

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gen 16S rRNA

Langkah untuk mengidentifikasi bakteri menggunakan metode 16S rRNA yaitu meliputi isolasi DNA, amplifikasi wilayah 16S menggunakan PCR, visualisasi gen menggunakan elektroforesis, sekuensing, dan pemrosesan data sekuens menggunakan analisis bioinformatika. Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk identifikasi bakteri adalah penggunaan penanda gen 16S rRNA. Urutan gen 16S rRNA memiliki panjang sekitar 1.550 bp dan terdiri dari wilayah yang dilestarikan (*conserved*) daerah yang memiliki keunikan atau diantara bakteri satu dengan yang lain. Keunggulan identifikasi menggunakan 16S rRNA antara lain kemampuan mengidentifikasi bakteri yang tidak dikultur, akurasi tinggi, dan waktu relatif singkat. Namun metode 16S rRNA memiliki banyak kelebihan, metode ini juga memiliki kelemahan, seperti ketidaksesuaiannya untuk spesies tertentu (Noer, 2021).

Penggunaan gen 16S rRNA sebagai alat penelitian sangat membantu dalam mengidentifikasi berbagai jenis bakteri secara akurat untuk berbagai keperluan penelitian di Indonesia. Gen 16S rRNA tidak hanya mengidentifikasi potensi bakteri tetapi juga berfungsi sebagai panduan. Sekuensing gen 16S rRNA banyak digunakan dalam penelitian klinis, perikanan, kelautan, pertanian, dan peternakan di Indonesia (Akihary and Kolondam, 2020).

Metode 16S rRNA digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri keunggulan gen 16S rRNA adalah memungkinkan untuk mengenali kesamaan antar spesies bakteri. Kesamaan yang diperoleh juga dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu sangat tinggi kesamaan dan sangat luas (rendah) kesamaan. Dengan menggunakan metode gen 16S rRNA dilihat dari kelebihanannya, gen 16S rRNA sangat efektif untuk penggunaan dalam penelitian karena akurasinya yang tinggi dan waktu identifikasi yang singkat (Akihary and Kolondam, 2020).

2.2 Isolasi DNA

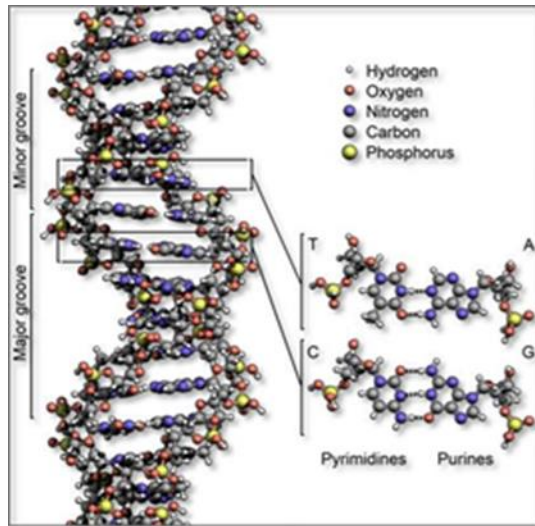
Isolasi DNA melibatkan beberapa tahap yaitu Lisis (penghancuran), DNA Binding (pengikatan, pencucian, dan elusi. prinsip untuk memisahkan DNA yaitu sentrifugasi (Faatih, 2009). Isolasi DNA merupakan langkah awal yang harus dilakukan sebelum melanjutkan ke langkah selanjutnya dalam proses identifikasi gen 16S rRNA. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan zat berdasarkan kepadatan molekulnya. Jika prosedur dilakukan dengan benar, maka DNA kromosom dapat diperoleh dengan kemurnian yang cukup tinggi, dibuktikan dengan hasil elektroforesis yang baik. Keakuratan dan ketelitian dalam melakukan penelitian menentukan kemurnian DNA plasmid (Faatih, 2009).

