing*. *Sequencing* DNA pada metode *dideoxy*-Sanger menggunakan beberapa reagen yaitu primer, DNA template, DNA polimerase, dNTP (dGTP, dATP, dCTP, dGTP) dan ddNTP (ddGTP, ddATP, ddCTP, ddGTP) (Munshi, 2012). Nukleotida yang digunakan pada reaksi pemanjangan adalah deoksinukleosida trifospat (dNTP). Penambahan ddNTP menyebabkan terjadinya reaksi terminasi. Pada ddNTP tidak terdapat gugus hidroksil pada posisi 3' sehingga, tidak terbentuk ikatan fosfodiester dengan nukleotida selanjutnya akibatnya reaksi pemanjangan primer berhenti.

Hasil dari proses *sequencing* DNA ini adalah urutan oligonukleotida hasil dari perpanjangan nukleotida setelah primer sampai pada nukleotida terminasi. Deratan oligonukleotida yang dihasilkan adalah A,C,G dan T. Urutan oligonukleotida yang diperoleh mempunyai panjang yang berbeda. Urutan oligonukleotida yang didapatkan pada proses *sequencing* DNA dapat

dilihat dan ditentukan dengan program DNASTAR. Proses *sequencing* DNA dengan metode *dideoxy*-Sanger terdapat pada Gambar 7.



Gambar 7 *Sequencing* DNA dengan metode *dideoxy*-Sanger (Nelson & Cox, 1973)

2.7 Bioinformatika

Kemajuan teknologi menciptakan program-program yang dapat membantu dalam mengidentifikasi spesies dan jenis dari mikroorganisme seperti bakteri. Identifikasi makhluk hidup dapat dilakukan dengan identifikasi

molekuler, yang berarti tidak membutuhkan waktu yang lama untuk dapat mengetahui informasi genetik dari bakteri. Bioinformatika merupakan ilmu gabungan antara ilmu biologi dan ilmu komputer. Tujuan utama dari bioinformatika adalah untuk meningkatkan pemahaman proses biologis (Raza, 2012).

Bioinformatika dapat digunakan untuk analisa sekuen gen 16S rRNA dengan menggunakan program *Seqman* DNASTAR, program *Basic Local Alignment Search Tool* atau BLAST dan *Molecular Evolution Genetic Analysis* 6 (MEGA6). Program DNASTAR mempunyai prinsip kerja menterjemahkan dan menganalisis hasil dari data *sequencing* yang berupa seperti grafik atau *electropherogram* menjadi urutan-urutan basa nukleotida.

2.7.1 Program Basic Local Alignment Search Tool n (BLASTn)

Program *Basic Local Alignment Search Tool n* atau BLASTn umumnya disebut sebagai data base pencarian, dikembangkan dan dikelola oleh *National Center for Biotechnology Information at The National Library of Medicine in Washington, DC*. Program ini dapat diakses melalui situs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) merupakan program yang digunakan untuk analisis pensejajaran. Urutan sekuen hasil sekuensing DNA yang diperoleh dari hasil penelitian di laboratorium dapat dianalisa pensejajaran dengan data sekuen serupa yang telah dipublikasikan sebelumnya di GeneBank. Analisis pensejajaran dapat digunakan untuk membandingkan dua sekuen atau lebih.

2.7.2 Mega6

Molecular Evolution Genetic Analysis, atau yang biasa disingkat dengan MEGA, adalah sebuah program yang dikembangkan untuk analisis komparatif dari urutan DNA dan protein yang digunakan untuk menyimpulkan pola evolusi molekuler gen, genom, dan spesies dari waktu ke waktu (Tamura, *et al*, 2013). Saat ini, versi terbaru MEGA adalah MEGA versi 6. Program ini cukup banyak diminati oleh para peneliti di tingkat internasional sebab dapat didownload secara gratis dan terus di-update (diperbaharui) oleh para pembuatnya. MEGA6 sangat efisien baik dari segi kinerja dan memori yang dibutuhkan. MEGA6 hanya memerlukan waktu 43 menit dan memori 1 GB untuk menyelaraskan sekuen nukleotida dari 765 pb dan 2.000 pb.

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Berdasarkan identifikasi molekuler gen 16S rRNA bakteri mesofilik pendegradasi inulin dapat disimpulkan isolat bakteri mesofilik tergolong kedalam kelompok spesies *Spingobacterium multivorum*.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan agar peneliti dalam bidang ini memperhatikan hal-hal berikut:

- a. Lingkungan tempat peremajaan kultur bakteri harus dalam kondisi bersih untuk menghindari kontaminasi.
- b. Ketelitian dalam menggunakan pipet mikro harus diperhatikan, untuk menghindari kesalahan dalam penelitian.
- c. Peneliti berikutnya melakukan penelitian mengenai cloning pada gen 16S rRNA isolat bakteri mesofilik pendegradasi inulin untuk mendapatkan gen 16S rRNA yang utuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Azhar, Minda & Iryani (2006). Pengaruh Penambahan Inulin Pada Karakteristik Set Yoghurt dari Susu Skim. *Laporan Penelitian UNP*. Padang
- Chi, Z., Zhang, T., Cao, T., Liu, X., Cui, W., & Zhao, C. (2011). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102(6), 4295–4303. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.086>
- Case, Rebecca J *et al.* (2006). Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied And environmental microbiology*, p 278-288. <http://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>.
- Castro, G.R., Ferrero, Baigori M.D. and Sineriz, F. 1995. " A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms". *Journal of microbiological methods*. 22, 51-56
- Demerdash, Hassan A,M,El. (2012). "A Simple and Inexpensive Procedure for Chromosomal DNA Extraction from *Streptococcus thermophilus* Strains". *Middle-East Journal of Scientific Research*. 11, 1, 13-18.
- Franck, A., & Leenheer, I. L. De. (2005). Inulin, 439–448.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e6–4. <http://doi.org/10.1038/jid.2013>.
- Gavrilov, S., & Viara, I. (2014). Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria. *Journal BioSci. Biotech*, 75–82.
- G.C. Baker, J.S. (2003). Riview and re-analysis of domain-specific 16S primers . *Journal of Microbiological methods*, 541-555.
- Hongbao, M. (2005). Development Application of Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Aamreikan Science*, 3.
- KAPA. 2016. www.kapabiosystems.com. Diakses 12 Januari 2016.
- Kochhar, A., Gupta, A. K., & Kaur, N. (1999). Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 554(July 1998), 549–554.