

# BIOTEKNOLOGI DASAR DAN BAKTERI ASAM LAKTAT ANTIMIKROBIAL

Sumaryati Syukur



# **BIOTEKNOLOGI DASAR DAN BAKTERI ASAM LAKTAT ANTIMIKROBIAL**

**Sumaryati Syukur**

**Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi  
Universitas Andalas**

## **BIOTEKNOLOGI DASAR DAN BAKTERI ASAM LAKTAT ANTIMIKROBIAL**

Penulis : Sumaryati Syukur  
Penyunting : Handoko  
Tata Letak : Multimedia LPTIK  
Sampul : Multimedia LPTIK

ISBN : 978-602-5539-05-3

Diterbitkan oleh

Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan  
Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas Lantai Dasar  
Gedung Perpustakaan Pusat Kampus Universitas Andalas Jl.  
Dr. Mohammad Hatta Limau Manis, Padang, Sumatera Barat,  
Indonesia  
Web: [www.lptik.unand.ac.id](http://www.lptik.unand.ac.id)  
Telp. 0751-775827 - 777049  
Email: [sekretariat\\_lptik@unand.ac.id](mailto:sekretariat_lptik@unand.ac.id)

Hak cipta dilindungi Undang-Undang.

Dilarang memperbanyak sebagian maupun seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit kecuali demi tujuan resensi atau kajian ilmiah yang bersifat nonkomersial.

## PRAKATA

Pertama-tama penulis mengucapkan Syukur Alhamdulillah atas selesainya buku yang berjudul: **“Bioteknologi dasar dan bakteri asam laktat Anti mikrobial”** Buku ini ditulis untuk membantu perkuliahan dan penelitian dibidang Bioteknologi dan Probiotik untuk mahasiswa S1, S2 dan S3 fakultas MIPA, dan Kedokteran atau sekolah tinggi kesehatan.

Mengingat karena terbatasnya bahan untuk mata kuliah Bioteknologi dan Teknologi Probiotik yang praktis dapat memberikan pemahaman dan kerangka pemikiran yang mudah dimengerti mahasiswa, maka pada buku ini dijelaskan secara ber-urutan per BAB langkah langkah pembelajaran teori dan metoda pengembangan penelitiannya.

Buku ini terdiri dari XI BAB yang membahas dasar dasar Bioteknologi dan Probiotik. Buku ini juga merupakan hasil Penelitian beberapa orang Mahasiswa Pasca Sarjana S2 dan S3 FMIPA, peternakan dan Kedokteran dengan ruang lingkup bidang Bioteknologi dan Probiotik dibawah bimbingan kami.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terimakasih yang tulus kepada mahasiswa PascaSarjana yang telah meneliti dengan baik dan lulus dengan nilai yang sangat memuaskan yaitu kepada: Ryrin Novianti, Della Amelia Utami, Lydia Sari Utami, Febrina Saputri, Febria Yunenshi, Desmon, Hendri Purwanto, Fachrul Rizal, Edy Fachrial, Silvia Yolanda, Yolani Saputri, pada program (S2) , Urnemi, Horas dan Minda Azhar pada program (S3).

Buku ini juga merupakan output dari proyek penelitian hibah PascaSarjana 2 tahun berturut turut dengan kontrak tahap I No: 394/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011 dan Kontrak tahap II No: 004/UN.16/PL/MT-HB-PC/2012, dilanjutkan dengan hibah kompetensi multiyears yang berakhir tahun 2016. Ucapan terima kasih juga untuk mahasiswa S2 bioteknologi, Dani Prasetyo yang juga telah membantu editing.

Kami berharap buku ini dapat bermanfaat bagi mahasiswa sebagai sumber bahan bacaan dan bahan ajar kuliah Bioteknologi dan Teknik Penelitian Probiotik. Penulis berharap agar dimasa mendatang dapat ditemukan diversity dari Probiotik lokal Sumatra Barat dan Probiotik potensial baru dari Fermentasi Pangan Lokal sebagai Mikroba baik untuk menjaga kesehatan total terutama usus manusia dan hewan ternak serta aplikasi Bakteriosin sebagai Food Preservatif Alami.

Buku ini terus menerus akan diperbarui dan diimprovisasi sesuai hasil penelitian baru yang akan datang. Kami menyadari buku ini belum sempurna dan perbaikan serta saran untuk kesempurnaannya sebagai bahan ajar sangat kami harapkan.

Terakhir kami mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak, terutama dosen mitra pembimbing, Prof,Jamsari, dan Prof.Endang Purwati, serta semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah membantu terbitnya buku ini terutama kepada DP2-M Dikti dan DITNAGA yang telah memberikan pendanaan penelitian probiotik dan penyelesaian buku ini.

Wassalam Penulis  
(Prof. Sumaryati Syukur Ph.D)

<b>DAFTAR ISI</b>	<b>HAL</b>
PRAKATA	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	x

## **BAB I . PROBIOTIK DAN BAKTERI ASAM LAKTAT**

1.1 Probiotik	11
1.2 Metabolisme BAL	15
1.3 Fermentasi Asam Laktat	17
1.4 Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat (BAL)	21
1.5 Medium Khusus Untuk Pertumbuhan BAL	22
1.6 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Kakao	26
1.7 Identifikasi makroskopis	28
1.8 Daftar Pustaka	30

## **BAB II. UJI ANTIMIKROBA BAL**

2.1 Uji Anti Mikroba	32
2.2 Daftar Pustaka	35

## **BAB III. IDENTIFIKASI MOLEKULAR DNA**

3.1 Struktur DNA	36
3.2 DNA Mitokondria	38

3.3 Fungsi Biologi DNA	42
3.4 Kode Genetik	50
3.5 Daftar Pustaka	54
 <b>BAB IV. ISOLASI DNA</b>	
4.1 Prinsip Isolasi DNA	56
4.2 Isolasi DNA bakteri	61
4.3 Metode isolasi DNA dari bakteri (plasmid)	63
4.4 Pemurnian DNA	64
4.5 Daftar Pustaka	65
 <b>BAB V. IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAL</b>	
5.1 Identifikasi Molekular Spesies Bakteri BAL	66
5.2 Daftar Pusaka	71
 <b>BAB VI. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)</b>	
6.1 Metoda PCR	72
6.2 Penggunaan Amplifikasi gen 16S rRNA BAL dengan mesin PCR	75
6.3 Daftar Pustaka	78
 <b>BAB VII. KLONING DNA</b>	
7.1 Sejarah Kloning	79
7.2 Plasmid/ Vektor Pembawa.	80
7.3 Sifat-Sifat Penting Vektor untuk Kloning Gen	83

7.4 Kerja Enzim Restriksi Endonuklease	85
7.5 Metode Transformasi DNA	86
7.6 Seleksi klon yang mengandung insert DNA	88
7.7 Kloning Pada Hewan	88
7.8 Kloning Pada Tanaman (Transformasi Gen)	91
7.9 Daftar Pustaka	93

## **BAB VIII . ELEKTROFORESIS PROTEIN (PAGE)**

8.1 Poly Acryl Amid Gel Elektroforesis (PAGE)	94
8.2 Penentuan Berat Molekul Bakteriosin dengan SDS-PAGE	97
8.3 Daftar Pustaka	98

## **BAB IX. BAKTERIOSIN ANTIMIKROBIAL**

9.1 Bakteriosin	99
9.2 Kinerja bakteriosin dalam aktivitas antimikroba	101
9.3 Mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin adalah sebagai berikut	102
9.4 Uji Antimikroba Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	103
9.5 Daftar Pustaka	104

## **BAB X. PRODUKSI BAKTERIOSIN**

10.1 Fungsi Bakteriosin	105
10.2 Optimasi Pembentukan Bakteriosin	105
10.3 Sintesis Bakteriosin	108
10.4 Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin	109

10.5 Kondisi Optimum Produksi Bakteriosin	111
10.6 Daftar Pustaka	116

## **BAB XI. PROBIOTIK UNTUK MENURUNKAN KOLESTEROL**

11.1 Peran Probiotik BAL terhadap Kolesterol	118
11.2 Daftar Pustaka	122



## DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	JUDUL GAMBAR	HAL
<b>BAB I . PROBIOTIK DAN BAKTERI ASAM LAKTAT</b>		
1.1	Makanan yang banyak Mengandung BAL	14
1.2	Morfologi sel BAL berbentuk basil dan coccus (A). <i>Lactobacillus</i> (B). <i>Streptococcus</i>	15
1.3	Jalur Homo fermentatif BAL	18
1.4	Jalur Heterofermentatif BAL	20
1.5	Kurva pertumbuhan BAL (G1 s/d G6)	24
1.6	Penampakan BAL pada Medium MRS Agar	28
1.7	Pewarnaan Gram 6 isolat BAL (G1 s/d G6) tahan asam (1000x)	29
<b>BAB II.UJI ANTIMIKROBA BAL</b>		
2.1	Diameter zona bening terhadap <i>E.coli</i>	33
2.2	Diameter zona bening terhadap bakteri <i>E. coli</i> dan <i>Salmonella</i> Inkubasi dilakukan pada 37°C, pada media Nutrient agar	33
<b>BAB III. IDENTIFIKASI MOLEKULAR DNA</b>		
3.1	Struktur DNA	36
3.2	Suatu unit monomer DNA single strand (kiri) basa purin dan pirimidin (kanan)	37
3.3	Struktur Kimia basa nukleotida dan nukleosida	38
3.4	Mt Human Mitochondria	39
3.5	Transkripsi Prokaryot, TATA Box	43
3.6	Sistem Regulasi/pengaturan ekspresi gen	44
3.7	Proses Translasi/Sintesa Protein	48
3.8	Kode Genetik Basa Kodon DNA	50
3.9	Struktur Asam Amino Hidrofilik	52
3.10	Struktur Asam Amino Hidrofobik	53
3.11	Struktur Asam Amino Khusus (Special)	53

3.12	Membran Lipid bilayer dan beberapa Protein Integral	54
------	---	----

## **BAB V. IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAL**

5.1	Fungsi 16S rRNA	67
5.2	Struktur sekunder 16S rRNA <i>E.coli</i> . Warna merah menunjukkan paling <i>variable</i> , biru paling <i>conserved</i> , ungu menunjukkan <i>absolutely conserved</i> .	68
5.3	Prokariot dan Eukaryot Ribosom	70

## **BAB VI. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

6.1	Mekanisme PCR dalam memperbanyak molekul-molekul DNA	75
6.2	Contoh hasil produk PCR BAL (1500 bp)	76
6.3	Sekuensing nukleotida DNA BAL S48C	76
6.4	Pohon filogenetik BAL S-48C	77

## **BAB VII. KLONING DNA**

7.1	Prinsip kloning pada bakteri	79
7.2	Struktur sel bakteri	81
7.3	Sel bakteri dan proses penggandaan DNA Plasmid ekstrakromosom	83
7.4	Mekanisme kerja Enzim Restriksi	85
7.5	Mekanisme pemotongan DNA dengan enzim restriksi	85
7.6	Mekanisme penyambungan DNA dengan Enzim Ligase	86
7.7	Kloning pada Hewan (Dolly)	90
7.8	Proses Kultur Jaringan	92

## **BAB VIII . ELEKTROFORESIS PROTEIN (PAGE)**

- 8.1 SDS-Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). A. Mekanisme alat SDS-PAGE, B. Perubahan protein akibat mercaptoetanol dan SDS. 96

## **BAB IX. BAKTERIOSIN ANTIMIKROBIAL**

- 9.1 Mekanisme aksi Bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen, A=Penempelan Bakteriosin, B= Pembentukan Pori pada dinding sel 102
- 9.2 Zona hambat ke-6 isolat *Staphylococcus aureus*, A. Isolat S48A, S48B, S48C dan B.Isolat S48D, S48E, S36A. 103
- 9.3 Zona hambat ke-6 isolat *Streptococcus sp.*, A. Isolat S48A, S48B, S48C dan B. Isolat S48D, S48E, S36A. 103

## **BAB X. PRODUKSI BAKTERIOSIN**

- 10.1 Zona hambat supernatan isolat S48C terhadap *Streptococcus sp.* 106
- 10.2 Struktur primer asam amino protein Nisin 107
- 10.3 Struktur Kimia Enterocin 107
- 10.4 Metode Pengenceran 111
- 10.5 Bakteriosin Pediosin 116

## **BAB XI. PROBIOTIK UNTUK MENURUNKAN KOLESTEROL**

- 11.1 Peranan BAL membentuk asam empedu dekonjugasi 118
- 11.2 Reaksi garam empedu dengan enzim BSH/ dekonjugasi garam empedu 119
- 11.3 Persentase Penurunan Kolesterol Telur itik 122

## DAFTAR TABEL

<b>TABEL</b>	<b>JUDUL TABEL</b>	<b>HAL</b>
<b>1.1</b>	Karakteristik 3 sub grup genus <i>Lactobacillus sp.</i>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	Habitat Bakteri Asam Laktat	<b>19</b>
<b>1.3</b>	Medium MRS	<b>23</b>
<b>1.4</b>	Colony Forming Unit BAL dari fermentasi 3 varitas kakao	<b>26</b>
<b>3.1</b>	Beberapa Perbedaan DNA dan RNA	<b>46</b>
<b>7.1</b>	Ukuran Plasmid dari beberapa BAL	<b>82</b>
<b>8.1</b>	Komposisi Reagen untuk Pembuatan Gel 10 %	<b>97</b>
<b>10.1</b>	Purifikasi dan aktivitas bakteriosin <i>Pediococcus</i>	<b>116</b>

## BAB I. PROBIOTIK DAN BAKTERI ASAM LAKTAT

### 1.1 Probiotik

Kata probiotik berasal dari bahasa Yunani ‘*Pro bios*’ yang berarti ‘untuk hidup’. Menurut FAO/WHO probiotik merupakan organisme hidup yang dapat memberikan keuntungan terhadap kesehatan kepada *host* apabila dikonsumsi sebagai food suplemen. Probiotik disebut juga dengan bakteri baik “*Friendly bacteria*” atau **good bacteria**. Untuk keperluan konsumsi, probiotik tersedia dalam bentuk suplemen makanan atau produk fermentasi susu, sayuran dan jus buah. Bakteri probiotik dapat digunakan sebagai pelengkap atau suplemen makanan alternatif. Bakteri probiotik yang banyak dikenal termasuk kelompok bakteri Asam Laktat (BAL) dan termasuk mikroorganisme yang aman dan disebut sebagai *food grade microorganism*. Mikroorganisme tersebut termasuk *Generally Recognized As Safe (GRAS)* yaitu mikroorganisme yang dapat membantu kesehatan total. Secara luas BAL digunakan sebagai starter untuk fermentasi makanan, minuman, daging, sayuran, dan susu. Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat.

BAL mempunyai aktivitas yang berlawanan dengan beberapa mikroorganisme tertentu. Selama proses fermentasi BAL memproduksi asam organik, metabolit primer dan menurunkan pH lingkungannya menjadi 3 sampai 4,5 sehingga dapat membunuh bakteri lain yang hidup pada kisaran pH 6-8. Di samping itu BAL mengekresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti **hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**, **diasetil**, **CO<sub>2</sub>**, **asetaldehid**, asam amino, dan **bakteriosin**.

Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mudah diterima sebagai bahan tambahan dalam makanan baik oleh ahli kesehatan maupun oleh konsumen karena bakteri ini secara alami berperan dalam proses fermentasi makanan. Genus bakteri yang tergolong kepada BAL adalah *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*.

Penentuan taksonomi dari strain probiotik sangatlah penting secara morfologi dan identifikasi DNA nya, karena dengan mengetahui strainnya kita dapat pula mengetahui sifat biokimia maupun potensinya untuk kesehatan pencernaan maupun untuk kegunaannya sebagai pengwet alami dalam industri makanan .

Sebuah langkah besar dalam identifikasi bakteri adalah penerapan secara luas ilmu biologi molekuler khususnya studi bioteknologi DNA BAL. Teknik yang dapat digunakan untuk menentukan/ identifikasi spesies mikroorganisme khususnya bakteri, salah satunya dengan mengkode/ menentukan sekuen DNA dari 16S rRNA.

*Bakteri Asam Laktat dari fermentasi beberapa buah-buahan tropis seperti: fermentasi Kakao, Sirsak dan Markisah, telah dipelajari secara mikrobiologi, biokimia dan bioteknologi untuk mendapatkan probiotik baru yang berpotensi baik untuk menjaga kesehatan total.*

Untuk mempelajari hal diatas perlu dilakukan studi diisolasi, penentuan aktifitas antimikroba pada pH asam, atau basa dan identifikasi DNA dengan menggunakan teknik biologi molekular (16S rRNA) agar didapatkan spesies Bakteri Asam Laktat potensial baru.

Dari hasil penelitian diatas diantaranya didapatkan beberapa BAL potensial untuk menjaga kesehatan pencernaan dan dapat hidup baik pada lingkungan pH rendah (2-4) seperti, *L. Fermentum*, *L. brevis*, *L. pediococcus*, *L. asidopilus* dll.

*Tidak semua bakteri baik dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik.*

*Jenis yang dipilih harus mempunyai minimal satu dari karakteristik*

Karakteristik Probiotik:

1. Memiliki aktivitas antimikroba. Dalam hal ini probiotik dapat berperan sebagai antibiotik alami. Beberapa jenis bakteri asam laktat mampu memproduksi asam-asam organik, hidrogen

peroksida dan bakteriosin. Senyawa-senyawa ini terutama bakteriosin dapat menyebabkan kematian pada bakteri lain.

2. Resisten terhadap seleksi sistem saluran pencernaan seperti asam lambung, cairan empedu, dan getah pankreas. Apabila bakteri tidak memiliki karakteristik ini, maka bakteri tersebut akan mati sebelum mencapai usus.
3. Memiliki aktivitas antikarsinogenik. Adanya senyawa karsinogenik seperti nitrosamin yang masuk ke saluran pencernaan, akan dapat dicegah penyerapannya oleh bakteri tersebut dengan membentuk selaput protein dan vitamin.
4. Mampu berkoloni dalam saluran pencernaan. Bakteri probiotik harus memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan flora usus, sehingga dapat melakukan proses yang diinginkan dan tidak cepat terbuang bersama tinja.
5. Mampu meningkatkan kemampuan penyerapan usus. Beberapa penyakit seperti diare pada anak-anak dapat terjadi karena kurangnya enzim laktase dalam tubuh, sehingga saluran pencernaan tidak dapat mencerna susu. Bakteri asam laktat dapat menguraikan laktosa dalam susu yang dikonsumsi menjadi monosakarida glukosa dan galaktosa yang mudah dicerna.

Bakteri yang paling banyak digunakan sebagai agen probiotik adalah golongan *Lactobacillus*. Jenis ini memiliki hampir semua karakteristik yang diperlukan. *Lactobacillus* juga dapat menurunkan pH lingkungan dengan mengubah gula menjadi asam laktat. Kondisi ini akan menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri patogen. Keistimewaan inilah yang membuat bakteri *Lactobacillus* menjadi agen untuk bermacam produk probiotik di seluruh dunia.

Beberapa contoh yang telah dipasarkan adalah *Lactobacillus casei* strain Shirota, diproduksi perusahaan dari Jepang. Bakteri ini mampu mengkolonisasi didalam usus, *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 yang merupakan hasil penelitian VTT di Finlandia yang memiliki kemampuan antimikroba terhadap *Candida* dan patogen lain dalam saluran pencernaan. *Lactobacillus reuteri* dihasilkan perusahaan Belgia, Swedia di Eropa, Jenis bakteri ini efektif melawan bakteri patogen penyebab diare pada anak-anak dengan menghasilkan antibakteri reuterin.

Beberapa produk fermentasi yang mengandung bakteri asam laktat adalah :  
Dadih, Kefir, Yogurt, Kimchi, Kombucha dan pangan fermentasi BAL lainnya.