Isolasi DNA adalah salah satu teknik dasar biologi molekuler dan dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi studi kompleks mengenai informasi genetik suatu organisme. DNA disimpan dalam bentuk basa nukleotida: adenin (A), guanin (G), sitosin (C), dan timin (T). Setiap urutan nukleotida mengandung informasi genetik yang berperan dalam perkembangan dan pengaturan organisme hidup (Widyastuti, 2011). Lisis enzimatik biasanya menggunakan proteinase K (Widyastuti, 2011). Isolasi DNA Langkah ini bertujuan untuk memisahkan asam nukleat dari komponen lain penyusun sel. Isolasi dapat dilakukan dengan menggunakan reagen yang mengandung deterjen (Wash 1), larutan yang mengandung NaCl dan berbagai buffer (biasanya *buffer* Tris atau fosfat, pH 7 atau 8). Berbagai modifikasi biasa dilakukan pada tahap ini, antara lain inkubasi pada suhu tinggi, seperti EDTA yang mempunyai kemampuan menghambat enzim nuklease. Pengendapan DNA dilakukan untuk mengisolasi DNA dari larutan yang digunakan pada isolasi (Widyastuti, 2011).

Dalam bidang mikrobiologi, identifikasi mikroorganisme memegang peranan yang sangat penting. Hal ini relevan dengan ketepatan pengobatan, pencegahan penularan, dan pencegahan munculnya resistensi antimikroba dan eksplorasi senyawa aktif. Identifikasi mikroorganisme penyebab penyakit menular secara tradisional dilakukan dengan metode kultur, dilanjutkan dengan pemeriksaan sifat fisiologis dan biokimianya. Metode ini tidak memakan waktu. Selain itu, beberapa mikroorganisme sulit untuk dibiakkan, seperti mikobakteri dan virus tertentu. Metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang

tinggi saat ini sedang dikembangkan. yaitu, melalui analisis sekuens gen 16S rRNA. Gen pengkode RNA ribosom (rRNA) merupakan gen yang paling terkonservasi (dilestarikan) (Rinanda, 2011).

Daerah gen RNA ribosom (rRNA) yang hipervariabel memfasilitasi identifikasi spesies bakteri. Wilayah hipervariabel gen 16S rRNA memiliki panjang sekitar 1.550 pasangan basa dan panjang 500 basa. Organisme dapat dibedakan satu sama lain di wilayah ini. Primer yang digunakan untuk amplifikasi sekuens mengenali wilayah yang dilestarikan dan memperkuat wilayah hipervariabel, menghasilkan sekuens yang spesifik untuk organisme (Akihary and Kolondam, 2020). Waktu identifikasi yang singkat dan tingkat akurasi yang tinggi dari analisis 16S rRNA merupakan dua keunggulan tambahan dibandingkan metode konvensional. Menurut Janda & Abbott (2007), ukurannya yang besar (1.500 pb) juga dianggap menguntungkan untuk digunakan dalam bidang informatika. Gen 16S rRNA memiliki keuntungan dalam mengenali kesamaan antara spesies bakteri. Karena semua spesies bakteri memiliki gen 16S rRNA, maka hubungan filogenetik diantara mereka dapat ditentukan. Hasil urutan digunakan untuk membandingkan dan membedakan urutan dalam database yang berbeda. Alat Pencarian Penyelarasan Lokal Dasar (BLAST) adalah metode yang umum digunakan. Pusat Informasi (NCBI) telah mengumpulkan ribuan rangkaian dari berbagai isolat lingkungan dan klinis ke dalam melalui server <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Sumber data tambahan yang dapat digunakan. DNA (asam nukleat deoksiribosa) merupakan asam nukleotida, sekumpulan molekul yang menentukan bentuk dan karakteristik semua makhluk hidup, biasanya berbentuk heliks ganda, dan bertanggung jawab atas perkembangan biologis semua bentuk kehidupan seluler instruksi genetik yang menentukan. Dalam sel, DNA biasanya terletak di dalam nukleus.



