

BAB II

Tinjauan Pustaka

2.1 Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah bakteri yang terdapat dalam jaringan tanaman sehat yang tidak menimbulkan gejala penyakit tanaman inang. Bakteri endofit hidup atau bersimbiosis mutualisme pada jaringan tanaman tanpa merugikan sel inang. Bakteri endofit dapat hidup di luar ataupun di dalam jaringan akar, daun dan batang tanaman. Bakteri endofit dapat hidup di dalam jaringan tanaman selama siklus hidup atau pada fase tertentu dari siklus hidupnya (Vionita *et al.*, 2015). Mekanisme kerja bakteri endofit sebagai agens biokontrol dapat melalui beberapa mekanisme, diantaranya adalah dengan menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antimikroba. Bakteri masuk pada proses akar-akar sekunder, stomata, perkecambahan biji, atau melalui kerusakan yang terjadi pada daun. Bakteri yang ada di dalam jaringan tanaman berada di ruang antar sel, di dalam sel, atau dalam jaringan pembuluh (Resti *et al.*, 2013).

Endofit ditemukan di sebagian besar ekosistem yang mengurangi stresor biotik dan abiotik pada tanaman dengan menstimulasi respons imun, mengecualikan patogen tanaman melalui persaingan khusus, dan berpartisipasi dalam aktivitas antioksidan dan metabolisme fenilpropanoid, yang aktivasinya menghasilkan pertahanan tanaman, dukungan struktural, dan kelangsungan hidup molekul. Faktanya, penelitian metabolomik telah menunjukkan bahwa gen endofit yang terkait dengan metabolit spesifik terlibat dalam pemacu pertumbuhan tanaman dengan merangsang produksi hormon tanaman seperti auksin dan giberelin atau sebagai agen pelindung tanaman terhadap mikroba patogen, kanker, dan hama serangga, namun ramah dan aman bagi lingkungan (Ek-Ramos *et al.*, 2019).

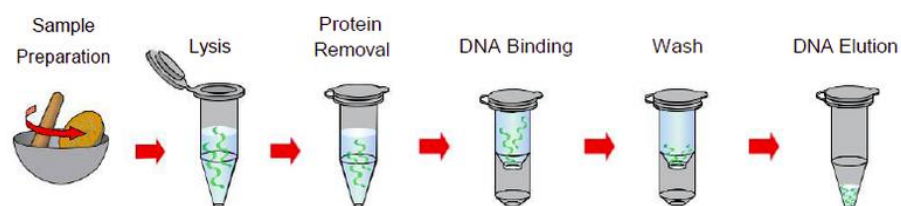
Menurut Ramamoorthy *et al.* suatu rangsangan pertumbuhan jaringan internal tanaman yang relatif sama seperti PGPR (*Plant Growth Promoting*

Rhizobacteria) dengan bakteri endofit. Bakteri endofit masuk ke dalam jaringan tanaman melalui akar, bunga, batang, daun (melalui stomata) dan kotiledon, bagian tanaman yang terpapar udara langsung juga dapat menjadi jalur masuk bakteri endofit.

2.2 Isolasi DNA

Langkah awal dalam rekayasa genetika adalah mengisolasi DNA/RNA sebelum melanjutkan ke langkah-langkah berikutnya. Prinsip dasar dari isolasi ini adalah melisis dan mengekstraksi jaringan untuk membentuk ekstrak sel yang mengandung jaringan sel, DNA, dan RNA. Ekstrak sel ini kemudian dibahas untuk memperoleh pelet sel yang mengandung total DNA/RNA. Isolat genom DNA bakteri yang diperoleh dievaluasi secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri dan secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Berbagai metode analisis DNA dimulai dari langkah utama yaitu isolasi DNA. Mendapatkan DNA berkualitas tinggi melalui proses ekstraksi adalah hal yang sangat penting dalam analisis molekuler. Berbagai tes biologi molekuler membutuhkan DNA yang murni dan berkualitas tinggi. Proses isolasi DNA harus memastikan bahwa DNA yang dihasilkan bebas dari kontaminan seperti protein dan RNA yang dapat mengganggu proses PCR. Karena itu, teknik isolasi DNA yang tepat sangat krusial untuk mendapatkan DNA yang berkualitas dan kuantitatif. Berbagai teknik isolasi dan pemurnian DNA telah dikembangkan berdasarkan prinsip-prinsip ini, sehingga mempermudah dan mempercepat proses ekstraksi DNA (Pambudiono *et al.*, 2019).