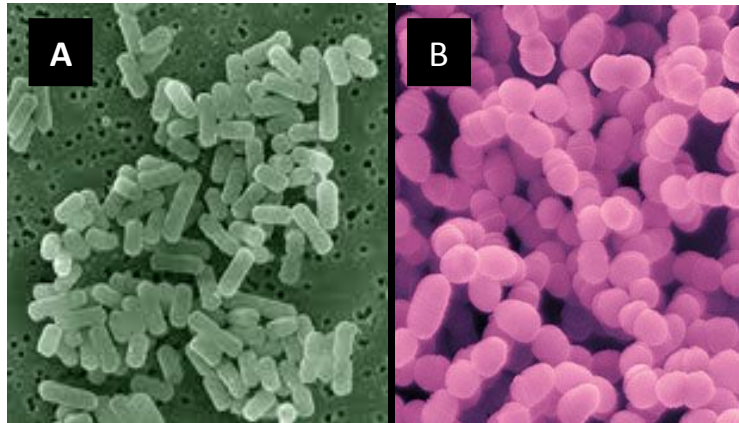


Gambar 1.1: Makanan yang banyak Mengandung BAL

BAL dari genus *Lactobacillus* merupakan bakteri gram positif, anaerobik fakultatif atau mikroaerofilik. berbentuk batang (0,5-1,5 s/d 1,0-10  $\mu\text{m}$ ) dan tidak bergerak (non motil). Genus *Lactococcus* mempunyai ciri-ciri morfologi sebagai berikut: warna koloni putih susu atau agak krem, bentuk koloni bundar atau bulat besar, sel berbentuk bola yang berukuran 0,5-1,2 x 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ .

Genus *Enterococcus*, merupakan bakteri asam laktat gram positif, sel berbentuk coccus (bulat), mesofilik dan homofermentatif, Kemampuan untuk menghasilkan katalase dan oksidase adalah negatif, Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri genus ini adalah 10-45<sup>0</sup>C dan tumbuh baik pada 6,5 % NaCl. Berikut adalah gambar morfologi sel BAL yang berbentuk basil dan coccus.





Gambar 1.2. Morfologi sel BAL berbentuk basil dan coccus (A). *Lactobacillus* (B). *Streptococcus*

Secara alami beberapa habitat yang cocok untuk pertumbuhan BAL adalah produk-produk susu baik yang segar maupun yang difermentasi, bagian tanaman baik yang segar maupun yang telah membusuk, saluran pencernaan hewan dan manusia.

### 1.2 Metabolisme BAL

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolisemenya, bakteri asam laktat dikelompokkan kedalam dua group, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif.

1. Bakteri asam laktat homofermentatif, melibatkan jalur Embden Meyerhof yaitu glikolisis menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO<sub>2</sub> dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak dari pada bakteri asam laktat heterofermentatif.
2. Bakteri asam laktat heterofermentatif, penguraian glukosa oleh BAL melalui jalur pentose fosfat. Pada fermentasi ini yang bekerja adalah enzim fosfoketolase dan dapat menghasilkan asam laktat 40-50 %, etanol, asam asetat dan CO<sub>2</sub>.

Kondisi pertumbuhan yang berbeda bisa menghasilkan produk akhir fermentasi yang berbeda, sebagai akibat dari berubahnya metabolisme piruvat dan penggunaan elektron akseptor

eksternal seperti oksigen atau senyawa organik. Genus *Lactobacillus* terdiri dari 70 spesies dan dikelompokkan menjadi 3 sub grup, kebanyakan homofermentatif, namun ada juga yang heterofermentatif. *Lactobacillus* secara umum lebih tahan terhadap asam dibandingkan dengan genus bakteri asam laktat lainnya.

Tabel 1.1 Karakteristik 3 sub grup genus *Lactobacillus sp.*

Karakteristik	Spesies
<p><b>Homofermentatif</b></p> <p>Produk utama asam laktat (&gt; 85% dari glukosa) tidak menghasilkan gas dari glukosa, mempunyai enzim aldolase, tidak mempunyai fosfoketolase</p> <p>1. Tumbuh pada 45°C, tetapi tidak pada 15°C, sel berbentuk batang panjang.</p> <p>2. Tumbuh pada 15°C, beberapa tumbuh pada 45°C, batang pendek, mempunyai aldolase dan fosfoketolase, fakultatif heterofermentatif.</p>	<p><i>L. Acidophilus</i></p> <p><i>L. Salivarius</i></p> <p><i>L. Helveticus</i></p> <p><i>L. Delbrueckii</i></p> <p><i>L. Plantarum</i></p>
<p><b>Heterofermentatif :</b></p> <p>Menghasilkan kira-kira 50% asam laktat dari glukosa; menghasilkan CO<sub>2</sub> dan etanol, tidak mempunyai enzim aldolase, mempunyai fosfoketolase; berbentuk batang panjang dan pendek</p>	<p><i>L. Fermentum</i></p> <p><i>L. Reuteri</i></p> <p><i>L. Brevis</i></p> <p><i>L. Buchneri</i></p> <p><i>L. Reuteri</i></p>

Pada tabel diatas memperlihatkan bahwa fermentasi homolaktat pada *Lactobacillus* menghasilkan ekuimolar konsentrasi asam laktat dari glukosa, sedangkan heterolaktat menghasilkan lebih dari 50% asam laktat dan juga etanol dan CO<sub>2</sub> sehingga mudah untuk membedakan antara homofermentatif dan heterofermentatif berdasarkan pembentukan gas selama pertumbuhan genus *Lactobacillus sp.* Dalam media yang mengandung glukosa.

Demikian juga dengan mengukur nilai keasaman (pH) kultur medium yang tentunya lebih rendah bagi homofermentatif dibandingkan dengan heterofermentatif. Tabel diatas memperlihatkan bahwa suhu pertumbuhan juga bisa digunakan untuk membedakan spesies *Lactobacillus* secara taksonomi.

### 1.3 Fermentasi Asam Laktat

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel terjadi secara anaerob dengan atau tanpa akseptor eksternal. Gula seperti glukosa, fruktosa dan sukrosa sebagai bahan dasar ketika difermentasi dalam kondisi anaerob akan menghasilkan etanol, asam laktat, asam butirat, aseton dan hidrogen. Sederhana reaksi fermentasi sebagai berikut:

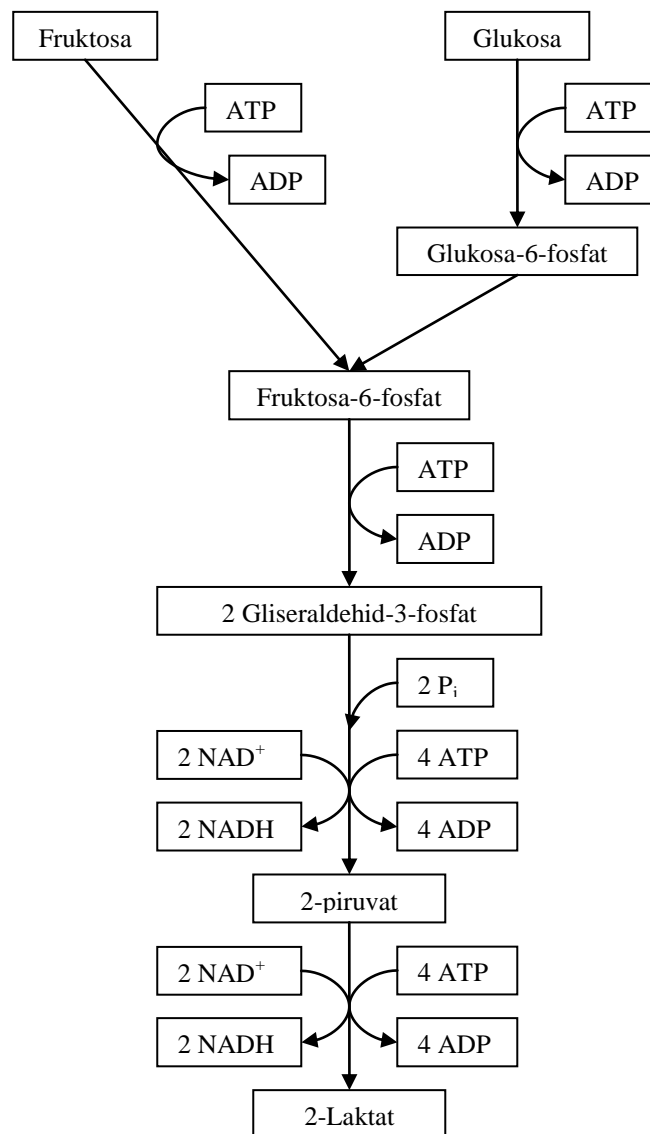


Fermentasi merupakan kegiatan mikroba pada bahan pangan untuk menghasilkan produk yang diinginkan. Mikroba yang umum ditemukan dalam fermentasi adalah bakteri, khamir dan kapang. Fermentasi dapat dilakukan menggunakan kultur murni, kultur alami, kultur tunggal dan kultur campuran. Fermentasi dengan menggunakan kultur alami umumnya dilakukan pada fermentasi tradisional yang memanfaatkan mikroorganisme yang ada di lingkungan. Kultur murni adalah mikroorganisme yang akan digunakan dalam fermentasi dengan sifat dan karakteristik yang telah diketahui dengan pasti sehingga produk yang dihasilkan memiliki stabilitas dan kualitas yang jelas. Dalam proses fermentasi kultur murni dapat digunakan secara tunggal ataupun secara campuran.

Contoh penggunaan kultur murni tunggal adalah *Lactobacillus casei* pada fermentasi susu sedangkan contoh campuran kultur murni adalah fermentasi kecap yang menggunakan *Aspergillus oryzae*, *Pediococcus sp* dan *Saccharomyces rouxii*.

Berdasarkan jalur metabolisme *saccharolytic*, bakteri asam laktat dapat dibedakan menjadi dua kelompok yaitu:

1. Homofermentatif : Bakteri dalam kelompok ini akan mengubah heksosa menjadi asam laktat dalam jalur Embden-Meyerhof (EM), dan tidak dapat memfermentasikan pentosa atau glukonat. Jalur metabolisme homofermentatif.
2. Heterofermentatif : Heksosa difermentasikan menjadi asam laktat, karbon dioksida, dan etanol (atau asam asetat sebagai akseptor elektron alternatif). Pentosa lalu diubah menjadi laktat dan asam asetat. Lihat skema jalur dibawah ini.

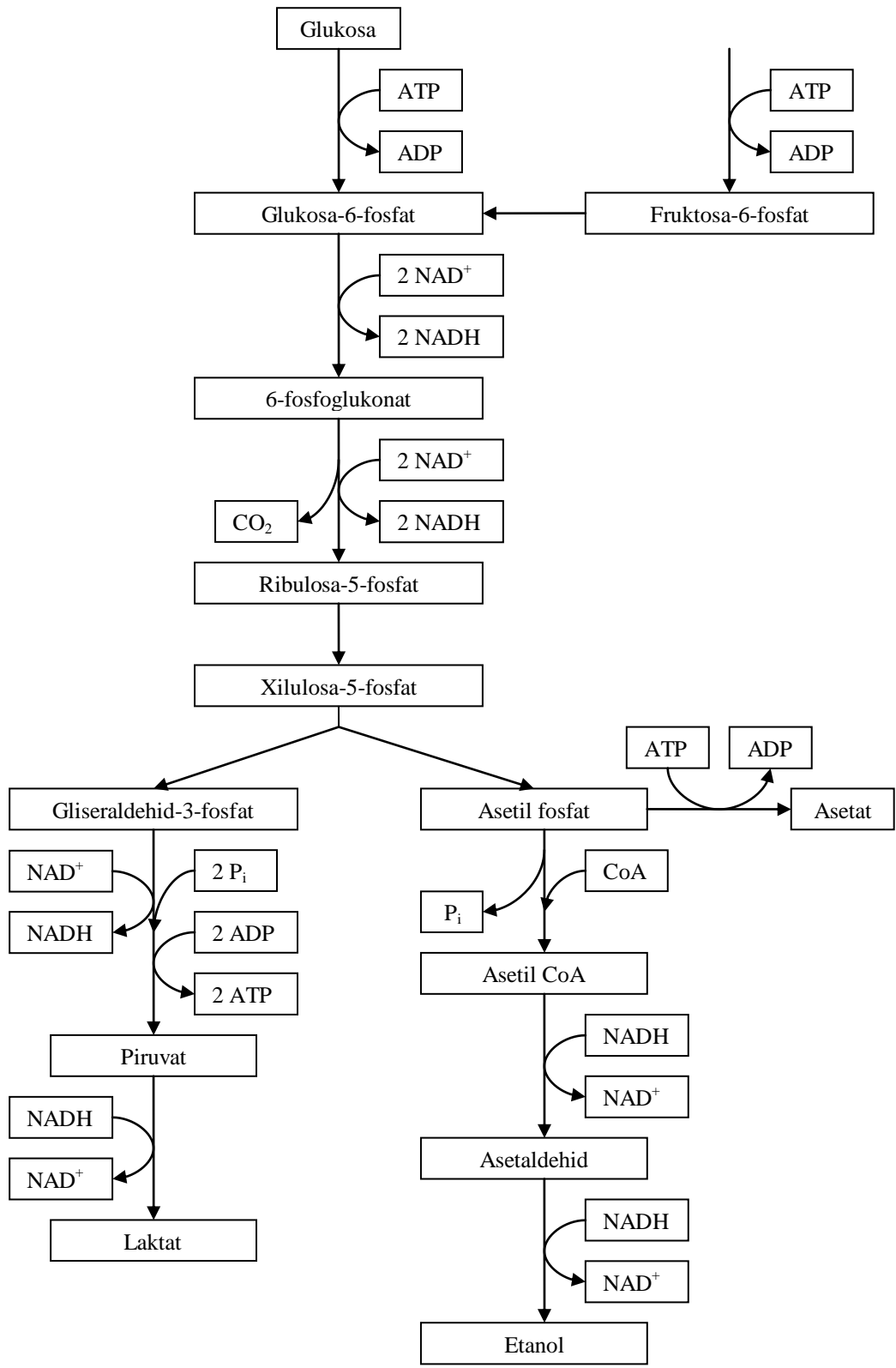


Gambar 1.3: Jalur Homo fermentatif BAL

Nama bakteri asam laktat diperoleh dari kemampuannya dalam memfermentasi gula menjadi asam laktat. Bakteri asam laktat juga terdapat dalam tubuh manusia sebagai flora normal tubuh. Selain pada manusia, bakteri ini juga dapat ditemukan pada produk sayuran dan susu.

Tabel 1.2 : Habitat Bakteri Asam Laktat

<b>Habitat</b>	<b>Kelompok Bakteri</b>	<b>Aktivitas atau produk</b>
Produk sayuran	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ,	Pikel, sauerkraut
Produk susu	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>Leuconostoc mesentroides</i> , <i>L. lactis</i>	Keju, susu, yoghurt
Sistem pencernaan (oral dan usus)	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>S. mutans</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	Flora normal, <i>dental caries</i>
Vagina mamalia	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.	Patogen pada saluran urin Flora normal



Gambar 1.4 : Jalur Heterofermentatif BAL

#### **1.4 Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat (BAL)**

Bakteri probiotik memiliki banyak manfaat untuk kesehatan manusia diantaranya dalam sistem imunitas, sistem intestinal, sistem urogenital, menurunkan efek alergi, dan manfaat-manfaat lainnya. Pada sistem imunitas, probiotik bertanggung jawab dalam merangsang daya tahan tubuh baik selular maupun humoral sehingga dapat melindungi tubuh dari berbagai infeksi. Sistem imunitas menyediakan pertahanan utama melawan mikroorganisme patogen. Penurunan sistem imunitas dapat menyebabkan penyakit tertentu seperti kanker, AIDS, leukemia. Penyakit autoimun seperti rematik dan penyakit radang usus juga dapat terjadi bila sistem imunitas tidak berjalan dengan sempurna.

Kultur bakteri probiotik pada beberapa penelitian dapat meningkatkan rangsangan spesifik dan nonspesifik sehingga dapat mengaktifkan makrofag, meningkatkan sitokinesis, meningkatkan aktivitas sel pembunuh alami, dan meningkatkan imunoglobulin.

Efek biologik yang berhubungan dengan sistem imunitas adalah kemampuan bakteri probiotik melawan bakteri dan virus patogen dan mencegah tumor. Hal ini diduga karena probiotik dapat memperbaiki sistem metabolisme mikroflora sehingga dapat mengurangi jumlah bakteri patogen. Penelitian lain melaporkan bahwa dengan mengonsumsi probiotik yang mengandung *Lactobacillus GG* maka akan merangsang fagositosis dalam meningkatkan sistem imunitas.

Sistem intestinal dan absorpsi nutrisi yang dipengaruhi oleh keseimbangan jumlah mikroflora dan pH pada organ pencernaan sangat penting untuk fungsi pencernaan yang baik. Lambung memiliki pH yang sangat rendah sekitar (1-2). Hal ini penting dalam pencernaan dan melisiskan sel-sel bakteri patogen. Bakteri probiotik mampu mereduksi pH di usus, melancarkan pencernaan dengan memproduksi beberapa enzim pencernaan dan vitamin, memproduksi substansi antibakteri, misalnya asam organik, bacteriosin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, asetaldehid, laktoperoksidase, laktose, dan zat-zat lainnya, dan merekonstruksi mikroflora normal dalam usus.

Bakteri probiotik dapat memelihara integritas usus dan menangani penyakit radang usus. Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri probiotik dapat meningkatkan pergerakan usus dan membebaskan konstipasi, konversi pigmen dan asam empedu, absorpsi zat makanan, bersifat antagonis dengan mikroorganisme patogen. Kemampuan bakteri probiotik menghasilkan bacteriosin mampu membunuh mikroorganisme berbahaya atau patogen. Kemampuan bakteri probiotik untuk menghambat pertumbuhan koloni *Campylobacter jejuni* dan *Escherichia coli* yang menyebabkan pendarahan usus, *Helicobacter pylori* yang menyebabkan radang lambung kronis, ulkus peptikum, serta kanker lambung.

Koloni mikroflora yang didominasi oleh *Lactobacillus* dapat mencegah infeksi *Helicobacter pylori* telah dilaporkan. Banyak hasil penelitian yang menunjukkan bahwa dengan mengonsumsi *Lactobacillus* akan menghasilkan efek positif yang mempengaruhi mikroflora di dalam usus besar dengan cara menurunkan aktivitas beracun dari mikroorganisme serta menjaga gangguan dalam penyerapan air yang dapat mengakibatkan translokasi bakteri ke aliran darah.

Sintesis nutrisi dan bioavailabilitas, fermentasi dengan asam laktat dapat meningkatkan asam folat, niasin, riboflavin, vitamin B12 dan vitamin B6. Bakteri probiotik dapat meningkatkan kemampuan penyerapan beberapa nutrisi seperti protein dan lemak untuk dapat dicerna. Asam laktat, asam propionat, dan asam butirat yang diproduksi oleh bakteri probiotik dapat menjaga pH sehingga dapat melindungi dari mikroorganisme patogen.