Gambar 2.1 Struktur DNA

2.3 Bakteri Endofit

Bakteri Endofit merupakan bakteri yang terdapat pada jaringan tanaman sehat dan tidak menimbulkan gejala penyakit atau merugikan tanaman inangnya. Bakteri Endofit dapat diisolasi menggunakan teknik sterilisasi permukaan dan diekstraksi ke dalam media pertumbuhan bakteri. Saat ini mikroorganisme endofit banyak diteliti karena kelebihan dan efek positifnya terhadap tanaman inang, antara lain yaitu Peningkatan resistensi terhadap agen antimikroba, hormon pertumbuhan, fiksasi nitrogen, mobilitas fosfat (Hanif and Susanti, 2017).



Gambar 2.2 Bakteri Endofit

Keunggulan bakteri endofit sebagai agen hayati dibandingkan dengan rhizo bakteri melibatkan beberapa aspek. Pertama, keberadaan bakteri endofit lebih terlindungi karena mereka hidup di dalam jaringan tanaman. Keunggulan lain dari bakteri endofit adalah kemampuannya dalam mentranslokasikan senyawa metabolik yang

diproduksi di dalam jaringan tanaman lebih unggul. Mikroorganisme endofit berperan sangat penting dalam penyerapan unsur hara tanaman (Prihanto, 2018).

Menurut (Hanif and Susanti, 2017) Bakteri endofit bisa diisolasi dan diekstraksi dari media pertumbuhan bakteri dengan menggunakan metode sterilisasi permukaan. Banyak mikroorganisme endoparasit mengandung agen antibakteri, hormon pertumbuhan, fiksasi nitrogen, yang diproduksi di jaringan tumbuhan lebih unggul. Mikroorganisme endofit bersifat mikroskopis dan dapat hidup di jaringan tanaman, akar, batang, dan daun.

2.4 Rimpang Kunyit

Tanaman kunyit secara tradisional sudah sejak lama banyak digunakan sebagai tanaman obat. Negara India dan China menggunakan tanaman kunyit untuk mengobati penyakit empedu, selesma, batuk, diabetes, rematik, sinusitis, penyakit kulit, infeksi parasit, inflamasi, dan biliary disorders. Potensi tanaman kunyit sebagai tanaman obat menimbulkan ide untuk melakukan penelitian yang bertujuan mengetahui kandungan senyawa pada serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan. Tanaman kunyit adalah tanaman herbapereennial dan mempunyai rizoma (rimpang/umbi) yang masuk ke dalam famili jahe (*Zingiberaceae*). Kandungan kurkumin dalam rimpang kunyit bervariasi sesuai dengan jenis tanaman kunyit (kultivar), usia pemanenan, ukuran atau jenis rimpang (rimpang induk kandungan kurkumin berbeda dengan rimpang anakan), dan kondisi tanah (daerah, iklim, musim). Faktor - faktor yang mempengaruhi kandungan senyawa yang terdapat pada rimpang tanaman kunyit beserta konsentrasinya adalah masa pemanenan rimpang kunyit, jenis kultivar tanaman kunyit, metode pengeringan rimpang kunyit, kandungan kurkumin beserta turunannya yang terdapat pada rimpang tanaman kunyit mempunyai fungsi yang sangat beragam termasuk sebagai analgesik, antiseptik, antiinflamasi, antimalaria, dan antioksidan

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Penemuan teknologi PCR dan teknik lain seperti pengurutan DNA telah merevolusi bidang ilmu pengetahuan dan teknologi. Reaksi berantai polimerase (PCR) adalah teknik untuk mensintesis dan memperkuat DNA secara *in vitro*. Teknologi ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985. Dengan

menggunakan teknologi PCR, bagian DNA dapat diamplifikasi jutaan kali hanya dalam beberapa jam.