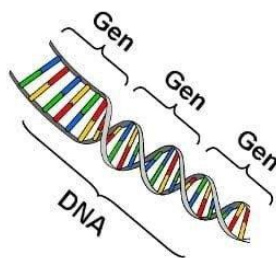


Gambar 1 Isolasi DNA (*Bio-Helix*, 2022)

Isolasi DNA dilakukan melalui tahapan-tahapan sebagai berikut: Preparasi sel; Lisis sel; DNA *Binding*; *Wash*; *Elution*. Hasil proses ekstraksi DNA berbeda-beda untuk sampel organisme hidup yang berbeda, meskipun langkah ekstraksinya sama. Dengan demikian, optimasi dapat dilakukan untuk setiap sampel pada setiap langkah. Oleh karena itu, isolasi DNA merupakan tahapan krusial yang perlu dilakukan dengan tepat. Kualitas proses isolasi dan kebersihan DNA mempengaruhi hasil analisis DNA menggunakan berbagai metode, termasuk PCR (Ahmed *et al.*, 2014).

2.3 GEN

Setiap gen adalah unit kecil DNA yang terletak di lokasi tertentu pada kromosom, setiap gen memiliki instruksi untuk membangun protein tertentu. Setiap gen mengandung ribuan pasangan basa, bentuk fisiknya berupa rangkaian DNA yang terikat pada untai protein, polipeptida atau RNA yang mempunyai fungsi bagi organisme yang memilikinya (Mutu *et al.*, 2021).



Gambar 2 Struktur DNA (Yusi Asypini, 2020)

Struktur DNA menyerupai tangga spiral panjang yang terdiri dari empat jenis senyawa kimia yang dikenal sebagai basa. Basa-basa ini adalah adenin, timin, sitosin, dan guanin, yang disingkat A, T, C, dan G. Basa-basa ini berpasangan dalam empat kombinasi: AT, TA, CG, dan GC, yang saling melilit. Di dalam setiap inti sel terdapat kromosom, yang merupakan gulungan DNA dan terdiri dari segmen-segmen kecil yang disebut gen, yaitu unit fungsional dari pewarisan.

Gen mengandung sebagian besar informasi yang dibutuhkan sel hidup untuk bertahan hidup dan bereproduksi. Pada sebagian besar organisme, gen terdiri dari DNA, di mana urutan DNA spesifik menentukan fungsi gen. Suatu gen disalin dari DNA ke RNA.