## **1.5 Medium Khusus Untuk Pertumbuhan BAL**

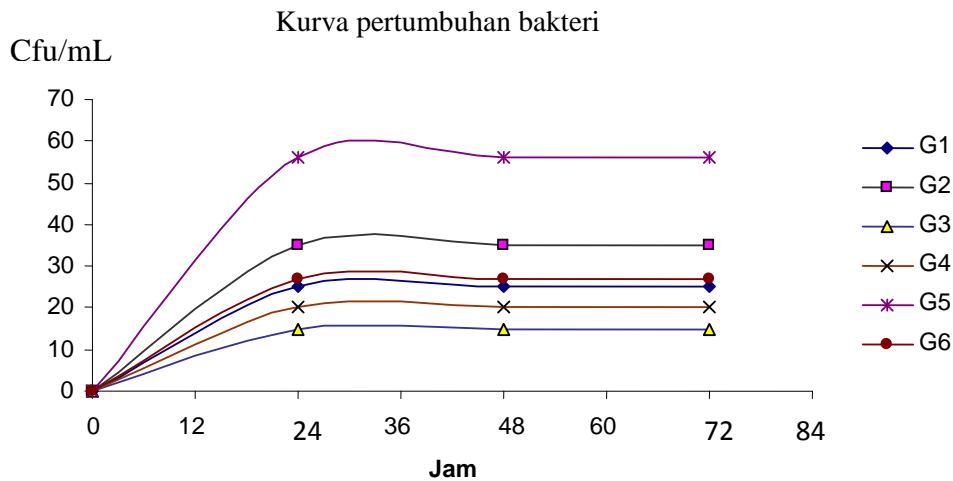
### **Medium MRS Agar**

Media selektif untuk pertumbuhan spesies bakteri asam laktat adalah deMan-Rogosa-Sharpe Agar (MRS Agar). Komposisi media MRS agar pada pH  $6,2 \pm 0,2$  dan suhu  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sebagai berikut:



**Tabel 1.3 Medium MRS**

<b>No.</b>	<b>Komposisi</b>	<b>J umlah</b>
1.	Glukosa	20 gram
2.	Pepton	10 gram
3.	Agar	10 gram
4.	Ekstrak daging	8 gram
5.	Natrium asetat.3H <sub>2</sub> O	5 gram
6.	Ekstrak ragi	4 gram
7.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 gram
8.	Triamonium sitrat	2 gram
9.	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 gram
10.	Sorbiton monooleat	0,05 gram
11.	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,0 ml



Gambar 1.5: Kurva pertumbuhan BAL (G1 s/d G6)

Berdasarkan kurva diatas terlihat bahwa kurva pertumbuhan diawali dengan fase awal (*lag phase*) yang merupakan masa penyesuaian mikroba yang terjadi pada saat beberapa jam setelah dikultur ke media MRS agar. Pada fase tersebut terjadi sintesis enzim oleh sel yang digunakan untuk metabolisme. Reproduksi selular yang terlihat pada 24 jam, dimana jumlah koloni dari setiap isolat mengalami peningkatan, karena pembelahan sel terjadi secara teratur, dan semua senyawa yang diperlukan oleh sel untuk berkembang berada pada keadaan seimbang. Setelah 48 jam dan 72 jam jumlah koloni tidak bertambah, hal ini menandakan bahwa pertumbuhan bakteri mencapai titik maksimum pada 24 jam, fase ini disebut fase ekponensial. Fase stasioner terjadi pada 48 jam sampai dengan 72 jam, dimana pertumbuhan bakteri tidak terjadi lagi. Peningkatan jumlah sel bakteri menyebabkan meningkatnya hasil metabolisme yang bersifat toksik, akibatnya pembelahan terhambat sehingga jumlah bakteri yang hidup jumlahnya tetap. Setelah 72 jam bakteri mulai berubah warna menjadi coklat muda. Fase ini disebut fase kemunduran/ penurunan (*periodof decline*), dimana jumlah bakteri hidup berkurang dan menurun. Hal ini disebabkan oleh substrat atau senyawa tertentu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri pada media biakan mendekati habis dan terjadi penumpukan produk – produk penghambat laju pertumbuhan bakteri tersebut, setelah itu bakteri akan menuju ke fase kematian.

Setelah dilakukan pewarnaan Gram diketahui bahwa keenam isolat merupakan bakteri gram positif, ditandai dengan warna ungu pada penampakan sel bakteri di bawah mikroskop. Ketika sel bakteri ditetesi dengan kristal violet setelah viksasi, maka sel akan mengikat pewarna, interaksi antara sel bakteri dengan kristal violet akan semakin kuat dengan di tambahkan larutan iodine. Kristal violet bersifat basa sehingga mampu berikatan dengan sel mikroorganisme yang bersifat asam. Ketika dicuci dengan etanol, bakteri Gram positif akan tetap mengikat kompleks kristal violet-iodine, sehingga berwarna ungu. Bakteri Gram negatif akan kehilangan kompleks kristal violet-iodine sehingga menjadi tidak berwarna. Pada saat penambahan safranin, bakteri Gram negatif akan menimbulkan warna merah muda, sedangkan bakteri Gram positif tidak mengikat warna lagi.

Bakteri Gram positif yang didapat dari keenam isolat kakao tahan asam memiliki perbedaan morfologi. Empat isolat yaitu G1, G2, G3 dan G6 berbentuk basil, sedangkan G4 dan G5 jenis coccus. G3 dan G6 memiliki morfologi jenis basil yang sama yaitu panjang dan pipih, untuk G1 dan G2 merupakan basil pendek dan gemuk.

#### **Pembuatan media Pepton Water 10 %**

Pepton Water ditimbang 10 gram dalam erlenmeyer 2000 mL dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai benar-benar larut, kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf sebanyak 0,9 mL dan sterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 lb, selama 15 menit.

#### **Pembuatan media Nutrient Agar**

Nutrien Agar ditimbang 28 gram dalam erlenmeyer 2000 mL, lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, dipanaskan sampai homogen kemudian disterilkan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15 lb selama 15 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri steril sebanyak 15mL, lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

## **1.6 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Kakao**

### **Proses Enrichment**

Pulp kakao sebanyak 1 gram dicampurkan kedalam 9 mL MRS Broth (Merk) dengan perbandingan 1 : 9 (w/v) , lalu divortex hingga homogen kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

### **Proses Enrichment**

Pulp kakao sebanyak 1 gram dicampurkan kedalam 9 mL MRS Broth (Merk) dengan perbandingan 1 : 9 (w/v) , lalu divortex hingga homogen kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.

### **Proses Cereal Dilution**

Setelah sampel diinkubasi dilakukan proses pengenceran bertingkat dengan cara mengambil 100µL sampel dari *enrichment*/10<sup>-1</sup> lalu ditambahkan kedalam tabung eppendorf yang berisi 900µL Pepton Water (Bacto) sehingga didapat pengenceran 10<sup>-2</sup> dan seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10<sup>-9</sup>.

### **Proses Plating**

Sampel yang mengandung bakteri diambil 100µL (0,1 mL) dari tabung eppendorf pada pengenceran 10<sup>-7</sup> dan 10<sup>-9</sup> lalu disemprotkan ke media MRS agar bisa dari (Merck) dan diratakan dengan *hokey stick*, kemudian dimasukkan ke dalam jar anerobik dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 48 jam. Koloni BAL tunggal yang tumbuh dipindahkan kembali ke dalam media MRS Agar (Merck) secara gores kemudian dimasukkan dalam desikator dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 48 jam untuk pemurnian dan identifikasi dengan pewarnaan gram.

### **Prinsip isolasi bakteri**

Prinsip dari isolasi BAL adalah memisahkan suatu mikroba dari mikroba lainnya sehingga diperoleh kultur murni. Isolasi Bakteri Asam Laktat diawali dengan melakukan inokulasi sampel pada medium pengaya (*enrichment*) *de Mann, Rogosa, Sharpe Broth* (MRSB)

kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C dalam desikator. Pengayaan dalam MRSB dapat meningkatkan jumlah koloni BAL secara cepat sehingga jumlahnya lebih banyak. Hal ini terjadi karena MRSB secara umum diaplikasikan sebagai media pertumbuhan bakteri asam laktat dan mempunyai nilai pH optimum untuk pertumbuhan BAL yaitu 5,7 yang dapat menekan pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme lain. Inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu yang sesuai dan dibuat sedemikian rupa yang disesuaikan dengan sifat mikroba. Bakteri asam laktat merupakan bakteri mesophilik dimana aktifitas pertumbuhannya pada suhu medium yaitu pada suhu 30<sup>0</sup>C - 40<sup>0</sup>C. Bakteri asam laktat dapat hidup pada saluran pencernaan manusia karena pertumbuhan optimumnya adalah pada suhu 37<sup>0</sup>C yang merupakan temperatur normal tubuh manusia. Selanjutnya inkubasi bakteri asam laktat dilakukan selama 24 jam karena umumnya pada waktu tersebut merupakan fasa logaritmik dimana pembiakan bakteri berlangsung paling cepat dan menunjukkan pertumbuhan sel tertinggi.

Bakteri dalam sampel diisolasi dengan metoda pengenceran bertingkat. Tahap pengenceran menggunakan Pepton Water (Bacto) karena mengandung pepton yang merupakan sumber karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral untuk menggiatkan lagi sel-sel bakteri yang mungkin kehilangan vitalitasnya karena kondisi di dalam sampel yang kurang menguntungkan.

Pepton Water juga mengandung sodium klorida yang dapat mempertahankan keseimbangan osmotik larutan. Pengenceran dilakukan sampai 10<sup>-7</sup> dalam Pepton Water (Bacto) agar konsentrasi bakteri semakin kecil dan ketika diinokulasi ke media MRS Agar akan terbentuk koloni-koloni yang terpisah sebanyak 30-300 total koloni sehingga didapatkan isolat yang tidak TNTC (Too Numerous To Count) yaitu lebih dari 300 koloni. Di bawah ini dapat dicontohkan rata-rata total koloni BAL yang diperoleh dari masing-masing varietas kakao adalah sebagai berikut:

Tabel 1.4: Colony Forming Unit BAL dari fermentasi 3 varitas kakao

	Kakao <i>Criollo</i>	Kakao <i>Forestero</i>	Kakao <i>Trinitario</i>
Colony Forming Unit (CFU/mL)	$3,4 \times 10^8$	$7,9 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$

Dari jumlah total koloni masing-masing varietas kakao di atas dapat memenuhi kriteria yang dinyatakan FAO/WHO sebagai pangan probiotik yaitu berada pada jumlah  $10^6 - 10^8$  CFU/mL.

Beberapa koloni bakteri asam laktat tunggal akan didapatkan yang dianggap sebagai variasi isolat. Setelah itu dilakukan pemurnian isolat bakteri asam laktat dengan cara menstreak koloni-koloni tunggal (*single colony*) ke dalam media MRS Agar.

### 1.7 Identifikasi makroskopis

Kegiatan identifikasi makroskopis yaitu dengan melakukan pengamatan terhadap ukuran dan bentuk koloni bakteri, permukaan/elevasi, warna, dan bentuk pinggir dari bakteri secara visual.

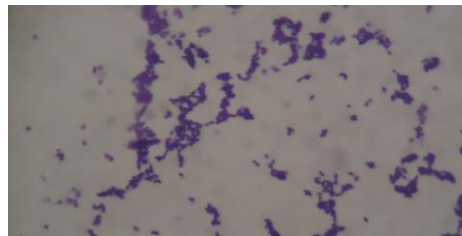
Berdasarkan identifikasi bentuk koloni BAL, penampakan ke-20 koloni BAL pada media MRS Agar berbentuk bundar, berwarna putih susu dengan tepian licin dan elevasi cembung dan ukuran koloni bakteri ada yang sedang, kecil dan besar.



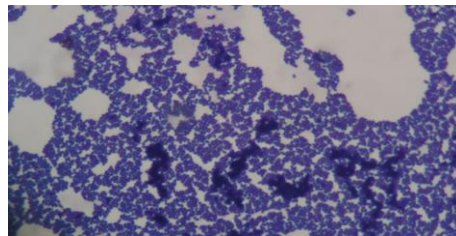
Gambar 1.6: . Penampakan BAL pada Medium MRS Agar

Koloni BAL pada media MRS Agar berwarna putih susu atau (broken white) dengan bentuk bundar. Kegiatan identifikasi mikroskopis yaitu dengan melakukan pewarnaan Gram pada koloni tunggal (*single colony*) bakteri yang didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis serta tidak memiliki membran luar (outer membrane). Sedangkan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada diantara dua lapis membran sel. Gambar dibawah ini menunjukkan hasil pewarnaan Gram dari Bakteri asam laktat untuk varietas *criollo* (Red), *forastero* (Green) dan *Trinitario* (Hibrid).

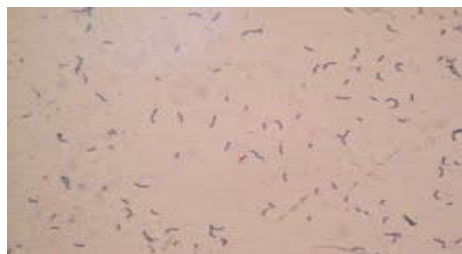
Hasil uji Gram untuk fermentasi kakao Green di dapat koloni BAL (G1, G2, G3, G4, G5 dan G6) yang bersifat tahan pH asam (2-4) dengan bentuk pewarnaan cocus dan basil, seperti pada gambar berikut:



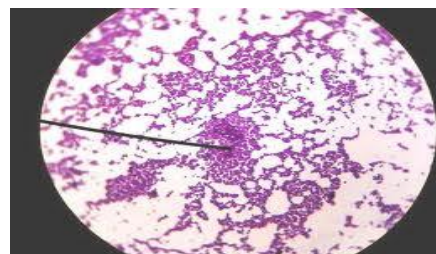
G1



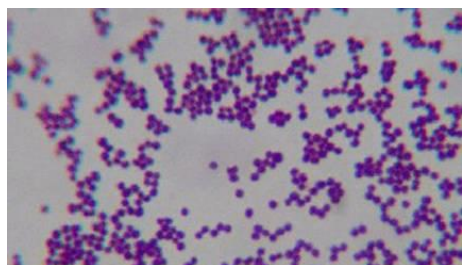
G2



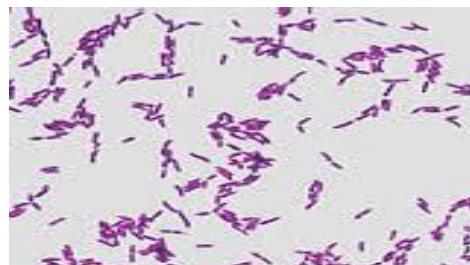
G3



G4



G5



G6

Gambar 1.7: Pewarnaan Gram 6 isolat BAL (G1 s/d G6) tahan asam (1000x)

Bakteri Gram positif yang didapat dari keenam isolat kakao tahan asam memiliki perbedaan morfologi. Empat isolat yaitu G1, G2, G3 dan G6 berbentuk basil, sedangkan G4 dan G5 jenis coccus. G3 dan G6 memiliki morfologi jenis basil yang sama yaitu panjang dan pipih, untuk G1 dan G2 merupakan basil pendek dan gemuk.

Dari hasil pewarnaan Gram diatas didapatkan bakteri Gram positif berbentuk bacil dan coccus dengan warna biru keunguan. Warna ungu dari pewarnaan Gram positif terjadi karena bakteri tersebut menyerap warna dari kristal violet. Bakteri Gram positif akan mengambil warna kristal violet yang berwarna ungu walaupun sudah dicuci dengan alkohol dan ketika diberi safranin yang berwarna merah, bakteri tersebut tetap akan berwarna ungu sedangkan warna merah menunjukkan Gram negatif<sup>5,6,7</sup>.

Hal ini disebabkan juga karena perbedaan peptidoglikan dan permeabilitas membran organisme Gram positif memiliki dinding sel yang cukup tebal (20-80 nm) dan terdiri atas 60 sampai 100 persen peptidoglikan, bersifat kompak dan kurang permeabel sehingga pada saat pemberian kristal violet, maka zat warna tersebut memasuki dinding sel dan pada saat pencucian dengan alkohol, warna ungu yang telah terikat tersebut tidak bisa keluar lagi karena dinding sel yang kompak dan kurang permeabel sehingga warna safranin tidak bisa lagi mewarnai bakteri Gram positif, sebaliknya dinding sel Gram negatif mengandung lebih sedikit peptidoglikan (10 sampai 20 persen), kurang kompak dan lebih permeabel<sup>8</sup>.

Pada saat pemberian kristal violet yang berwarna ungu, maka zat warna tersebut akan larut pada saat pencucian dengan alkohol, dan pada saat pemberian safranin maka zat warna tersebutlah yang mewarnai bakteri Gram negatif

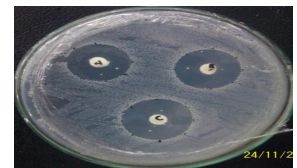
#### 1.8 Daftar Pustaka:

1. Clarride, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious diseases. 17 (4): 840 – 862



2. Cho, Il Jae., Nam Keun Lee., Young Tae Hahm. (2009) Characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of breast-feeding piglets. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108, 3, 194–198
3. Khunajakr, Nongpanga., Aporn, Wongwicharn., Duangtip, Moonmangmee., Sukon, Tantipaiboonvut. (2008). Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Compounds from Pig Gastrointestinal tracts. *Journal of Science and Technology*. 8(1): 8 – 15
4. Kostinek, Melanie., Luis, Ban., Margaret, Ottah., David, Teniola., Ulrich, Schilinger., Wilhem, Hotzapfel., Charles, Franz. (2008). Diversity of Predominant Lactic Acid Bacteria Associated with Cocoa Fermentation in Nigeria. *Journal of Spinger Science*. 556: 306 – 314
5. Syukur , S.,Purwati , E., *Bioteknologi Probiotik Untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat*, Andi Yogyakarta, ISBN: 978-979-29-3998-9
6. Syukur S., Fachrur R., Jamsari, Endang P. Isolation, DNA Molecular Characterization Of Lactic Acid Bacteria Potential For Probiotic, Antimicrobial, And Lead (Pb) Binding Ability; Isolated From Dadih In Sijunjung, West Sumatera, Indonesia. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5(6): (871 – 876). 2014
7. Rajagukguk' H., Syukur,S', SyafrizayantI, Zulaiha , S., Syaputr, Y., Purwati , E., and Hitoshi Iwahashi STRONG ANTIMICROBIAL OF LACTIC ACID BACTERIA AND SPECIES IDENTIFICATION OF VIRGIN COCONUT OIL PRODUCTS IN PADANG WEST SUMATERA, INDONESIA, *IJASEIT*,2017
8. Syukur S, Hermansyah A, Fachrial E, Probiotic strong antimicrobial of buffalo milk fermentation (Dadiah) from different places in west Sumatra Indonesia, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(6)pp 386. 2016

## BAB II. UJI ANTIMIKROBA BAL

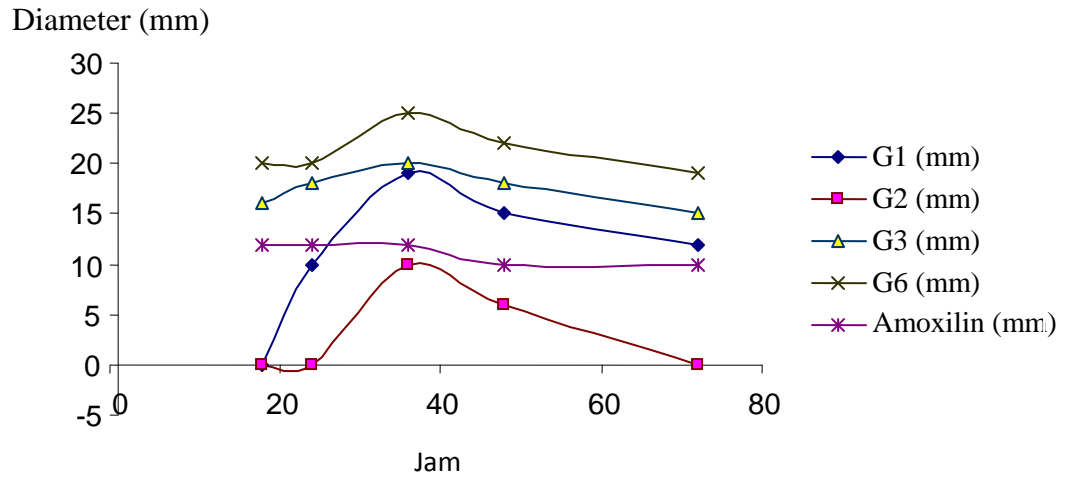


### 2.1 Uji Anti Mikroba

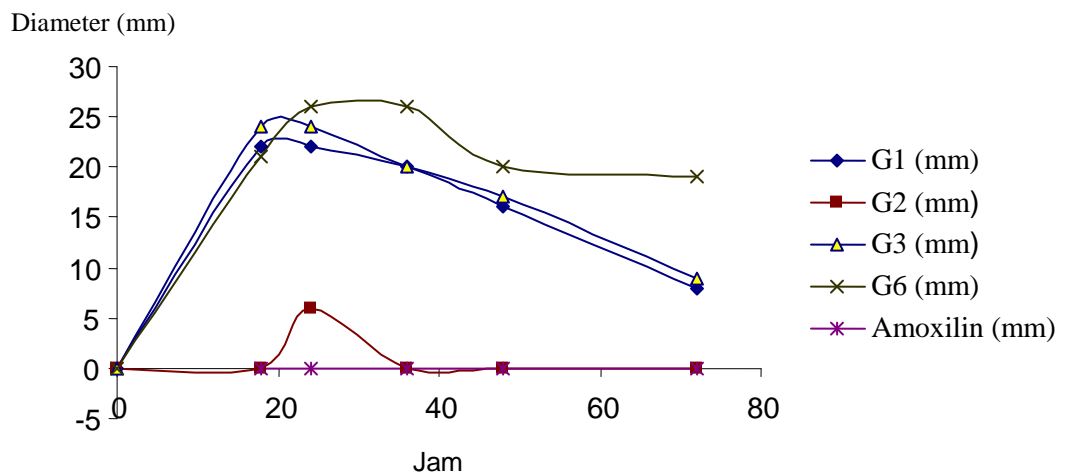
Salah satu keutamaaan probiotik adalah bersifat sebagai anti mikroba dimana metabolit sekunder yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Beberapa yang terdapat pada tubuh manusia seperti *Helicobacter pylory*, *E. coli*, dan *Salmonella*. Salah satu bakteri patogen yang banyak ditemukan pada usus besar manusia sebagai flora normal yaitu *E.coli*, penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen ini seperti, infeksi saluran kemih, Pneunomia, Meningitis, infeksi luka di dalam abdomen dan diare<sup>1,2</sup>.