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) Pra-denaturasi DNA templat; (2) Denaturasi DNA templat; (3) Penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) Pemanjangan primer (*extension*) dan (5) Pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) Merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo and Rudiretna, 2001). Menurut (Handoyo & Rudiretna, 2001). Untuk melakukan proses PCR diperlukan komponen-komponen seperti yang telah disebutkan dibawah. Pada bagian ini akan dijelaskan secara rinci kegunaan dari masing-masing komponen tersebut.

a. Templat DNA

Pembuatan DNA templat dengan menggunakan metode lisis dapat digunakan secara umum, dan metode ini merupakan cara yang cepat dan sederhana untuk DNA kromosom ataupun DNA plasmid. Prinsip metode lisis adalah merusak dinding sel tanpa harus merusak DNA yang diinginkan. Oleh karena itu kerusakan dinding sel umumnya dilakukan dengan cara memecahkan dinding sel menggunakan buffer lisis. Komposisi buffer lisis yang digunakan tergantung dari jenis sampel.

b. Primer

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA.

c. Buffer PCR

Buffer PCR yang digunakan tergantung pada pH dan kapasitas buffernya. Ada 2 jenis buffer PCR yang tersedia secara komersial: "buffer garam rendah" (pH 8,75, kapasitas buffer rendah) dan "buffer garam tinggi" (pH 9,2, kapasitas buffer tinggi). panjang DNA target antara 0 dan 5 kilobase, biasanya diperlukan "buffer garam rendah", sedangkan untuk panjang DNA target lebih dari 5 kilobase, digunakan "buffer garam tinggi".

d. Waktu

Penentuan waktu untuk proses annealing berkaitan dengan panjang primer. Untuk panjang primer 18 – 22 basa cukup dengan 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa diperlukan waktu *annealing* 60 detik. pemilihan waktu yang digunakan berkaitan dengan proses denaturasi DNA templat, annealing dan ekstensi primer. Untuk denaturasi DNA templat umumnya dilakukan selama 30 – 90 detik, ini semua tergantung pada DNA templat yang digunakan. Waktu denaturasi yang terlalu lama akan merusak templat DNA dan sekaligus dapat menurunkan aktivitas polimerase DNA. Sedangkan waktu denaturasi yang terlalu pendek akan menyebabkan proses denaturasi tidak sempurna.

2.6 Pewarnaan Bakteri

Dalam dunia laboratorium khususnya bidang mikrobiologi, pewarnaan merupakan salah satu bidang yang sangat penting. Fungsi pewarnaan adalah untuk mempermudah melihat bakteri di bawah mikroskop, memperjelas ukuran dan bentuk bakteri, mengenali struktur luar dan morfologi dalam bakteri seperti dinding sel vakuolar, dan menggunakan pewarna untuk menciptakan sifat dan kimia yang unik. Pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan bakteri berdasarkan kelompoknya yaitu Gram positif dan Gram negatif yang berbeda dalam komposisi dinding sel nya. Pewarna yang digunakan terdiri dari kristal violet, larutan iodin, alkohol, dan safranin. Pewarna utama yang digunakan pada pewarnaan Gram yaitu kristal violet yang berwarna ungu terjadi mekanisme yang berbeda pada bakteri Gram positif dan Gram negatif ketika ditambahkan larutan peluntur, pada bakteri Gram positif warna akan dipertahankan tetapi pada Gram negatif akan hilang. Oleh karena itu diperlukan pewarna penutup yang kontras untuk mewarnai bakteri Gram negatif, yaitu dengan pewarna iodin yang berwarna merah pewarna penutup yang sering digunakan pada pewarnaan Gram adalah safranin warna merah ini stabil dalam berbagai pH dan mudah larut dalam pelarut polar. Pada penelitian ini digunakan larutan alkohol 96% sebagai pengeksrak yang bertujuan untuk menarik zat warna yang terkandung di dalam sediaan bahan alam tersebut agar lebih optimal digunakan. bakteri kaya asam nukleat yang banyak membawa muatan negatif dalam bentuk gugus posfat, sehingga akan berikatan dengan pewarna basa yang bermuatan positif (Virgianti, 2017).