2.4 GEN 16s rRNA

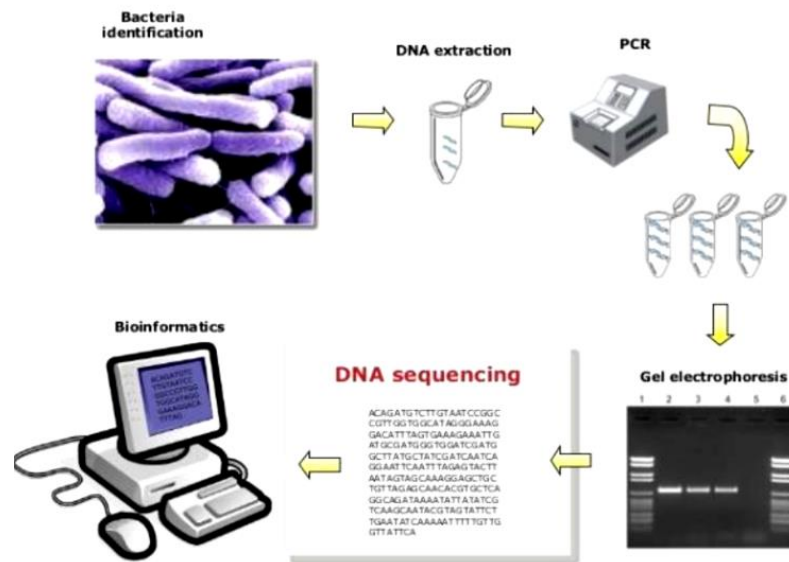
rRNA atau RNA ribosom adalah molekul yang ditemukan di dalam sel yang terlibat dalam sintesis protein organel, disebut ribosom yang menyebar ke sitoplasma. Hal ini untuk membantu menerjemahkan informasi yang terkandung dalam mRNA (*messenger RNA*) menjadi protein. Ada tiga RNA penting yang terjadi di dalam sel – rRNA, mRNA, dan tRNA (*transfer RNA*).

16S rRNA adalah urutan DNA yang mengkode RNA dari subunit kecil ribosom bakteri. Gen 16S rRNA ini dapat dilihat pada semua bakteri, suatu bentuk terkait yang terdapat pada semua sel bahkan pada eukariota. Penelitian terhadap rangkaian 16S rRNA dari beberapa entitas menunjukkan bahwa beberapa bagian molekul mengalami perubahan genetik yang cepat, sehingga membedakan berbagai spesies dalam genus yang sama (Syah, 2022).

Pada tahun 1980-an, diperkenalkannya 16S rRNA sebagai alat identifikasi bakteri membawa perubahan signifikan dalam metode identifikasi. Teknik ini mampu mengidentifikasi bakteri yang tidak dapat dikultur dengan tingkat akurasi tinggi dan dalam waktu yang relatif singkat. Ahli menemukan bahwa ada hubungan filogenetik yang dapat ditelusuri pada bakteri, dan bahkan pada semua makhluk hidup, dengan membandingkan sekuensi genetik tertentu (Noer, 2021).

Bagian genetik yang dimaksud dalam bakteri mencakup gen yang mengodekan 5S, 16S (juga dikenal sebagai subunit kecil), dan 23S rRNA, serta ruang-ruang di antara gen-gen tersebut. Di antara bagian-bagian ini, gen 16S *ribosomal Ribonucleic acid* (16S rRNA) saat ini paling umum digunakan dalam identifikasi bakteri. Gen 5S dan 23S dianggap lebih sulit untuk diterapkan dalam praktik identifikasi karena analisisnya yang lebih lambat dan kurang praktis. Oleh karena itu, tidak mengherankan bahwa gen 16S rRNA saat

ini banyak digunakan dalam berbagai penelitian bakteriologi untuk tujuan identifikasi (Akihary & Kolondam, 2020).



Gambar 3 Tahapan Identifikasi Menggunakan Metode 16S rRNA (Noer, 2021)

Gen 5S rRNA memiliki panjang sekitar 120 nukleotida. Pada prokariota, 5S rRNA berinteraksi dengan protein ribosom seperti L5, L18, dan L25. Penggunaan 5S rRNA sebagai alat identifikasi dianggap sulit karena ukurannya yang kecil. Masalahnya terletak pada kemungkinan perubahan yang terjadi pada 5S rRNA pada archaea dan prokariota, yang dapat mengakibatkan ketidakakuratan dalam analisis filogenetik. Gen 23S rRNA terdiri dari sekitar 2900 basa dan dianggap sulit untuk dianalisis secara statistik karena memiliki struktur tersier dan sekunder yang cukup kompleks.