*Salmonella* dapat menyebabkan berbagai macam infeksi, mulai dari gastroenteritis, tifus, dan bakteremia. Didasarkan pada literatur diatas, maka bakteri patogen yang digunakan pada uji anti mikroba yaitu *E. coli*, dan *Salmonella*, karena dapat mengganggu kesehatan dan merupakan

bakteri normal yang terdapat pada pencernaan manusia. Uji anti mikroba dilakukan dengan menggunakan metoda difusi cakram. Diameter zona bening yang dihasilkan dapat diukur besarnya dalam (mm), seperti grafik dibawah ini pada uji antimikroba BAL terhadap bakteri *E.coli* pada fermentasi kakao<sup>4</sup>.



Gambar 2.1: Diameter zona bening terhadap *E.coli*



Gambar 2.2: Diameter zona bening terhadap bakteri *E. coli* dan *Salmonella* Inkubasi dilakukan pada 37°C, pada media Nutrient agar

Pada grafik diatas dapat digunakan antibiotik untuk uji anti mikroba seperti amoxilin sebagai kontrol, karena amoxilin merupakan antibiotik yang umum digunakan dibidang kesehatan, aktivitas antimikrobanya tinggi terhadap bakteri gram negatif dan dapat diabsorpsi lebih baik dari pada antibiotik lain seperti ampisilin, Penisilin G, dan Nafsilin. Besarnya zona bening yang ditunjukkan oleh amoxilin untuk *E.coli* berdiameter 12 mm. *Salmonella* resistan terhadap amoxilin, karena tidak menunjukkan adanya zona bening. Hal ini dapat disebabkan oleh diproduksinya enzim yang dapat merusak daya kerja obat, terjadinya perubahan pada tempat/ lokus didalam sel bakteri yang menjadi target obat, dan terjadinya perubahan jalur metabolisme bakteri. Diameter zona bening dari amoxilin tidak mengalami perubahan yang signifikan hingga 72 jam<sup>3,4</sup>.

Isolat G3 dan G6 memperlihatkan peningkatan sintesis senyawa antimikroba pada 18 jam, dimana pada fase eksponensial terjadi peningkatan produksi metabolit sekunder (senyawa antimikroba). Pertumbuhan zona bening terhadap *E.coli* maksimum untuk semua isolat pada 36 jam. Zona bening terhadap *Salmonella* maksimum pada 18 – 24 jam, sehingga pada 18 – 36 jam merupakan waktu yang bagus untuk mengisolasi senyawa antimikroba, dimana pada saat tersebut merupakan waktu maksimum bagi bakteri untuk menghasilkan senyawa antimikroba, seperti bakteriosin yang merupakan suatu protein ekstraseluler yang dapat menghambat sintesis protein dan DNA bakteri patogen tanpa menyebabkan sel bakteri patogen lisis, dan asam laktat hasil dari fermentasi karbohidrat pada bakteri yang menyebabkan suasana asam yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Diameter zona bening mulai berkurang setelah 48 jam, karena fase ini merupakan fase stasioner selanjutnya menuju fase kematian pada bakteri. Pada fase tersebut, senyawa yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mulai habis, sedangkan bakteri patogen mulai berkembang dan resisten<sup>4,5,6</sup>.

Dilihat dari ukuran diameter zona bening yang dihasilkan pada waktu – waktu maksimum, keempat isolat terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang terdapat pada

pencernaan manusia. Berdasarkan pada pengelompokan kemampuan daya hambat dari pertumbuhan bakteri patogen, Isolat G1, G3, dan G6 memiliki daya hambat yang sangat kuat terhadap *Salmonella*. Isolat G6 memiliki daya hambat yang sangat kuat terhadap *E.coli*, sedangkan G1 dan G2 memiliki daya hambat yang kuat. Isolat G2 memiliki daya hambat yang sedang terhadap *E.coli* dan *Salmonella*. Sehingga keempat isolat memenuhi salah satu syarat sebagai probiotik<sup>4,7</sup>.

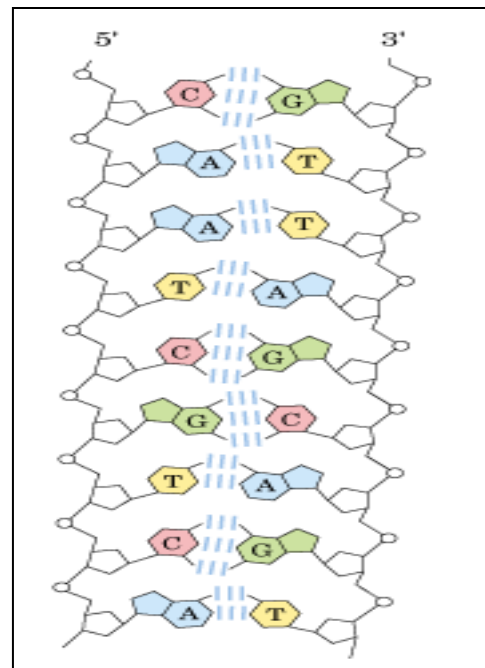
## 2.2 Daftar Pustaka

1. Grajek, Wlodzimier., Anna, Olejnik., Anna, Sip. (2005). Proboitics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods. *Acta Biochimica Polonica*. 52(3): 665 – 671
2. Khunajakr, Nongpanga., Aporn, Wongwicharn., Duangtip, Moonmangmee., Sukon, Tantipaiboonvut. (2008). Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Compounds from Pig Gastrointestinal tracts. *Journal of Science and Technology*. 8(1): 8 – 15
3. Kostinek, Melanie., Luis, Ban., Margaret, Ottah., David, Teniola., Ulrich, Schilinger., Wilhem, Hotzapfel., Charles, Franz. (2008). Diversity of Predominant Lactic Acid Bacteria Associated with Cocoa Fermentation in Nigeria. *Journal of Spinger Science*. 556: 306 – 314
4. Armaini, Dharma, A., Munaf, E., Syukur, S, jamsari, Chracterization of cellulases of thermopiles bacteria from Rimbo Panti hot spring, West Sumatera, Indonesia, *Asian Journal of Chemistry* 25 (12) ,pp.6761, 2013
5. Syukur , S.,Purwati , E., *Bioteknologi Probiotik Untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat*, Andi Yogyakarta, ISBN: 978-979-29-3998-9
6. Syukur S, Hermansyah A, Fachrial E, Probiotic strong antimicrobial of buffalo milk fermentation (Dadih) from different places in west Sumatra Indonesia, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(6)pp 386. 2016

### BAB III. IDENTIFIKASI MOLEKULAR DNA

#### 3.1 Struktur DNA

DNA terdiri atas dua utas rantai *polinukleotida* yang saling berpilin membentuk heliks ganda (*double helix*). Sejak ditemukannya struktur kimia DNA oleh James Watson dan Francis Crick yang memenangkan Nobel di tahun 1962 bersama dengan Rosalind Franklin, banyak penelitian mengenai DNA untuk mendapatkan pemahaman materi genetik, yaitu DNA. Pemahaman yang baik mengenai struktur dan fungsi DNA didalam sel telah mengantarkan negara maju untuk melakukan berbagai penelitian bioteknologi berbasis penelitian rekayasa DNA, hingga produk bioteknologi sangat bermanfaat bagi kehidupan<sup>5,6,7,8</sup>.



**Struktur**

Gambar 3.1. Struktur DNA

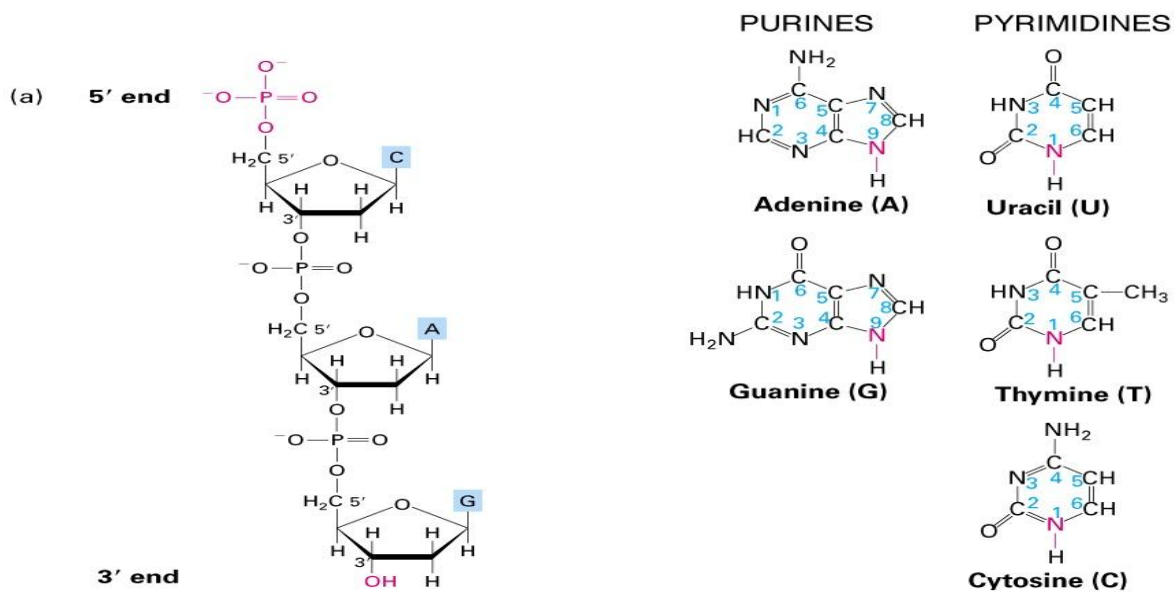
*Untuk menguasai perkembangan Bioteknologi diatas yang harus dikuasai adalah bagaimana struktur DNA atau sekuensing basa basa DNA yang dinyatakan mempunyai fungsi tertentu.*

Struktur kimia DNA pada di atas terdiri dari polimer berupa rantai panjang dari nukleotida, dimana satu monomer nukleotidanya terdiri dari satu **gugus fosfat**, satu komponen **gula pentosa (5-karbon)**, dan **satu basa nitrogen**. Satu-satunya yang dapat membedakan fungsi DNA adalah susunan (sequence) dari basa nitrogen penyusunnya. Hanya ada 4 kemungkinan basa yang terdapat pada tiap satu **nukleotida DNA**, yaitu *adenine* (A), *guanine* (G), *thymine* (T), atau *cytosine* (C). Variasi urutan dari keempat basa-basa tersebut membentuk suatu kode genetik, dimana DNA suatu informasi genetik yang berbeda-beda dapat diwariskan pada keturunan makhluk hidup<sup>5,6</sup>.

Menurut *Erwin Chargaff*, menerangkan lebih jauh pada basa-basa yang terkandung dalam DNA, menyatakan bahwa persentase *adenine* (A) di dalam DNA selalu sama dengan persentase *thymine* (T), dan persentase *guanine* (G) selalu sama dengan persentase *cytosine* (C). memperkirakan bahwa basa A selalu berpasangan dengan basa T sedangkan basa G selalu berpasangan dengan basa C oleh karena adanya ikatan hidrogen dalam rantai DNA. Oleh karena itu, **A dan T serta G dan C**, merupakan pasangan basa yang disebut juga sebagai **komplemen**. Jika satu rantai DNA terkode ATGCCAGT, maka rantai pasangannya atau komplemennya adalah TACGGTCA yang dihubungkan oleh beberapa ikatan hidrogen

*Antara satu nukleotida dengan nukleotida lain dihubungkan dengan ikatan fosfodiester antara fosfat dengan deoksiribosa (arah 5' -> 3').*

DNA (*deoxyribonucleic acid*) pada gambar di atas berupa dua untai yang pada rantainya tersusun basa basa nukleotida A, G,C dan T . Kedua untai ganda DNA disatukan oleh **ikatan hidrogen** antara basa-basa yang terdapat pada kedua untai tersebut. merupakan informasi genetik yang dapat diwariskan pada generasi berikutnya dan tersimpan dalam sel makhluk hidup. Informasi genetik ini pada dasarnya merupakan kumpulan instruksi/perintah yang mengatur sel untuk bisa melakukan hal-hal tertentu didalam sel<sup>1,2,3</sup>.



Gambar 3.2 : Suatu unit monomer DNA single strand (kiri) basa purin dan pirimidin (kanan)

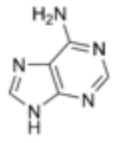
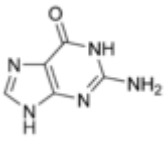
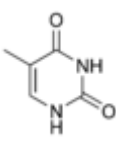
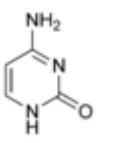
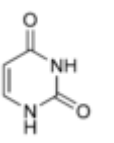
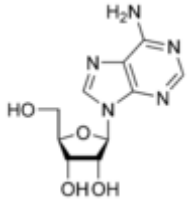
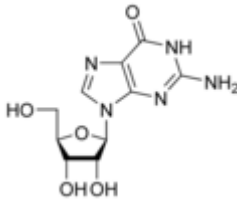
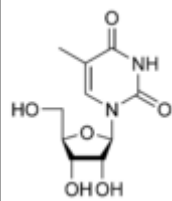
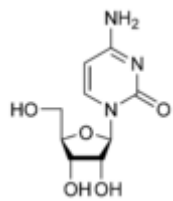
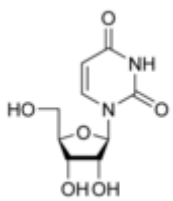
Sebuah unit monomer DNA yang terdiri dari ketiga komponen (gula ribosa, basa Nitrogen dan pospat) dinamakan nukleotida, sehingga DNA yang panjang tergolong sebagai *polinukleotida*.

*Nukleotida terdiri dari basa Purin (A dan G) dan basa Pirimidin (C dan T pada DNA, Uracil pada RNA).*

Rantai DNA memiliki **lebar 22-24 Å**, sementara panjang **satu unit nukleotida 3,3 Å**. Walaupun unit monomer ini sangatlah kecil, DNA dapat memiliki jutaan nukleotida yang terangkai seperti rantai. Misalnya, kromosom terbesar pada manusia terdiri atas **220 juta nukleotida**.

Rangka utama untai DNA terdiri dari gugus fosfat dan gula yang berselang-seling. Gula pada DNA adalah gula pentosa (berkarbon lima), yaitu 2-deoksiribosa. Dua gugus gula terhubung dengan fosfat melalui **ikatan fosfodiester** antara atom **karbon ketiga** pada **cincin satu gula** dan atom **karbon kelima** pada **gula lainnya**. Salah satu perbedaan utama DNA dan RNA adalah gula penyusunnya; gula **RNA adalah ribosa**. Struktur kimia basa nukleotida dan nukleosida dapat dipelajari dibawah ini<sup>2,3,4</sup>

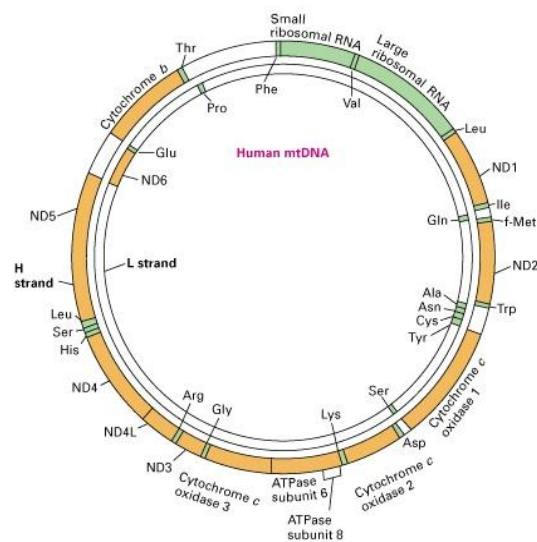


<b>Basa nukleotida</b>	 <u>Adenina</u>	 <u>Guanina</u>	 <u>Timina</u>	 <u>Sitosina</u>	 <u>Urasil</u>
<b>Nukleosida</b>	 <u>Adenosina</u> A	 <u>Guanosina</u> G	 <u>Timidina</u> T	 <u>Sitidina</u> C	 <u>Uridina</u> U

Gambar 3.3 : Struktur Kimia basa nukleotida dan nukleosida

### 3.2 DNA Mitokondria

DNA mitokondria (disingkat mtDNA) adalah materi genetik DNA yang terdapat di dalam mitokondria. Mitokondria merupakan organel sel memiliki struktur khas dengan bentuk bulat dalam sel. Fungsi mitokondria adalah tempat berlangsungnya proses posporilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam sel atau biasa disebut tempat respirasi sel, Energi ini diperoleh dari proses metabolisme makanan<sup>5,5,7</sup>.



Gambar 3.4 Mt Human Mitochondria

- Mitochondria terdiri dari mtDNA molecules L strand dan H strand
- Gene mtDNA bersifat cytoplasmic inheritance dan mempunyai kode rRNAs, tRNAs, dan mitochondrial protein
- Ukuran bp basa DNA mtDNA bervariasi untuk organisms
- Mutasi pada mtDNA menyebabkan genetic diseases pada human

Di dalam sel mitokondria terdapat ratusan ribu mitokondria yang terdapat di sitoplasma sel. Mitokondria memiliki materi genetik sendiri yang karakteristiknya berbeda dengan materi genetik di inti sel.

Perbedaan DNA mitokondria dan DNA inti sebagai berikut :

### 1. Letak

DNA mitokondria terletak di dalam mitokondria, mitokondria adalah organel sel. Sedangkan DNA inti sel terletak di dalam inti sel. mtDNA terletak di matriks mitokondria berdekatan dengan membran dalam mitokondria, tempat berlangsungnya reaksi fosforilasi oksidatif yang menghasilkan radikal oksigen sebagai produk samping.