Penerapan teknik molekuler dalam sistematika bakteri memperkenalkan parameter baru yang efisien untuk klasifikasi bakteri, yaitu analisis urutan gen 16S rRNA. *Ribosome Ribonucleic Acid* (rRNA) adalah molekul kompleks yang berinteraksi dengan komponen RNA lainnya untuk membentuk ribosom, yang esensial dalam sintesis protein. Penggunaan gen 16S rRNA telah diperkenalkan sebagai alat identifikasi spesies bakteri. Gen ini dikenal sebagai gen yang paling observasi pada bakteri, artinya gen ini mudah diidentifikasi

dan dibandingkan di antara spesies-spesies bakteri yang berbeda. Karena konservasinya, gen 16S rRNA sangat berguna dalam membedakan dan mengidentifikasi spesies bakteri. Walaupun urutan basanya relatif konservatif, gen 16S rRNA juga memiliki beberapa daerah yang berbeda (Dewata *et al.*, 2016).

2.5 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik sintesis dan amplifikasi DNA. Teknologi PCR dapat digunakan untuk memperkuat segmen DNA jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Sebelum melakukan PCR terhadap sampel yang akan diselidiki, harus dilakukan optimasi untuk mendapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai sehingga diperoleh hasil PCR yang optimal. Laboratorium penelitian atau penelitian yang menggunakan PCR harus mengetahui langkah-langkah apa yang harus diambil ketika sampel dan reagen disiapkan untuk dianalisis (Sjafaraenan *et al.*, 2018).

Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat (Marmioli & Maestri, 2017):

1. Denaturasi

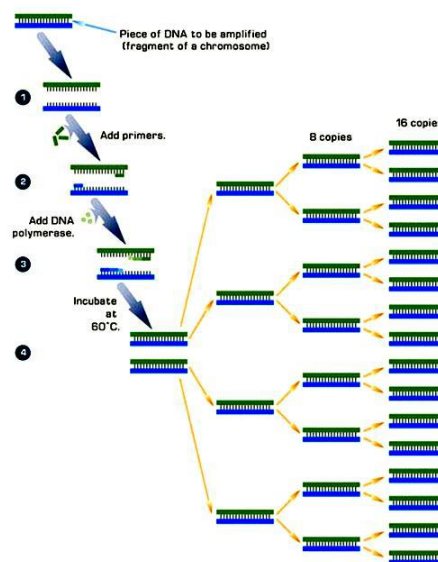
Di dalam proses PCR, Denaturasi pertama dilakukan sebelum menambahkan enzim *Taq polimerase* ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA adalah proses dimana DNA beruntai ganda dibuka menjadi DNA beruntai tunggal. Ini biasanya memakan waktu sekitar 3 menit untuk memastikan bahwa molekul DNA didenaturasi menjadi DNA beruntai tunggal. Denaturasi yang tidak sempurna dengan cepat menyebabkan renaturasi DNA (sekali lagi membentuk DNA beruntai ganda) dan hal ini menyebabkan proses PCR gagal. Waktu denaturasi yang terlalu lama dapat menurunkan aktivitas enzim *Taq polymerase*. Aktivitas enzim ini memiliki waktu paruh yang berbeda pada berbagai suhu, yaitu lebih dari 2 jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada suhu 95°C, dan 5 menit pada suhu 97,5°C.

2. Annealing

Secara umum, kriteria yang digunakan untuk merancang primer yang baik adalah panjang primer harus 18-25 basa, mengandung 50-60% G+C, dan kedua primer tersebut harus identik. Selain itu, urutan DNA setiap primer tidak boleh saling melengkapi, hal ini menyebabkan pembentukan struktur sekunder pada primer, yang dapat mengurangi efisiensi PCR. Waktu *annealing* standar dalam PCR berkisar antara 30 hingga 45 detik. Semakin panjang primer, semakin tinggi suhu yang diperlukan. Temperatur penempelan yang umum digunakan berada dalam rentang 36°C hingga 72°C, meskipun suhu yang sering diterapkan adalah antara 50°C hingga 60°C.