### 2. Laju Mutasi lebih cepat

Laju mutasi DNA mitokondria lebih tinggi sekitar 10-17 kali dibandingkan DNA inti. Karena mtDNA tidak memiliki mekanisme reparasi yang efisien. DNA polimerase yang dimiliki oleh mitokondria adalah DNA polimerase  $\gamma$  yang tidak mempunyai aktivitas proofreading (suatu proses perbaikan dan pengakuratan dalam replikasi DNA). Tidak adanya aktivitas ini menyebabkan mtDNA tidak memiliki sistem perbaikan yang dapat menghilangkan kesalahan replikasi. Replikasi mtDNA yang tidak akurat ini akan menyebabkan mutasi mudah terjadi<sup>1,2,3</sup>.

### 3. Tidak memiliki protein histon.

Pada DNA inti, disusun dalam bentuk yang khas, dengan adanya beberapa macam protein histon sehingga bentuknya seperti berpilin-pilin.

### 4. Jumlah Lebih Banyak dan Ukuran genom lebih kecil

DNA mitokondria mempunyai jumlah lebih banyak jika dibandingkan DNA inti, karena jumlah mitokondria banyak di dalam sel. Dari segi ukuran genom, genom DNA mitokondria relatif lebih kecil.

## **5. Hanya diwariskan dari Ibu**

DNA mitokondria diwariskan hanya dari ibu, sedangkan DNA inti dari kedua orang tua (dari DNA ayah dan ibu). Pada saat pembuahan sel, sel sperma hanya berpusi materi DNA saja, sedangkan bagian-bagian sel sperma lain tidak. Sehingga DNA mitokondria pada anak hanya dari ibu.

## **6. Bentuknya Lingkaran dan sirkuler**

DNA mitokondria berbentuk lingkaran, berpilin ganda, sirkular, dan tidak terlindungi membran (prokariotik). Sedangkan bentuk DNA inti panjang tidak sirkuler, double helik, pada saat akan pembelahan sel berbentuk kromosom.

## **7. Tidak memiliki intron**

DNA mitokondria tidak memiliki intron dan semua gen pengkode terletak berdampingan, sedangkan pada DNA inti terdapat ekson dan intron, pada saat sintesis protein terjadi pemotongan intron yaitu pada pemerosesan mRNA.

## **8. Haploid (2n)**

DNA mitokondria bersifat haploid karena hanya berasal dari ibu.

## **9. Stop kodonnya berbeda**

Salah satu bentuk keunikan lainnya dari mitokondria adalah perbedaan kode genetik mitokondria menunjukkan perbedaan dalam hal pengenalan kodon universal. UGA tidak dibaca sebagai “berhenti” (stop) melainkan sebagai tryptofan, AGA dan AGG tidak dibaca sebagai arginin melainkan sebagai “berhenti”, AUA dibaca sebagai methionin.

## **10. DNA mitokondria mempunyai daerah yang tidak mengode dari mtDNA.**

Daerah ini mengandung daerah yang memiliki variasi tinggi yang disebut displacement loop (D-loop). D-loop merupakan daerah beruntai tiga (triple stranded) untai ketiga lebih dikenal sebagai 7S DNA. D-loop memiliki dua daerah dengan laju polymorphism yang tinggi sehingga urutannya sangat bervariasi antar individu, yaitu Hypervariable I (HVSI) dan

Hypervariable II (HVSII). Daerah non-coding juga mengandung daerah pengontrol karena mempunyai origin of replication untuk untai H (OH) dan promotor transkripsi untuk untai H dan L (PL dan PH) (Anderson et al., 1981). Selain itu, **daerah non-coding juga mengandung tiga daerah lestari yang disebut dengan conserved sequence block (CSB) I, II, III**. Daerah yang lestari ini diduga memiliki peranan penting dalam replikasi mtDNA<sup>3,4,5</sup>.

MtDNA diwariskan secara maternal. Sel telur memiliki jumlah mitokondria yang lebih banyak dibandingkan sel sperma, yaitu sekitar 100.000 molekul sedangkan sel sperma hanya memiliki sekitar 100-1500 mtDNA. Dalam sel sperma mitokondria banyak terkandung dalam bagian ekor karena bagian ini yang sangat aktif bergerak sehingga membutuhkan banyak ATP.

Pada saat terjadi pembuahan sel telur, bagian ekor sperma dilepaskan sehingga hanya sedikit atau hampir tidak ada mtDNA yang masuk ke dalam sel telur. Hal ini berarti bahwa sumbangan secara paternal hanya berjumlah 100 mitokondria. Apalagi dalam proses pertumbuhan sel, jumlah mtDNA secara paternal semakin berkurang. Maka jika dibandingkan dengan sumbangan secara maternal yaitu 100.000, maka sumbangan secara paternal hanya 0,01%. Oleh karena itu dapat dianggap tidak terjadi rekombinasi sehingga dapat dikatakan bahwa mtDNA bersifat haploid, diturunkan dari ibu ke seluruh keturunannya.

### **3.3 Fungsi Biologi DNA**

#### **1. Replikasi/Penggandaan DNA**

Replikasi merupakan proses pelipat gandaan DNA. Proses replikasi ini diperlukan ketika sel akan **membelah diri** untuk memperbanyak atau tumbuh. Pada setiap sel, kecuali sel gamet, pembelahan diri sel harus disertai dengan replikasi DNA supaya semua sel turunan memiliki informasi genetik yang sama. Pada dasarnya, proses replikasi memanfaatkan fakta bahwa DNA terdiri dari dua rantai dan rantai yang satu merupakan komplemen atau pasangan dari rantai pasangannya. Dengan kata lain, dengan mengetahui susunan basa DNA satu rantai, maka susunan basa rantai pasangannya dapat dengan mudah dibentuk.

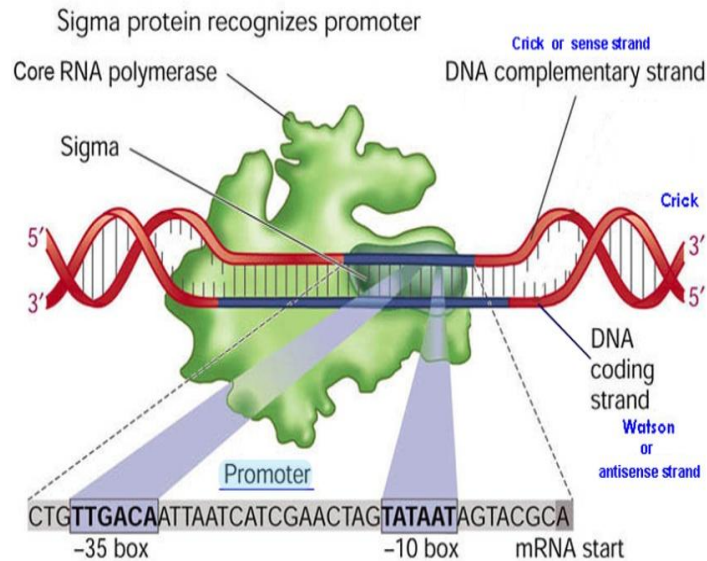
Ada beberapa teori yang mencoba menjelaskan bagaimana proses replikasi DNA ini terjadi. Salah satu teori yang paling populer menyatakan bahwa pada masing-masing DNA baru yang

diperoleh pada akhir proses replikasi; satu rantai tunggal merupakan rantai DNA dari rantai DNA sebelumnya, sedangkan rantai pasangannya merupakan rantai yang baru disintesis. Rantai tunggal yang diperoleh dari DNA sebelumnya tersebut bertindak sebagai "**cetakan**" atau (template) untuk membuat rantai pasangannya. Proses replikasi memerlukan protein atau enzim pembantu; salah satu yang terpenting dikenal dengan nama **DNA polimerase**, yang merupakan enzim pembantu pembentukan rantai DNA baru yang merupakan suatu polimer. Proses replikasi diawali dengan pembukaan untai ganda DNA pada titik-titik pengenalan (**recognition sites**) tertentu di sepanjang rantai DNA<sup>1,2,3</sup>. Proses pembukaan rantai DNA ini dibantu oleh **enzim helikase** yang dapat mengenali titik-titik tersebut, dan enzim girase yang mampu membuka pilinan rantai DNA. DNA polimerase akan dapat masuk dan mengikat diri pada kedua rantai DNA yang sudah terbuka secara lokal tersebut. Proses pembukaan rantai ganda tersebut berlangsung disertai dengan pergeseran atau pergerakan DNA polimerase mengikuti arah membukanya rantai ganda. Monomer DNA ditambahkan di kedua sisi rantai yang membuka setiap kali DNA polimerase bergeser. Hal ini berlanjut sampai seluruh rantai telah benar-benar terpisah. Proses replikasi DNA ini merupakan proses yang **rumit dan kompleks**, namun proses sintesis rantai DNA baru memiliki suatu mekanisme yang mencegah terjadinya kesalahan pemasukan monomer yang dapat berakibat fatal. Karena mekanisme inilah kemungkinan terjadinya kesalahan sintesis amatlah kecil. Kemudian, sepasang utas DNA tersebut (utas DNA cetakan+utas DNA yang baru) saling membentuk utas DNA utuh yang baru dan memiliki kode genetik yang sama dengan utas ganda DNA sebelumnya. Jadi, proses penggandaan tersebut menghasilkan 2 molekul DNA yang sama, yakni satu utas ganda DNA lama dan baru. Oleh karena itu, proses ini dikenal sebagai *semiconservative replication* (penggandaan semikonservatif) karena satu rantai DNA menghasilkan satu rantai DNA baru yang sama.

## 2. Transkripsi

Transkripsi merupakan **pembentukan/sintesis RNA** dari salah satu rantai DNA yang berasal dari ujung 3' ke 5', sehingga terjadi proses pemindahan informasi genetik dari DNA ke RNA. Sintesis mRNA dimulai dari ujung 5' ke arah 3'. Fungsi ini disebut fungsi **heterokatalis** DNA karena DNA mampu mensintesis senyawa lain yaitu RNA. Sebuah rantai DNA digunakan untuk

mencetak rantai tunggal **mRNA** dengan bantuan enzim polimerase. Enzim tersebut menempel pada **kodon permulaan (AUG)**,



Gambar 3.5 Transkripsi Prokaryot, TATA Box

Pada gambar diatas dapat dipelajari **struktur gen dari sel prokaryot**, yang terdiri dari Promotor, Operator, TATA box, bagian struktural, dan terminator.

Promotor adalah **urutan basa DNA spesifik** yang berperan dalam **mengendalikan transkripsi** gen struktural dan terletak di daerah *upstream* (hulu) dari bagian struktural gen<sup>4,5,6</sup>.

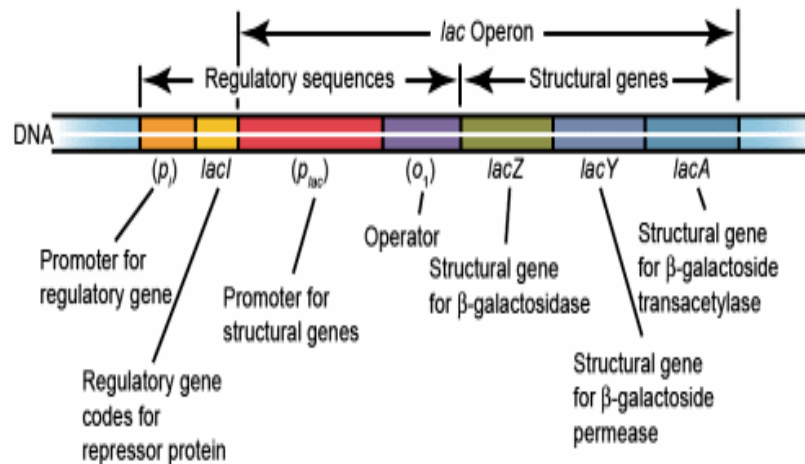
*Ada juga yang dikenal dengan pribnow box. Pribnow box merupakan daerah tempat pembukaan/pengenalan heliks DNA untuk membentuk kompleks promotor untuk terjadinya pembukaan rantai.*

**Fungsi promotor** adalah sebagai tempat awal pelekatan atau penempelan enzim RNA polimerase yang nantinya melakukan transkripsi pada bagian gen struktural.

Pada prokariot bagian penting **promotornya** disebut sebagai **Pribnow box** terdapat pada urutan nukleotida **-10 dan -35. Biasanya berupa TATA box.**

*Kontrol ekpresi gen sangat dipengaruhi oleh adanya zat Represor dan Inducer/Enhancer, pengaturan (regulatory) dapat dijelaskan dengan contoh adanya lac.operon seperti dibawah ini.*

**Operator** merupakan urutan nukleotida yang terletak di antara promotor dan bagian struktural dan merupakan tempat pelekatan protein represor (penekan atau penghambat ekspresi gen).



Gambar 3.6 Sistem Regulasi/pengaturan ekspresi gen

Jika ada represor yang melekat di gen operator maka RNA polimerase tidak bisa jalan terus arah ke ujung 3' sehingga ekspresi gen berupa protein tidak bisa berlangsung<sup>7,8</sup>.

Selain adanya gen supresor ada juga gen enhancer/inducer, yang bekerja kebalikannya justru dapat meningkatkan transkripsi dengan **meningkatkan jumlah RNA polimerase**. Namun letaknya tidak pada lokasi yg spesifik seperti operator, ada yg jauh di *upstream* atau bahkan *downstream* dari titik awal transkripsi.

**Daerah DNA Coding Region**, seperti Gen struktural merupakan bagian yang mengkode urutan nukleotida mRNA. Transkripsi dimulai dari sekuens inisiasi transkripsi (**AUG**) sampai kodon stop (**UAA / UGA / UAG**).

Pada prokariot tidak ada sekuens intron (yg tidak dapat diekspresikan) sehingga semuanya berupa ekson. Namun kadang pada archaebacteria dan bakteriofag ada yg memiliki intron. Sedangkan waktu melakukan pada sel **Eukaryotik terdapat intron**, yang harus dipotong kloning.

Gen terminator dicirikan dengan struktur jepit rambut / *hairpin* dan lengkungan yang kaya yang akan urutan **GC** yang terbentuk pada molekul RNA hasil transkripsi.

Umumnya adalah **kodon** untuk asam **amino metionin**. Pertama-tama, ikatan hidrogen di bagian DNA yang disalin terbuka. Akibatnya, dua utas DNA berpisah. Salah satu polinukleotida berfungsi sebagai pencetak atau **sense**, yang lain sebagai gen atau **antisense**. Misalnya pencetak DNA memiliki urutan basa **G-A-G-A-C-T** , dan yang berfungsi sebagai gen memiliki urutan basa **komplemen C-T-C-T-G-A** . Karena pencetaknya G-A-G-A-C-T, maka **mRNA** hasil cetaknya **C-U-C-U-G-A**. Jadi, RNA C-U-C-U-G-A merupakan hasil kopian dari DNA C-T-C-T-G-A (gen), dan merupakan komplemen dari pencetak.

Transkripsi DNA akan menghasilkan mRNA (messenger RNA).

Pada organisme eukariot, mRNA yang dihasilkan itu tidak langsung dapat berfungsi dalam sintesis polipeptida, sebab masih mengandung segmen-segmen yang tidak berfungsi yang disebut **intron**. Sedangkan segmen-segmen yang berfungsi untuk sintesis protein disebut **ekson**. Di dalam nukleus terjadi pematangan/pemasakan mRNA yaitu dengan jalan melepaskan segmen-segmen intron dan merangkaikan segmen-segmen ekson. Gabungan segmen-segmen ekson membentuk satu rantai/utas mRNA yang mengandung sejumlah kodon untuk penyusunan polipeptida. Rantai mRNA ini dikenal sebagai **sistron**.

Pada Tabel berikut dapat dijelaskan beberapa perbedaan DNA dan RNA.

Tabel 3.1: Beberapa Perbedaan DNA dan RNA

	<b>DNA (Deoxyribo Nucleic Acid)</b>	<b>RNA (Ribo Nucleic Acid)</b>
Letak	Dalam inti sel, mitokondria, kloroplas, sen riol.	Dalam inti sel, sitoplasma dan ribosom.
Bentuk	Polinukleotida ganda double helix (dh) rantai panjang	Polinukleotida tunggal dan pendek
Gula	Deoxyribosa	Ribosa
Basanya	Golongan purin : Adenine dan Guanine Golongan pirimidin : Cytosine dan Timin	Golongan purin : Adenine dan Guanine Golongan pirimidin : Cytosine dan Urasil



Fungsi	mengontrol sifat yang diwariskan template untuk sintesis m RNA melakukan proses transkripsi	sintesis protein membawa kode genetik (AUG) start kodon (UAA,UAG,UGA) stop kodon
Aktifitas	Tidak mempengaruhi sintesis- protein secara langsung Pada sel Eukariot mempunyai Intron Basa Nitrogen AGCT	Berpengaruh langsung pada sintesis protein dan mempunyai kode genetik AUGC.  Jenis RNA :  t RNA (transfer RNA)  r RNA (ribosom RNA)  m RNA (messenger RNA)

Proses transkripsi ini terjadi di dalam inti sel (nukleus)<sup>1,2,3</sup>. DNA tetap berada di dalam nukleus, sedangkan hasil transkripsinya dikeluarkan dari nukleus menuju sitoplasma dan melekat pada ribosom. Ini dimaksudkan agar gen asli tetap terlindung, sementara hasil copynya ditugaskan untuk melaksanakan pesan-pesan yang dikandungnya. Jika RNA rusak, akan segera diganti dengan hasil copyan yang baru.

#### Tahapan<sup>4,5,6</sup>

##### a. Inisiasi (permulaan)

Daerah DNA di mana RNA polimerase melekat dan mengawali transkripsi disebut sebagai **promoter**. Suatu promoter menentukan di mana transkripsi dimulai, juga menentukan yang mana dari kedua untai heliks DNA yang digunakan sebagai cetakan.

##### b. Elongasi (pemanjangan)

Saat RNA bergerak di sepanjang DNA, RNA membuka untai heliks ganda DNA dengan bantuan enzim polimerase, sehingga terbentuklah molekul RNA yang akan lepas dari cetakan DNA-nya.

### c. Terminasi (pengakhiran)

Transkripsi berlangsung sampai RNA polimerase mentranskripsi urutan DNA yang disebut **terminator**. Terminator yang ditranskripsi merupakan suatu urutan RNA yang berfungsi sebagai kodon terminasi (kode stop) yang sesungguhnya. Pada sel prokariotik, transkripsi biasanya berhenti tepat pada akhir kodon terminasi, yaitu ketika polimerase mencapai titik terminasi sambil melepas RNA dan DNA. Sebaliknya, pada sel eukariotik polimerase terus melewati sinyal terminasi, suatu urutan AAUAAA di dalam mRNA. Pada titik yang jauh kira-kira 10 hingga 35 nukleotida, mRNA ini dipotong hingga terlepas dari enzim tersebut.

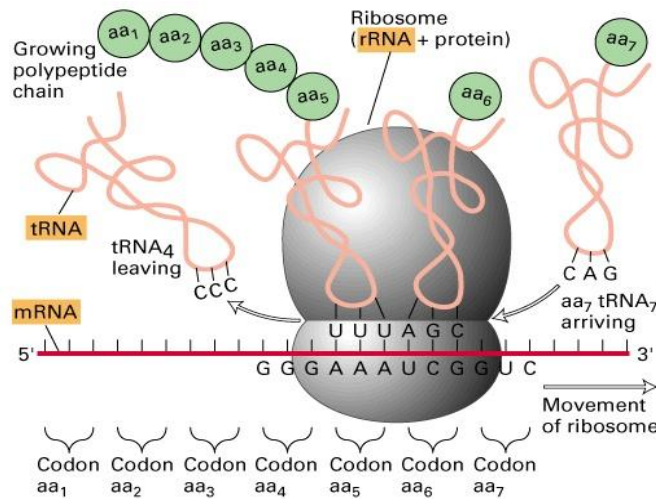
## 3. Translasi/Sintesa Protein

Translasi adalah proses **penerjemahan kode genetik oleh tRNA** ke dalam urutan asam amino. Translasi menjadi tiga tahap (sama seperti pada transkripsi) yaitu **inisiasi**, **elongasi**, dan **terminasi**. Semua tahapan ini memerlukan faktor-faktor protein yang membantu **mRNA, tRNA, dan ribosom** selama proses translasi. Inisiasi dan elongasi rantai polipeptida juga membutuhkan sejumlah energi. Energi ini disediakan oleh GTP (*guanosin triphosphat*), suatu molekul yang mirip dengan ATP<sup>7,8</sup>.

### Tahapan:

#### a. Inisiasi

Tahap inisiasi terjadi karena adanya tiga komponen yaitu mRNA, sebuah tRNA yang membawa asam amino pertama dari polipeptida, dan **dua sub unit ribosom**.



Gambar 3.7 Proses Translasi/Sintesa Protein

mRNA yang keluar dari nukleus menuju sitoplasma didatangi oleh ribosom, kemudian mRNA masuk ke dalam “celah” ribosom. Ketika mRNA masuk ke ribosom, ribosom “membaca” kodon yang masuk. Pembacaan dilakukan untuk setiap **3 urutan basa mRNA (Kodon)** hingga selesai seluruhnya. Sebagai catatan ribosom yang datang untuk membaca kodon biasanya tidak hanya satu, melainkan beberapa ribosom yang dikenal sebagai **polisom**. Dengan demikian, proses pembacaan kodon dapat berlangsung secara berurutan. Ketika kodon I terbaca ribosom (misal kodonnya AUG), tRNA yang membawa antikodon UAC untuk asam amino metionin.

Ribosom di sini berfungsi untuk memudahkan perlekatan yang spesifik antara antikodon tRNA dengan kodon mRNA selama sintesis protein. Sub unit ribosom dibangun oleh protein-protein dan molekul-molekul RNA ribosomal<sup>4,5,6</sup>.

#### b. Elongasi

Pada tahap elongasi dari translasi, asam amino-asam amino ditambahkan satu per satu pada asam amino pertama (metionin). Ribosom terus bergeser kekanan agar mRNA lebih masuk, guna membaca kodon II. Misalnya **kodon II UCA**, yang segera diterjemahkan oleh tRNA berarti kodon **AGU** sambil membawa asam amino **serine**. Di dalam ribosom, **metionin** yang pertama

kali masuk dirangkaikan dengan **serine** membentuk **ikatan peptida**. Ribosom terus bergeser, membaca kodon III. Misalkan kodon III GAG, segera diterjemahkan oleh antikodon CUC sambil membawa asam amino glisin. tRNA tersebut masuk ke ribosom. Asam amino glisin dirangkaikan dengan dipeptida yang telah terbentuk sehingga membentuk tripeptida. Demikian seterusnya proses pembacaan kode genetika itu berlangsung di dalam ribosom, yang diterjemahkan ke dalam bentuk asam amino guna dirangkai menjadi **polipeptida** dan seterusnya **protein**.

Kodon mRNA pada ribosom membentuk ikatan hidrogen dengan antikodon molekul tRNA yang baru masuk yang membawa asam amino yang tepat. Molekul mRNA yang telah melepaskan asam amino akan kembali ke sitoplasma untuk mengulangi kembali pengangkutan asam amino. Molekul **rRNA dari sub unit ribosom besar** berfungsi sebagai **enzim**, yaitu mengkatalisis **pembentukan ikatan peptida** yang menggabungkan polipeptida yang memanjang ke asam amino yang baru tiba.

#### c. Terminasi

Tahap akhir translasi adalah terminasi. Elongasi berlanjut hingga **kodon stop** mencapai ribosom. Triplet basa kodon stop adalah **UAA, UAG, dan UGA** lihat gambar kode genetik dibawah ini. Kodon stop **tidak mengkode suatu asam amino** melainkan bertindak sinyal untuk **menghentikan translasi**. Polipeptida yang dibentuk kemudian “diproses” menjadi protein.

### 3.4 Kode Genetik

		second position											
		U		C		A		G					
first position	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	third position		
		UUC		UCC		UAC		UGC		C			
		UUA	Leu	UCA		UAA	Ochre Amber	UGA	Opal Trp	A			
		UUG		UCG		UAG		UGG		G			
		C	CUU	Leu		CCU	Pro	CAU	His	CGU		Arg	U
			CUC			CCC		CAC		CGC			C
	CUA		CCA		CAA	Gln		CGA	A				
	CUG		CCG		CAG			CGG	G				
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U			
		AUC		ACC		AAC		AGC		C			
		AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A			
		AUG	ACG	AAG		AGG		G					
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U				
	GUC		GCC		GAC		GGC		C				
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A				
	GUG		GCG		GAG		GGG		G				

Gambar 3.8 Kode Genetik Basa Kodon DNA

Pada produk akhir **Sintesa Protein**, Semua aktivitas sel dikendalikan oleh aktivitas nukleus. Cara pengendalian ini berkaitan dengan aktivitas nukleus memproduksi protein, dimana protein ini merupakan penyusun utama dari semua organel sel maupun penggandaan kromosom<sup>6,7,8</sup>.

Contoh protein yang dapat dihasilkan seperti protein struktural yang digunakan sebagai penyusun membran sel dan protein fungsional (misalnya enzim) yang digunakan sebagai biokatalisator untuk berbagai proses sintesis dalam sel.

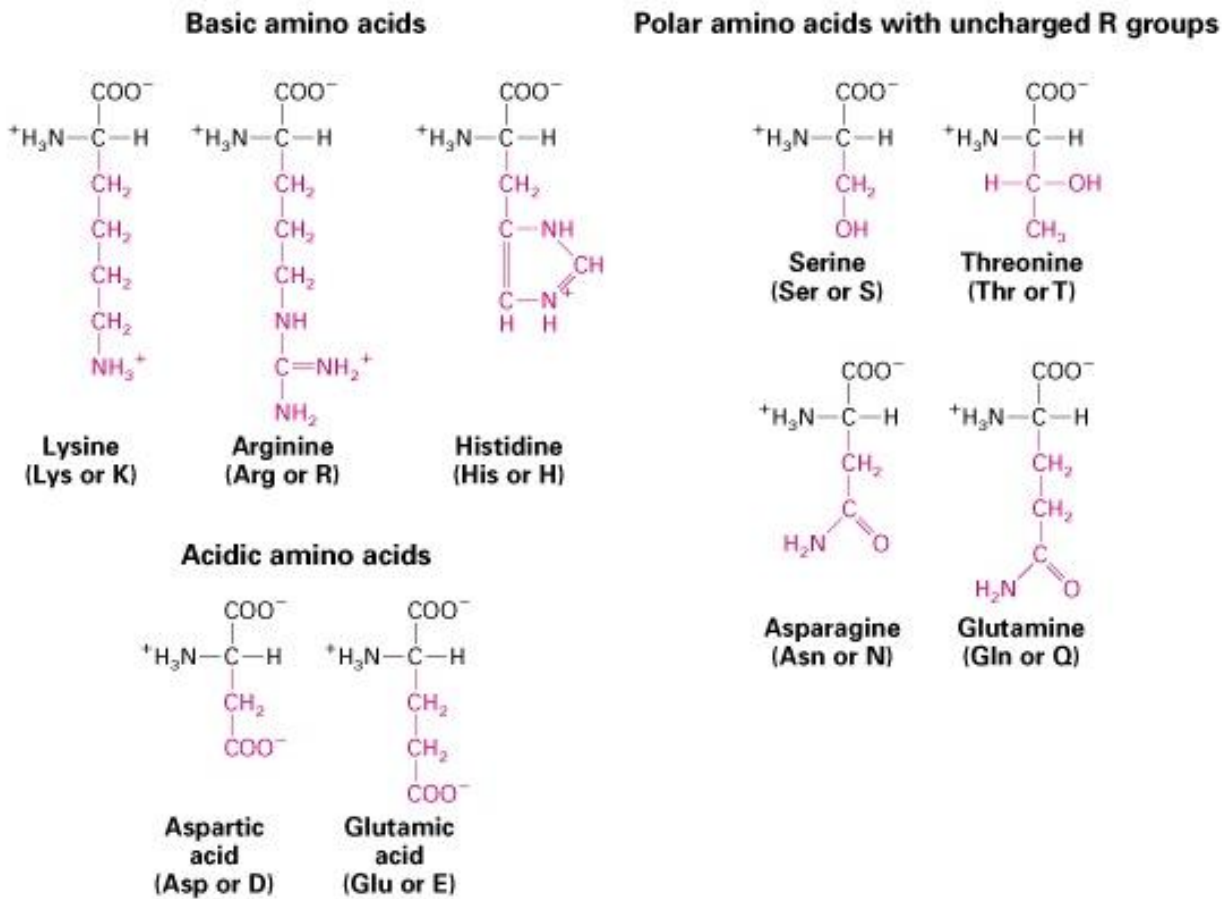
Protein adalah polipeptida (terdiri dari gabungan dari beberapa asam amino) dengan ikatan peptida dan hidrogen. Maka untuk membentuk suatu protein diperlukan bahan dasar berupa asam amino. Polipeptida dikatakan protein jika paling tidak memiliki berat molekul kira-kira 10.000. Di dalam ribosom, asam amino-asam amino dirangkai menjadi polipeptida dengan bantuan enzim tertentu.

Contohnya: Pada hormon Insulin, adalah Polipeptida yang terdiri atas 51 asam amino sampai lebih dari 1000 asam amino (seperti pada fibroin, protein sutera). Macam molekul polipeptida tergantung pada struktur asam amino penyusunnya dan panjang pendeknya rantai polipeptida. Seperti yang telah kita pelajari sebelumnya bahwa ada 20 macam asam amino penting yang dapat dirangkai membentuk jutaan macam kemungkinan polipeptida. Ada beberapa pertanyaan dibawah ini:

1. Bagaimana sesungguhnya mekanisme pembentukan protein itu?
2. Apakah DNA terlibat dalam pembentukan protein?

Sintesis protein melibatkan DNA sebagai cetakan pembuat rantai polipeptida. Meskipun begitu, DNA tidak dapat secara langsung menyusun rantai polipeptida karena harus melalui proses transkripsi sintesa mRNA. Seperti yang telah kita ketahui bahwa DNA merupakan bahan informasi genetik yang dapat diwariskan dari generasi ke generasi.

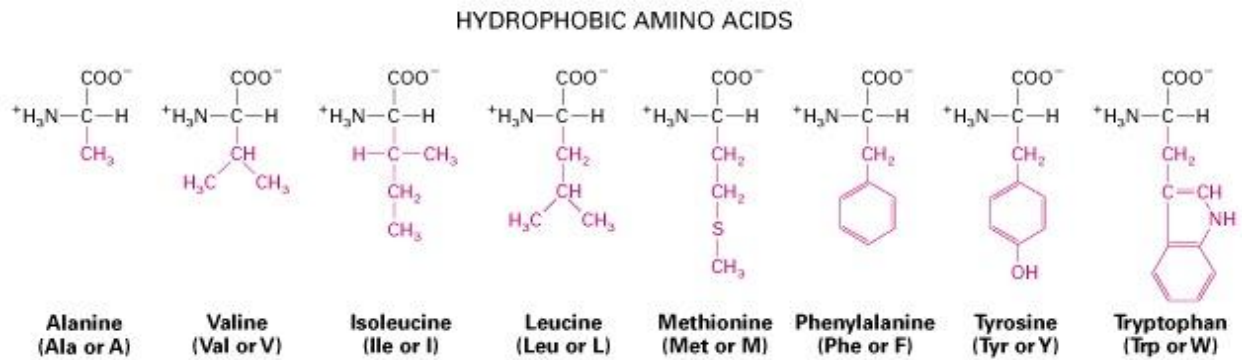
Informasi yang dikode di dalam gen seperti yang sudah dijelaskan akan diterjemahkan menjadi urutan asam amino selama sintesis protein. Informasi ditransfer secara akurat dari DNA melalui mRNA untuk menghasilkan polipeptida dari urutan asam amino yang spesifik. Dibawah ini dapat dilihat struktur dasar (Basic Amino Acids).



Gambar 3.9: Struktur Asam Amino Hidrofilik

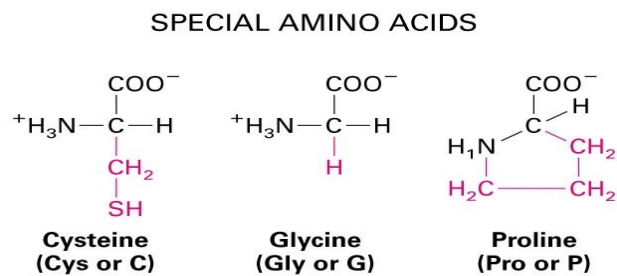
Asam amino harus dipelajari dari struktur/ kerangka dasar, muatan dari gugus karboksilat dan aminanya. Beberapa huruf kapital latin untuk beberapa asam amino juga harus dikenali. Contohnya, seperti: Lys (K), Arg (R), His (H), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Glu (E).

Beberapa asam amino yang bersifat hidrofobik dapat dipelajari pada struktur dibawah ini.



Gambar 3.10: Struktur Asam Amino Hidrofobik

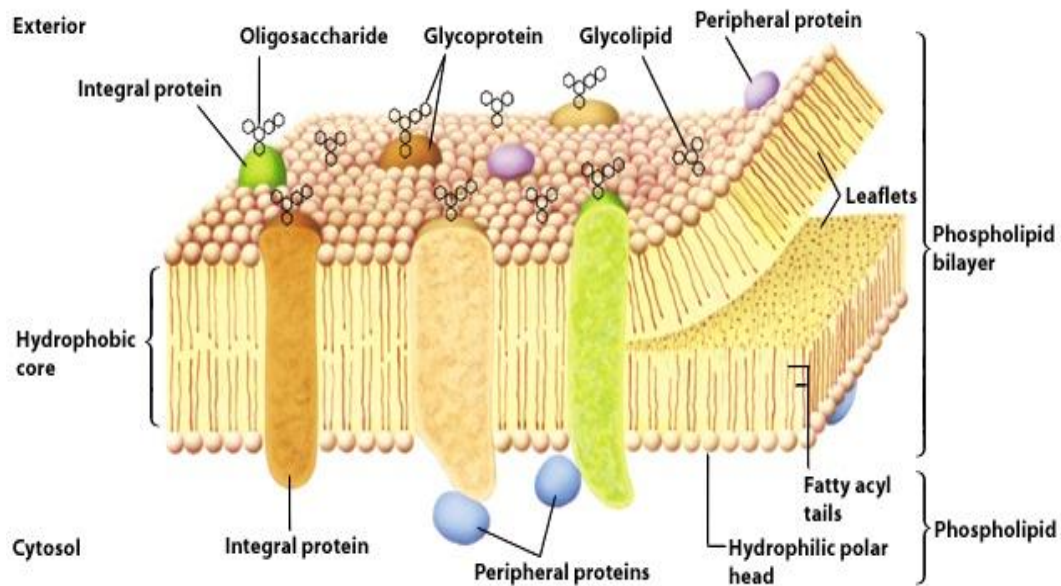
Asam amino hidrofobik diatas Ala (A), Val (V), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Tyr (Y), Trp (W)



Gambar 3.11: Struktur Asam Amino Khusus (Special)

Beberapa asam amino khusus seperti: Cys (C), Gly (G), dan Pro (P). Singkatan singkatan diatas perlu diingat untuk membaca hasil sekuensing asam amino pada suatu protein<sup>7</sup>.





Gambar 3.12: Membran Lipid bilayer dan beberapa Protein Integral<sup>10,11</sup>

Suatu konsep dasar hereditas yang mampu menentukan ciri spesifik suatu jenis mahluk menunjukkan adanya aliran informasi bahan genetik dari DNA ke asam amino (protein). Konsep tersebut dikenal dengan **Dogma Centra Genetik**. Mempelajari konsep Dogma Centra Genetik dari fungsi biologi diatas jelas dapat diterangkan bahwa aliran genetik dimulai dari DNA<sup>8</sup>.

### 3.5 Daftar Pustaka

1. Calladine, Chris R.; Drew, Horace R.; Luisi, Ben F. and Travers, Andrew A. (2003). *Understanding DNA: the molecule & how it works*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-155089-3
2. Dennis, Carina; Julie Clayton (2003). *50 years of DNA*. Basingstoke: Palgrave Macmillan. ISBN 1-4039-1479-6
3. Judson, Horace Freeland (1996). *The eighth day of creation: makers of the revolution in biology*. Plainview, N.Y: CSHL Press. ISBN 0-87969-478-5
4. Olby, Robert C. (1994). *The path to the double helix: the discovery of DNA*. New York: Dover Publications. ISBN 0-486-68117-3

5. Azhar,M,Natalia, D.,Syukur,. S, Vovien, Jamsari, Gene Fragments that encodes inulin hydrolysis enzyme from genomic *Bacillus licheniformis*:Isolation by PCR technique using new primers *International, Journal of Biological Chemistry* 9 (2) ,pp.59, 2015
6. Olby, Robert C. (2009). *Francis Crick: A Biography*. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-798-9
7. Ridley, Matt (2006). *Francis Crick: discoverer of the genetic code*. Ashland, OH: Eminent Lives, Atlas Books. ISBN 0-06-082333-X
8. Berry, Andrew; Watson, James D. (2003). *DNA: the secret of life*. New York: Alfred A. Knopf. ISBN 0-375-41546-7
9. Stent, Gunther Siegmund; Watson, James D. (1980). *The double helix: a personal account of the discovery of the structure of DNA*. New York: Norton. ISBN 0-393-95075-1
10. Armaini, Dharma, A.,Syukur, S, jamsari, Djon, T.H, ,Identification and phylogenetic diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis of thermophilic bacteria from rimbo panti hot spring , *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6 (3) ,pp.465.. 2015
11. Syukur,S.,Purwati , E., *Bioteknology Probiotik Untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat*, Andi Yogyakarta, ISBN: 978-979-29-3998-9

## BAB IV. ISOLASI DNA

### 4.1 Prinsip Isolasi DNA

Molekul DNA dalam suatu sel dapat diekstraksi atau diisolasi untuk berbagai macam keperluan seperti amplifikasi dan analisis DNA melalui elektroforesis. Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti **protein, lemak, dan karbohidrat**. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses isolasi DNA antara lain harus menghasilkan DNA tanpa adanya kontaminan seperti protein dan RNA; metodenya harus efektif dan bisa dilakukan untuk semua spesies metode yang dilakukan tidak boleh mengubah struktur dan fungsi molekul DNA; dan metodenya harus sederhana dan cepat<sup>1,2</sup>.

Prinsip isolasi DNA pada berbagai jenis sel atau jaringan pada berbagai organisme pada dasarnya sama namun memiliki **modifikasi** dalam hal teknik dan bahan yang digunakan. Bahkan beberapa teknik menjadi lebih mudah dengan menggunakan kit yang diproduksi oleh suatu perusahaan sebagai contoh kit yang digunakan untuk isolasi DNA pada tumbuhan seperti Kit Nucleon Phytopure sedangkan untuk isolasi DNA pada hewan digunakan Gene JETTM Genomic DNA Purification Kit. Namun tahapan-tahapan isolasi DNA dalam setiap langkahnya memiliki protokol sendiri yang disesuaikan dengan keperluan. Penggunaan teknik isolasi DNA dengan kit dan manual memiliki kelebihan dan kekurangan. Metode konvensional memiliki

kelebihan harga lebih murah dan digunakan secara luas sementara kekurangannya membutuhkan waktu yang relatif lama dan hasil yang diperoleh tergantung jenis sampel.