3. Ekstensi

Pada titik ini, *Taq polimerase* mulai memperluas DNA primer dari ujung 3'. Laju akumulasi nukleotida enzim ini pada 72°C diperkirakan antara 35 dan 100 nukleotida per detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan molekul DNA target. Jadi, untuk produk PCR 2000 bp, 1 menit sudah lebih dari cukup untuk langkah ekstensi awal ini. Biasanya, pada akhir siklus PCR, waktu yang diperlukan untuk langkah ini ditingkatkan menjadi 5 menit, sehingga semua produk PCR diharapkan membentuk DNA beruntai ganda.



Gambar 4 Siklus PCR (Marmioli & Maestri, 2017)

Reaksi-reaksi tersebut diulang antara 25 hingga 30 kali (siklus), sehingga di akhir siklus diperoleh jumlah molekul DNA untai ganda baru yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Jumlah siklus amplifikasi disesuaikan dengan konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi.

Produk PCR dapat diidentifikasi berdasarkan ukuran menggunakan elektroforesis gel agarosa. Proses ini melibatkan penyuntikan DNA ke dalam gel agarosa dan kemudian menerapkan arus listrik untuk memisahkan DNA. DNA berukuran kecil akan bergerak lebih cepat melalui gel, sementara DNA berukuran besar akan bergerak lebih lambat, sehingga memudahkan identifikasi hasil positif (Eling KS *et al.*, 2014).

Faktor-faktor yang menentukan keberhasilan PCR diantaranya adalah:

- 1) temperatur annealing dari kedua primer
- 2) enzim polymerase
- 3) jumlah siklus PCR
- 4) deoksinukleotida triphosphate (dNTP)
- 5) konsentrasi dan kualitas DNA
- 6) konsentrasi $MgCl_2$
- 7) faktor lain seperti larutan buffer
- 8) konsentrasi dan kualitas primer

Setelah PCR menghasilkan produknya, produk tersebut kemudian disubjekkan pada elektroforesis. Hasil elektroforesis dianalisis dengan membandingkan intensitas serta ketebalan pita secara visual. Pita yang diinginkan adalah pita tunggal, tebal, dan sesuai dengan ukuran target. Konsentrasi primer serta suhu *annealing* yang menghasilkan pita optimal ini kemudian digunakan untuk melakukan PCR pada sampel penelitian (Setyawati *et al.*, 2021).

2.6 Elektroforesis

Keberhasilan proses isolasi DNA dapat diukur melalui beberapa proses, di antaranya adalah melalui pengecekan keberadaan pita DNA dengan metode elektroforesis atau melalui pengukuran konsentrasi DNA terlarut dengan metode spektrofotometri. Prinsip elektroforesis adalah teknik yang memanfaatkan pergerakan molekul bermuatan atau ion melalui medium semisolid di bawah pengaruh medan listrik. Dalam konteks analisis ukuran DNA, teknik ini menggunakan penanda DNA dengan ukuran yang sudah diketahui sebagai patokan untuk menentukan perkiraan ukuran sampel DNA. Molekul DNA yang bermuatan negatif dipasangkan dengan gel agarosa, di mana arus listrik mengarah dari kutub negatif ke kutub positif. Proses ini memungkinkan pemisahan molekul DNA berdasarkan panjangnya, karena mereka bergerak dari kutub negatif ke kutub positif melalui gel (Sundari & Alat, 2019).

Elektroforesis adalah teknik pemisahan yang menggunakan medan listrik yang dihasilkan oleh elektroda-elektroda untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bermuatan, baik sebagai kation maupun anion. Berbeda dengan elektrokimia yang menggunakan elektroda untuk melakukan reaksi reduksi dan oksidasi, elektroforesis sepenuhnya mengandalkan medan listrik untuk proses pemisahannya. Teknik ini telah ditemukan sejak abad ke-19, namun pengembangannya secara signifikan dimulai pada tahun 1956 ketika Hunter dan Moller mempelajari sifat enzim sebagai katalisator dan mengamati pengaruh kimia terhadap prosesnya (Harahap, 2018).