Tahap pertama dalam isolasi DNA adalah proses **perusakan** atau **penghancuran membran** dan dinding sel. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Tahap penghancuran sel atau jaringan memiliki beberapa cara yakni dengan **cara fisik** seperti **menggerus** sampel dengan menggunakan mortar dan pestle dalam **nitrogen cair** atau dengan menggunakan metode **freezing-thawing** dan iradiasi. Cara lain yakni dengan menggunakan kimiawi maupun enzimatik. Penghancuran dengan menggunakan **kimiawi** seperti penggunaan **detergen** yang dapat **melarutkan lipid pada membran sel** sehingga terjadi destabilisasi membran sel. Sementara cara **enzimatik** seperti menggunakan **proteinase K** seperti untuk melisiskan membran pada sel darah serta mendegradasi protein globular maupun rantai polipeptida dalam komponen sel<sup>3</sup>.

Pada proses lisis dengan menggunakan detergen, sering digunakan sodium dodecyl sulphate (SDS) sebagai tahap pelisisan membran sel. Detergen tersebut selain berperan dalam melisiskan membran sel juga dapat berperan dalam **mengurangi aktivitas enzim nuklease** yang merupakan enzim pendegradasi DNA. Selain digunakan SDS, detergen yang lain seperti Cetyl TrimethylAmmonium Bromide (**CTAB**) juga sering dipakai untuk melisiskan membran sel pada isolasi DNA tumbuhan. Parameter keberhasilan dalam penggunaan CTAB bergantung pada beberapa hal. **Pertama**, Konsentrasi **NaCl harus di atas 1.0 M** untuk **mencegah terbentuknya kompleks CTAB-DNA**. Karena jumlah air dalam pelet sel sulit diprediksi, maka penggunaan CTAB sebagai pemecah larutan harus dengan NaCl dengan konsentrasi minimal 1.4 M. **Kedua**, ekstrak dan larutan sel yang mengandung CTAB harus disimpan pada suhu ruang karena kompleks CTAB-DNA bersifat insoluble pada suhu di bawah 15°C. **Ketiga**, penggunaan CTAB dengan kemurnian yang baik akan menentukan kemurnian DNA yang didapatkan dan dengan sedikit sekali kontaminasi polisakarida<sup>4,5</sup>.

Setelah ditambahkan CTAB, sampel diinkubasikan pada suhu kamar. Tujuan inkubasi ini adalah untuk mencegah pengendapan CTAB karena CTAB akan mengendap pada suhu 15°C. Karena

efektivitasnya dalam menghilangkan polisakarida, CTAB banyak digunakan untuk purifikasi DNA pada sel yang mengandung banyak polisakarida seperti terdapat pada sel tanaman dan bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, dan *Rhizobium*.

Dalam penggunaan buffer CTAB seringkali ditambahkan reagen-reagen lain seperti NaCl, EDTA, Tris-HCl, dan 2-mercaptoethanol. NaCl berfungsi untuk menghilangkan polisakarida sementara 2-mercaptoethanol berfungsi untuk menghilangkan kandungan senyawa polifenol dalam sel tumbuhan. Senyawa 2-mercaptoethanol dapat menghilangkan polifenol dalam sel tanaman dengan cara membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polifenol yang kemudian akan terpisah dengan DNA. Senyawa polifenol perlu dihilangkan agar diperoleh kualitas DNA yang baik. Polifenol juga dapat menghambat reaksi dari enzim Taq polimerase pada saat dilakukan amplifikasi dengan PCR. Disamping itu polifenol akan mengurangi hasil ekstraksi DNA serta mengurangi tingkat kemurnian DNA. Penggunaan 2-mercaptoethanol dengan pemanasan juga dapat mendenaturasi protein yang mengkontaminasi DNA.

Konsentrasi dan pH dari bufer yang digunakan harus berada dalam rentang pH 5 sampai 12. Larutan buffer dengan pH rendah akan mengakibatkan depurifikasi dan mengakibatkan DNA terdistribusi ke fase fenol selama proses deproteinisasi. Sedangkan pH larutan yang tinggi di atas 12 akan mengakibatkan pemisahan untai ganda DNA. Fungsi larutan buffer adalah untuk menjaga struktur DNA selama proses penghancuran dan purifikasi sehingga memudahkan dalam menghilangkan protein dan RNA serta mencegah aktivitas enzim pendegradasi DNA dan mencegah perubahan pada molekul DNA. Untuk mengoptimalkan fungsi larutan buffer, dibutuhkan konsentrasi, pH, kekuatan ion, dan penambahan inhibitor DNAase dan detergen<sup>2,4</sup>

Pada tahapan ekstraksi DNA, seringkali digunakan **chelating agent** seperti ethylenediamine tetraacetic acid (**EDTA**) yang berperan **menginaktivasi enzim DNase** yang dapat mendenaturasi DNA yang diisolasi, EDTA menginaktivasi enzim nuklease dengan cara mengikat ion magnesium dan kalsium yang dibutuhkan sebagai kofaktor enzim DNase. DNA yang telah diekstraksi dari dalam sel selanjutnya perlu dipisahkan dari kontaminan komponen penyusun sel lainnya seperti polisakarida dan protein agar DNA yang didapatkan memiliki kemurnian yang

tinggi. Fenol seringkali digunakan sebagai pendenaturasi protein, ekstraksi dengan menggunakan fenol menyebabkan protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi yang selanjutnya dapat dipisahkan dari DNA melalui sentrifugasi.

Perlakuan sentrifugasi akan membentuk 2 fase yang terpisah yakni **fase organik** pada lapisan bawah dan fase aquoeus (air) pada lapisan **atas** sedangkan **DNA dan RNA akan berada pada fase aquoeus** setelah sentrifugasi sedangkan **protein yang terdenaturasi akan berada pada interfase** dan **lipid akan berada pada fase organik**. Selain fenol, dapat pula digunakan campuran fenol dan kloroform atau campuran fenol, kloroform, dan isoamil alkohol untuk mendenaturasi protein. Ekstrak DNA yang didapat seringkali juga terkontaminasi oleh RNA sehingga RNA dapat dipisahkan dari DNA ekstrak dengan cara pemberian RNase.

Asam nukleat adalah molekul hidrofilik dan bersifat larut dalam air. Disamping itu, protein juga mengandung residu hidrofobik yang mengakibatkan protein larut dalam pelarut organik. Berdasarkan sifat ini, terdapat beberapa metode **deproteinisasi** berdasarkan pemilihan pelarut organik. Biasanya pelarut organik yang digunakan adalah **fenol atau kloroform** yang mengandung 4% **isoamil alkohol**. Penggunaan kloroform isoamil alkohol (**CIA**) berdasarkan perbedaan sifat pelarut organik. Kloroform tidak dapat bercampur dengan air dan kemampuannya untuk mendeproteinisasi berdasarkan kemampuan rantai polipeptida yang terdenaturasi untuk masuk atau termobilisasi ke dalam fase antara kloroform – air. Konsentrasi protein yang tinggi pada fase antara tersebut dapat menyebabkan protein mengalami presipitasi. Sedangkan lipid dan senyawa organik lain akan terpisah pada lapisan kloroform<sup>1,3</sup>.

Proses deproteinisasi yang efektif bergantung pada besarnya fase antara kloroform-air. Proses ini dapat dilakukan dengan membentuk emulsi dari air dan kloroform. Hal ini hanya dapat dilakukan dengan penggoyangan atau sentrifugasi yang kuat karena kloroform tidak dapat bercampur dengan air. Isoamil alkohol berfungsi sebagai emulsifier dapat ditambahkan ke kloroform untuk membantu pembentukan emulsi dan meningkatkan luas permukaan kloroform-air yang mana protein akan mengalami presipitasi. Penggunaan kloroform isoamil alkohol ini memungkinkan untuk didapatkan DNA yang sangat murni, namun dengan ukuran yang terbatas

(20.000–50.000 bp). Fungsi lain dari penambahan CIA ini adalah untuk menghilangkan kompleks CTAB dan meninggalkan DNA pada fase aquoeus. DNA kemudian diikat dari fase aquoeus dengan presipitasi etanol.

Proses deproteinisasi yang efektif bergantung pada besarnya fase antara kloroform-air. Proses ini dapat dilakukan dengan membentuk emulsi dari air dan kloroform. Hal ini hanya dapat dilakukan dengan penggojogan atau sentrifugasi yang kuat karena kloroform tidak dapat bercampur dengan air. Isoamil alkohol berfungsi sebagai emulsifier dapat ditambahkan ke kloroform untuk membantu pembentukan emulsi dan meningkatkan luas permukaan kloroform-air yang mana protein akan mengalami presipitasi. Penggunaan kloroform isoamil alkohol ini memungkinkan untuk didapatkan DNA yang sangat murni, namun dengan ukuran yang terbatas (20.000–50.000 bp). Fungsi lain dari penambahan CIA ini adalah untuk menghilangkan kompleks CTAB dan meninggalkan DNA pada fase aquoeus. DNA kemudian diikat dari fase aquoeus dengan presipitasi etanol<sup>5</sup>.

Setelah proses ekstraksi, DNA yang didapat dapat dipisahkan melalui presipitasi. Pada umumnya digunakan etanol atau isopropanol dalam tahapan presipitasi. Kedua senyawa tersebut akan mempresipitasi DNA pada fase aquoeus sehingga DNA menggumpal membentuk struktur fiber dan terbentuk pellet setelah dilakukan sentrifugasi juga menambahkan bahwa presipitasi juga berfungsi untuk menghilangkan residu-residu kloroform yang berasal dari tahapan ekstraksi.

Prinsip-prinsip presipitasi antara lain **pertama, menurunkan kelarutan asam nukleat dalam air**. Hal ini dikarenakan molekul air yang polar mengelilingi molekul DNA di larutan aquoeus. Muatan dipole positif dari air berinteraksi dengan muatan negatif pada gugus fosfodiester DNA. Interaksi ini meningkatkan kelarutan DNA dalam air. Isopropanol dapat bercampur dengan air, namun kurang polar dibandingkan air. Molekul isopropanol tidak dapat berinteraksi dengan gugus polar dari asam nukleat sehingga isopropanol adalah pelarut yang lemah bagi asam nukleat; **kedua**, penambahan isopropanol akan menghilangkan molekul air dalam larutan DNA sehingga DNA akan terpresipitasi; **ketiga**, penggunaan isopropanol dingin akan menurunkan aktivitas molekul air sehingga memudahkan presipitasi DNA<sup>2</sup>.

Pada tahapan presipitasi ini, DNA yang terpresipitasi akan terpisah dari residu-residu RNA dan protein yang masih tersisa. Residu tersebut juga mengalami koagulasi namun tidak membentuk struktur fiber dan berada dalam bentuk presipitat granular. Pada saat etanol atau isopropanol dibuang dan pellet dikering anginkan dalam tabung, maka pellet yang tersisa dalam tabung adalah DNA pekat. Proses presipitasi kembali dengan etanol atau isopropanol sebelum pellet dikering anginkan dapat meningkatkan derajat kemurnian DNA yang diisolasi. Perlakuan pencucian kembali pellet yang dipresipitasi oleh isopropanol dengan menggunakan etanol bertujuan untuk menghilangkan residu-residu garam yang masih tersisa. Garam-garam yang terlibat dalam proses ekstraksi bersifat kurang larut dalam isopropanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan presipitasi kembali dengan etanol setelah presipitasi dengan isopropanol untuk menghilangkan residu garam.

Setelah dilakukan proses presipitasi dan dilakukan pencucian dengan etanol, maka etanol kemudian dibuang dan pellet dikeringanginkan, perlakuan tersebut bertujuan untuk menghilangkan residu etanol dari pelet DNA. Penghilangan residu etanol dilakukan dengan cara evaporasi karena etanol mudah menguap. Pada tahap pencucian biasanya etanol dicampur dengan ammonium asetat yang bertujuan untuk membantu memisahkan kontaminan yang tidak diinginkan seperti dNTP dan oligosakarida yang terikat pada asam nukleat<sup>2,3</sup>.

Setelah pellet DNA dikeringanginkan, tahap selanjutnya adalah penambahan **buffer TE** ke dalam tabung yang berisi pellet dan kemudian disimpan di dalam freezer dengan suhu sekitar -20°C. Selanjutnya penambahan buffer TE dan penyimpanan suhu pada -20°C bertujuan agar sampel DNA yang telah diekstraksi dapat disimpan hingga waktu berminggu-minggu. Pelarutan kembali dengan buffer TE juga dapat memisahkan antara RNA yang mempunyai berat molekul lebih rendah dibandingkan DNA sehingga DNA yang didapatkan tidak terkontaminasi oleh RNA dan DNA sangat stabil ketika disimpan dalam keadaan terpresipitasi pada suhu -20°C.

## 4.2 Isolasi DNA bakteri



DNA merupakan materi genetik dalam organisme. Selain DNA, terdapat pula RNA sebagai materi genetik. Materi-materi genetik menyandi berbagai informasi untuk sintesis protein pada organisme. Salah satu perbedaan fundamental antara sel prokaryot dan eukaryot adalah pada organisasi bahan genetiknya. Pada kelompok prokaryot, umumnya hanya ada satu unit bahan genetik utama yang membawa semua informasi genetik yang diperlukan untuk kelangsungan pertumbuhan jasad tersebut. Sebaliknya, pada kelompok eukaryot, bahan genetik utama terdiri atas beberapa unit independen yang terpisah, tetapi semua unit bahan genetik merupakan satu kesatuan genom yang menentukan kelangsungan hidup suatu spesies eukaryot.

Isolasi DNA genom sangat penting untuk mengisolasi DNA fungsionalnya untuk diproduksi produk DNA atau gen ke produk protein di dalam hostnya. Konstruksi pustaka genom dan pengklonan DNA membutuhkan DNA yang utuh agar fragmen DNA betul-betul berasal dari proses pemotongan enzimatik yang sangat spesifik. Bila terpotongnya DNA bukan karena reaksi enzimatik, maka fragmen DNA tersebut sulit disambungkan dengan DNA dari vektor pengklonan. Oleh sebab itu, isolasi DNA genom yang utuh sangat diperlukan bila DNA tersebut akan diproses untuk pengklonan<sup>1,2</sup>.

Isolasi DNA kromosom bakteri secara garis besar meliputi tahap-tahap (1) pemanenan sel, (2) perusakan dan pembuangan dinding sel, (3) lisis sel, (4) pembuangan remukan sel, serta (5) pemisahan DNA dari protein dan RNA. Pemanenan sel dilakukan dari biakan yang telah diinkubasi sebelumnya. Perusakan dinding sel antara lain dapat dilakukan dengan pemberian lisozim, sedangkan untuk lisis sel biasanya digunakan sodium dodesilsulfat (SDS). Pembuangan kontaminan sel dilakukan dengan cara sentrifugasi, sedangkan protein dan RNA masing-masing dihilangkan menggunakan kloroform dan RNAse. Molekul DNA yang telah diisolasi tersebut kemudian dimurnikan, misalnya dengan penambahan amonium asetat dan alkohol<sup>1</sup>.

DNA hasil isolasi dikatakan baik apabila mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi dan tidak mengalami fragmentasi. Fragmen-fragmen DNA yang telah diisolasi kemudian dielektroforesis, untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA. Elektroforesis merupakan teknik untuk analisis DNA. Fragmen molekul DNA dapat ditentukan ukuran panjang basanya (base pair) nya melalui medium gel agarosa. Elektroforesis DNA dilakukan berdasarkan ukuran makromolekul DNA,

dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Kecepatan gerak molekul pada elektroforesis bergantung pada (rasio) muatan terhadap massanya dan pada bentuk molekulnya. Fragmen yang kecil akan berjalan cepat, sedangkan fragmen yang berukuran lebih besar akan berjalan lebih lambat. Visualisasi terhadap hasil elektroforesis DNA yang telah diisolasi tersebut penting untuk dipelajari. Hasil tersebut merupakan pengetahuan awal untuk proses analisa dan riset di bidang biologi molekuler.

Pengetahuan awal yang didapatkan akan mendasari penelitian-penelitian selanjutnya yang lebih mendalam. Selain itu, kebutuhan masyarakat akan informasi genetik dan teknologi pun dewasa ini kian berkembang. Hal tersebut menyebabkan pengetahuan dan ketrampilan isolasi dan visualisasi DNA makluk merupakan hal yang sangat penting untuk dipahami dan dipelajari<sup>2</sup>.

#### **4.3 Metode isolasi DNA dari bakteri (plasmid)**

Isolasi plasmid bakteri ini biasanya sering kita sebut miniprep yang singkatan dari mini-preparation. Ada pula yang mengatakan medi-prep. Mini-prep maupun medi-prep sebenarnya metode yang digunakan sama, tetapi hanya jumlahnya volume saja yang beda. Kalau yang mini-prep small scale isolation of plasmid, sedangkan medi-prep adalah large-scale isolation of plasmid<sup>3,4</sup>.

Isolasi DNA, bisa dengan cara manual bisa dengan menggunakan KIT. Menggunakan KIT, kita semua tahu bahwa akan memakan waktu yang lebih cepat dari yang manual, tapi akan lebih mahal karena buatan company pabrik.

Prinsipnya adalah **pertama** setelah bakteri dikulturkan (biasanya menggunakan *E.coli*) selama semalam, di sentrifuge yang gunanya adalah untuk mengambil kulturnya dan menghilangkan kontaminan dan medium-nya. Setelahnya di treatment dengan pemberian solution I, II, dan III (baca kegunaan solution) . Solution ini semuanya adalah lysis buffer. Pada **solution I** adalah adalah glucose yang konsentrasinya tinggi. Seperti pada prinsip difusi-osmosis, jika ada larutan yang konsentrasi tinggi masuk dalam sel, dengan sendirinya membran sel akan rusak. Kemudian pemberian solution II yang harus fresh (NaOH dan SDS). Solution II yang diggunakan adalah

larutan NaOH sebagai alkali, yang berfungsi merusak membran sel. Dan dalam step ini perlu kita ingat bahwa tidak boleh mem-vortex pada saat mix. Kalau divortex, semua akan hancur termasuk DNA-nya (NaOH adalah alkali kuat). Larutan NaOH dan SDS tidak untuk di-autoclaved maupun on ice, karena ada SDS-nya. SDS di sini adalah sabun yang juga untuk menghancurkan membran sel<sup>3</sup>.

Jadi bisa dilihat bahwa apabila kita membuka tutup tube (pada saat akan memasukkan solution III), ada lendir-lendir di permukaan tube. Itu menandakan bahwa membran sel telah lysis. Sedangkan solution III berguna untuk neutralization, yang di situ dapat kita liat membran-membran yang telah lysis menggumpal dan menyatu perlu sentrifuge untuk mengendapkan membran-membran yang lysis, sehingga dapat diambil hanya supernatan (larutan bening ~ berisi DNA).

Setelahnya mendapatkan larutan bening itu, perlakuan dilanjutkan dengan PCI (phenol : chloroform : isoamylalcohol), yang berfungsi untuk menghilangkan komponen-komponen lain dalam sel, misalnya protein. Karena harus mendapatkan DNA murni ditambahkan dengan ethanol 100% dan NaAc (buffer). Karena DNA ini tidak larut dalam ethanol, maka dengan pemberian ethanol kita akan melihat DNA di situ. NaAc sebagai garam/buffer berfungsi untuk membantu pengendapan. Sehingga proses ini kita dapat namakan ethanol presipitasi, yaitu pengendapan DNA dengan pemberian ethanol. Selain itu untuk membantu pengendapan, kita inkubasi di (-20 derajat Celcius) sekitar 1 jam, kemudian setelahnya sentrifuge dan washing dengan ethanol 70%, dry up dan pemberian bufer TE. Pada dry up ini DNA harus benar-benar bersih dari ethanol, karena jika tidak bersih dari ethanol maka DNA tidak akan sulit larut<sup>7</sup>.