2.7 Sekuensing

Sekuensing (*Sequencing*) DNA adalah proses menentukan urutan asam nukleat atau nukleotida dalam DNA. Pengetahuan tentang urutan DNA penting dalam penelitian biologi dasar dan di banyak bidang terapan seperti diagnostik medis, bioteknologi, biologi forensik, virologi, dan sistematika biologi. Langkah-langkah sekuensing DNA yang dilaksanakan dalam penelitian ini mencakup:

- 1) Proses amplifikasi menggunakan PCR dengan primer universal
- 2) Elektroforesis
- 3) Penyiapan DNA
- 4) Pembacaan elektroforegram hasil sekuensing
- 5) Pemurnian DNA

Data yang diperoleh berbentuk elektrogram dalam file ABI, di mana setiap jenis nukleotida diidentifikasi dengan warna yang berbeda. Adenin (A) ditandai dengan warna hijau, Guanin (G) dengan warna ungu, Timin (T) dengan warna merah, dan Sitosin (C) dengan warna biru. Analisis hasil sekuensing produk PCR dilakukan dengan membandingkan sekuen nukleotida sampel dengan sekuen nukleotida kontrol. Urutan nukleotida dari sampel dan kontrol dimasukkan ke dalam program yang secara otomatis menyusun urutan nukleotida sampel berdasarkan urutan dan lokasi nukleotida standar, serta mencatat perbedaan antara nukleotida sampel dan nukleotida kontrol (Sjafaraenan *et al.*, 2018).

2.8 Pewarnaan Gram

Di dunia laboratorium, terutama dalam bidang mikrobiologi, pewarnaan memegang peranan penting. Pewarnaan gram dilakukan untuk memeriksa struktur mikroskopis dari kultur bakteri murni yang dihasilkan dan untuk mengklasifikasikan bakteri ke dalam kelompok gram positif atau gram negatif. Observasi ini meliputi pemeriksaan morfologi dan mikroskopis terhadap koloni bakteri yang diperoleh selama proses isolasi. Pemeriksaan morfologi melibatkan analisis bentuk, struktur luar, serta struktur internal seperti dinding sel dan vakuola bakteri, serta warna dan permukaan koloni menggunakan mikroskop. Selain itu, dilakukan pengamatan mikroskopis untuk menganalisis hasil dari pewarnaan gram. Setelah itu, bakteri (dalam bentuk kultur murni) diamati secara morfologis dan mikroskopis, dan kemudian dikultur di media minimal untuk proses isolasi DNA.

Pewarna yang sering digunakan untuk pewarnaan bakteri meliputi pewarna sintetik seperti safranin, karbol fuchsin, kristal violet, dan metilena

biru. Selain pewarna sintetik, pewarna alami yang diperoleh dari bahan-bahan alami juga dapat digunakan dalam proses pewarnaan bakteri. Dalam penelitian ini, pewarna alami yang digunakan untuk pewarnaan bakteri diinvestigasi menggunakan ekstrak daun pacar sebagai alternatif pada proses pewarnaan gram (Hidayanti *et al.*, 2021).

Bakteri gram negatif teridentifikasi dengan warna merah muda sedangkan gram positif berwarna ungu. Perbedaan dalam warna ini terjadi karena komposisi dinding sel yang berbeda antara kedua jenis bakteri ini. Bakteri gram positif dapat menahan warna primer kristal violet karena memiliki dinding sel yang kaya peptidoglikan. Sebaliknya, bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan warna primer ini karena memiliki lapisan lipoprotein yang larut dalam etanol saat proses pencucian (Wulandari, Destik Purwaningsih, 2021).