Setelahnya itu lakukan purifikasi. Purifikasi di sini bertujuan agar kita mendapatkan DNA yang benar-benar murni, tidak terkontaminasi dengan RNA. Bisa dilihat pada step ini treatment dengan pemberian enzim RNase, supaya RNA yang terkontaminasi bisa hilang, tidak menampakan smear, **jadi benar terpisah dengan pita yang jelas pada waktu dielektroforesis.**

#### 6.4 Pemurnian DNA

Fragment DNA dipotong dari agarose gel, kemudian dimasukkan ke dalam tube, lalu ditambahkan membran binding solution, setelah itu diinkubasi pada suhu 50<sup>0</sup>C selama

10 menit. Larutan sampel dimasukkan ke dalam QIAquick column dan disentrifuse selama 1 menit 10.000 rpm pada temperatur kamar, selanjutnya ditambah dengan 750 µl membrane wash solution dan disentrifuse selama 1 menit 10.000 rpm pada temperatur kamar. Filtrat ditambahkan 30-50 µl buffer DNase ke dalamnya, ditunggu 1 menit dan disentrifuse 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm (Promega Kit Protokol)<sup>2,5</sup>.

#### 4.5 Daftar Pustaka

1. Kramer MF, Coen DM (2003). Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc
2. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed vol.1-3. Gold Spring. Habor laboratory. Press.USA.
3. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT , William ST (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, edition 9<sup>th</sup>. The William & Wilkim Co. Inc. USA
4. Kramer MF, Coen DM (2003). Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc
5. Laemmli UK (1970) .Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 277:680-685

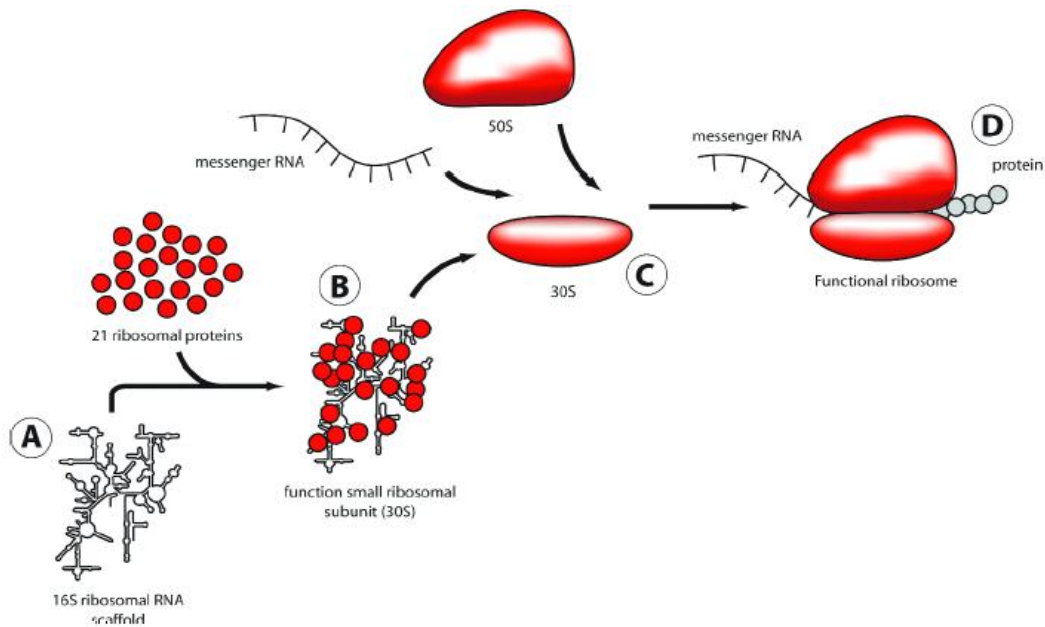
## BAB V. IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAL

### 5.1 Identifikasi Molekular Spesies Bakteri BAL

Ukuran bakteri (prokariot) kecil dibandingkan eukariot dan mempunyai keragaman morfologis yang rendah. Oleh sebab itu, metoda fenotifik yang dilengkapi dengan metoda genotipik sebaiknya digunakan untuk mengklasifikasikan bakteri. Pendekatan dengan metoda fenotifik meliputi ekspresi sifat diantaranya warna dan bentuk koloni, pewarnaan gram serta uji biokimia<sup>1,2,3</sup>.

Pengklasifikasian mikroba menggunakan pendekatan genomik dapat ditujukan pada DNA total atau urutan basa nukleotida suatu gen. Analisis DNA total seperti AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), sedangkan gen individual seperti gen 16S rRNA untuk prokariot dan gen 18S rRNA untuk eukariot. Gen 16S rRNA paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler untuk penentuan spesies bakteri pada saat ini. Kemiripan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA digunakan sebagai “*gold standard*” untuk mengidentifikasi bakteri sampai pada tingkat spesies<sup>2,5</sup>.

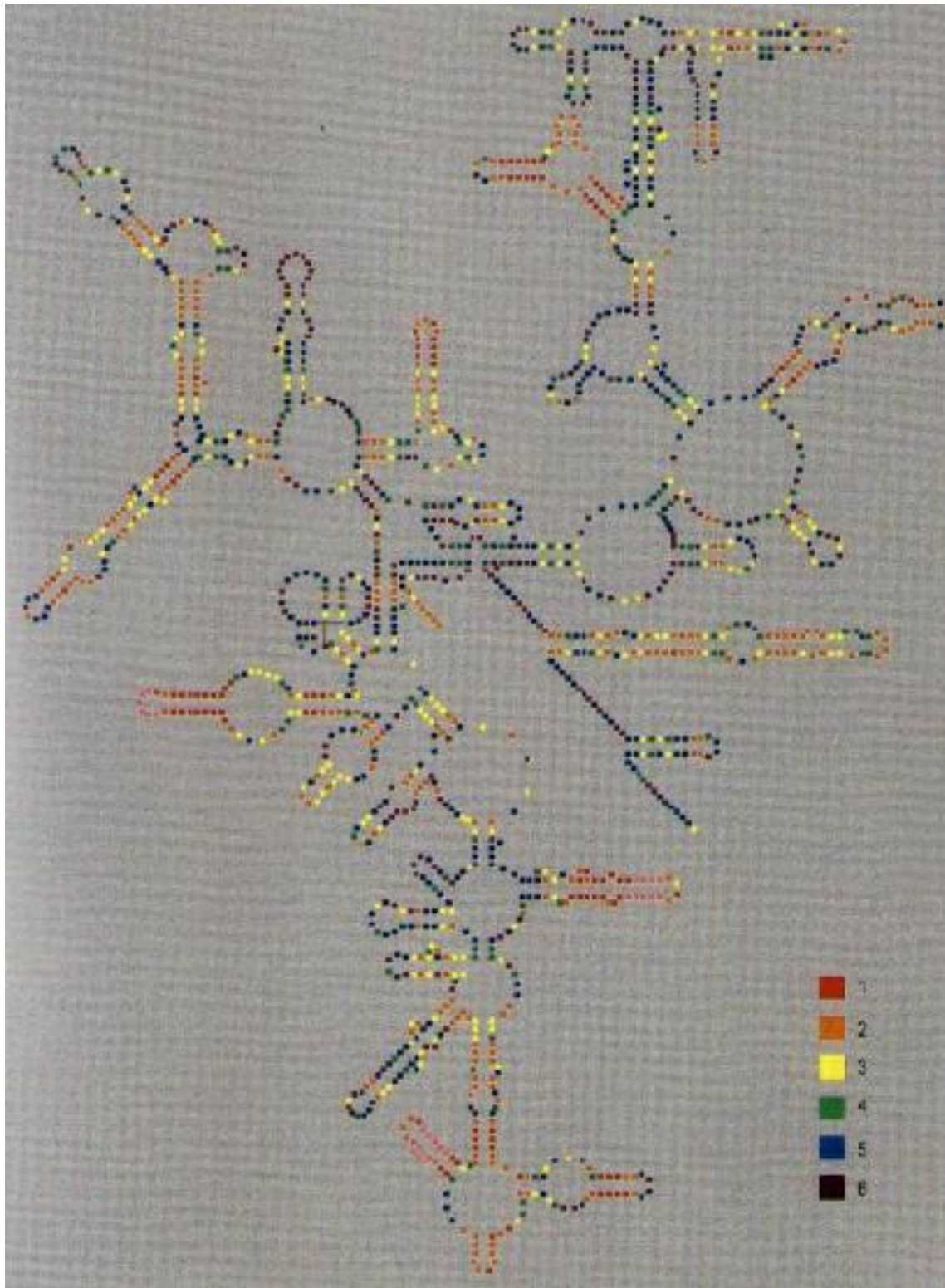
Molekul 16S rRNA merupakan salah satu molekul rRNA penyusun ribosom sub unit kecil prokariot (Gambar 12). Molekul ini ditranskripsi dari DNA genomik dan membentuk struktur tiga dimensi (A). Molekul 16S rRNA kemudian berikatan dengan 21 protein ribosomal membentuk subunit kecil ribosomal 30S (B dan C) yang berperan pada proses translasi.



Gambar 5.1. Fungsi 16S rRNA

Molekul 16S rRNA mempunyai fungsi yang identik pada seluruh organisme, terdistribusi secara universal dan bersifat sangat lestari. Molekul rRNA lainnya pada prokariot adalah 5S rRNA, dan 23S rRNA. Ukuran gen 5S rRNA adalah sekitar 120 basa, 23S rRNA sekitar 2900 basa, 16S rRNA sekitar 1500 basa. Ukuran gen 16S rRNA cukup memadai dan memudahkan dalam proses amplifikasi gen tersebut secara PCR dan dalam proses sekuensing<sup>3,4,6</sup>.

Gen 16S rRNA memiliki daerah-daerah yang secara universal bersifat lestari. Pada beberapa bagian lain terdapat daerah yang bersifat semi-lestari, dan variabel. Pada gen 16S rRNA terdapat 9 daerah variabel yang ditandai dengan V1 sampai. Daerah-daerah variabel tersebut memungkinkan untuk membedakan organisme dalam genus, bahkan spesies namun tidak antar strain dalam spesies yang sama. Pada daerah yang sangat lestari (*absolutely conserved*) dapat dijadikan primer universal untuk amplifikasi gen 16S rRNA bakteri menggunakan metoda PCR. Gambar 5.2 memuat daerah tersebut pada 16S rRNA *Escherichia coli*.



Gambar 5.2. Struktur sekunder 16S rRNA *E.coli*. Warna merah menunjukkan paling *variable*, biru paling *conserved*, ungu menunjukkan *absolutely conserved*.

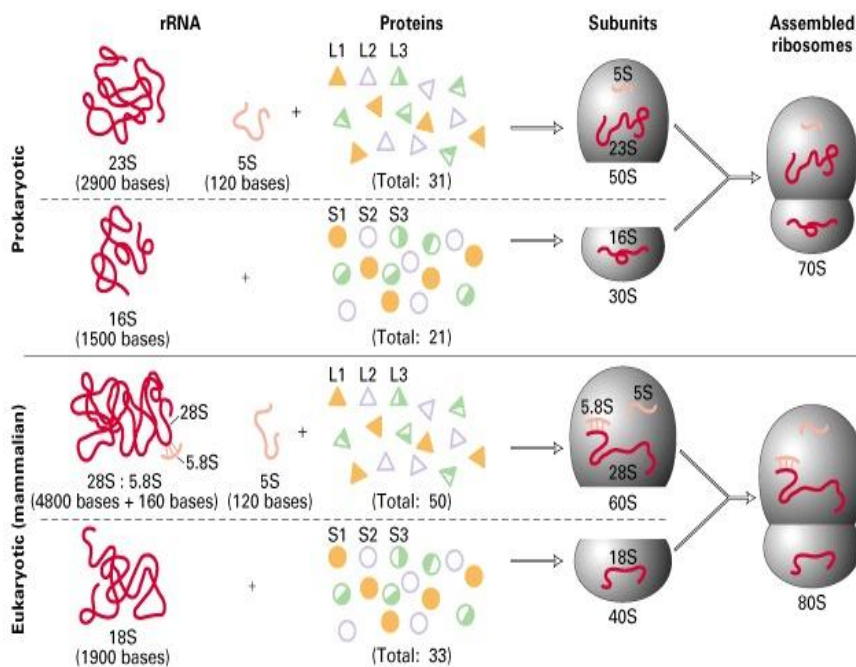
Analisis kesamaan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA praktis untuk definisi spesies. Derajat kesamaan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA  $\geq 97\%$  sering dipertimbangkan sebagai kelompok spesies yang sama. Penentuan derajat kesamaan urutan basa nukleotida suatu gen 16S rRNA dengan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA lainnya pada *GenBank* digunakan program BLASTn pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Analisis perbandingan urutan basa nukleotida dari gen-gen 16S rRNA digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik dan dapat dijadikan sebagai pengklasifikasian makhluk hidup. Dengan demikian penggunaan analisis gen 16S rRNA sebagai pendekatan untuk definisi spesies secara molekuler pada bakteri dapat menunjukkan hubungan kekerabatan<sup>4,6</sup>.

Amplifikasi gen 16S rRNA bakteri dengan metoda PCR dapat digunakan primer universal dan primer spesifik untuk spesies bakteri tertentu. Primer universal gen 16S rRNA bakteri adalah primer yang komplemen dengan suatu urutan nukleotida yang umum banyak terdapat dalam gen 16S rRNA dari bermacam-macam sumber bakteri yang berbeda. Daerah ini merupakan daerah yang paling lestari pada gen 16S rRNA bakteri. Primer universal yang dipakai untuk amplifikasi gen 16S rRNA bakteri diantaranya adalah primer 27F (GAGAGTTTGATCCTGGTCCAG), 765R (CTGTTT GCTCCCCACGCTTC) dan 1495R (CTACGGCTA CCTTGTTACGA). Primer yang dirancang berdasarkan penjajaran urutan gen 16S rRNA *Bacillus* adalah 400F (GGAG CGACGCCGCGTGAGCG), 700F (GCAACTGA CGCTGAGGCG), 1000F (GCAAC GCGAAGAACCTTA). Primer 16S rRNA untuk mendeteksi *Paenibacillus macerans* adalah MAC 1 (ATCAAGTCTTCCGCATGGGA), MAC 2 (ACTCTAGAGTGCCCAMCWTT), sedangkan untuk *Bacillus subtilis* adalah Bsub5F (AAGTCGAGCGGACAGATGG), Bsub3R (CCAGTTTCCA ATGACCCTCCCC).

Beberapa studi yang telah dilakukan dengan identifikasi 16S rRNA diantaranya, Analisa sekuen gen dari 16S rRNA untuk identifikasi bakteri pada mikrobiologi klinik dan penyakit infeksi. Sequencing gen 16S rRNA telah dilakukan untuk mengkarakterisasi dan identifikasi bakteri hasil fermentasi kakao. Identifikasi Bakteri Asam Laktat yang memproduksi senyawa anti mikroba dari usus babi telah diidentifikasi jumlah basanya 500 bp telah disekuen dengan 16S rRNA dan dibandingkan dengan data pada GenBank didapatkan hasil 7 isolat berupa *L. reuteri*, dan 10 isolat lainnya merupakan *L. amylovorus* serta *L. sobrius*.



Teknik mikrobiologi klasik penting untuk seleksi dan karakterisasi biokimia, tetapi tidak efisien untuk pengklasifikasian secara taksonomi. Metoda ini memiliki keterbatasan apabila digunakan untuk identifikasi bakteri. Metoda karakterisasi secara molekular dapat menggambarkan hubungan kedekatan spesies. Identifikasi bakteri secara klasik yang berdasarkan karakteristik fenotipe secara umum tidak seakurat identifikasi berdasarkan metoda genotipe. Analisis sekuensing gen 16S rRNA dapat memberikan gambaran identifikasi yang lebih baik. Kegunaan analisa ini untuk menemukan tipe RNA pada ribosom, dimana gennya disekuens dengan menggunakan primer. Data yang didapat akan dibandingkan dengan sekuens dari database seperti Genbank. Gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi dan mempelajari hubungan phylogenetic antara mikroorganismenya yang lebih akurat<sup>4,5</sup>.



Gambar 5.3 Prokariot dan Eukaryot Ribosom

16S rRNA merupakan bagian dari ribosomal RNA, yang merupakan sub unit 30S rRNA. Ribosomal RNA berfungsi sebagai struktur kerangka, tempat sub unit polipeptida terikat dalam susunan teratur yang amat spesifik. Bila ke 21 jenis polipeptida dan 16S rRNA dari subunit 30S

diisolasi dalam bentuk murni, lalu dicampur dalam urutan spesifik yang benar pada suhu yang sesuai, molekul – molekul ini secara spontan menyusun diri kembali membentuk sub unit 30S yang identik dengan sub-unit 30S yang asli, dimana ribosom merupakan mesin untuk membuat rantai polipeptida<sup>2,3</sup>.

Hasil perbandingan pada “persen perbedaan” dari data Genbank dan identifikasi posisi basa spesifik memiliki posisi yang berbeda. Jika persen perbedaan kedekatan dengan data gen dari Genbank kecocokannya **di bawah 1%**, maka isolat merupakan **spesies yang sama** dengan spesies pada database. Apabila perbedaannya **lebih besar dari 1% dan kurang dari 10%**, maka yang sama adalah **genusnya**. Perbedaan yang lebih dari 10%, maka harus dibandingkan atau digunakan data gen yang lain, karena kedekatan (kekerabatan) tidak cocok. Gen 16S rRNA disekuens dapat dilakukan dengan menggunakan primer universal pada reaksi PCR<sup>4,5,6</sup>.

## 5.2 Daftar Pusaka

1. Case RJ, Boucher Y, Dahllorf I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007). Use 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:278-288
2. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, William ST (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, edition 9<sup>th</sup>. The William & Wilkim Co. Inc. USA
3. Stackebrandt E, Goebel BM (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:846-849
4. Sumaryati Syukur, Urnemi, Lidya Sari Utami, Jamsari and Endang purwati, 2011, Screening And Invitro Antimicrobial, Protease Activities From Lactic Acid Bacteria Associated With Green Cacao Fermentation in West Sumatra, Indonesia, Proseding Seminar Nasional HKI, pekanbaru, 17-21
5. Sumaryati Syukur, Della Amelia Utami dan Abdi Darma, 2011, Isolasi, Karakterisasi Bakteri Asam laktat dan Penentuan Protein Antimikroba Bakteriosin dari Fermentasi Buah Sirsak (*Annona maricata L*) di Sumatra Barat, Seminar MIPA-BKS barat, Banjarmasin, Mei 9-11.
6. Vollu R.E, Santos S.C.C, Seldin L (2003). 16S rDNA targeted PCR for the detection of *Paenbacillus macerans*, *Letters in Applied Microbiology*, 37:415-42

## BAB VI. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

### 6.1 Metoda PCR

Secara ringkas, prinsip pelipat gandaan jumlah molekul DNA pada PCR (*Polimerase Chain Reaction*) terjadi pada suhu 95°C. Molekul DNA mengalami denaturasi, sehingga strukturnya berubah dari double heliks menjadi single strain. Pada suhu 50°C - 60°C, primer *forward* akan menempel pada satu untai tunggal pada posisi komplementernya, sedangkan primer *reverse* akan menempel pada untai tunggal lainnya. Selanjutnya molekul DNA baru mulai disintesis oleh enzim polimerase yang dimulai dari ujung 3' dari masing – masing primer yang terjadi pada suhu 72°C (proses ini disebut *extension*). Dengan demikian satu molekul DNA ganda akan berlipat jumlahnya menjadi dua molekul DNA, dan proses ini terus berulang biasanya berlansung 35 – 40 siklus<sup>1</sup>.

*Polymerase chain reaction* ("reaksi berantai polimerase", PCR) merupakan teknik yang sangat berguna dalam membuat salinan DNA. PCR memungkinkan sejumlah kecil sekuens DNA tertentu disalin (jutaan kali) untuk diperbanyak (sehingga dapat dianalisis), atau dimodifikasi secara tertentu. Sebagai contoh, PCR dapat digunakan untuk menambahkan situs enzim restriksi, atau untuk memutasikan (mengubah) basa tertentu pada DNA. PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan sekuens DNA tertentu dalam sampel.

PCR memanfaatkan enzim DNA polimerase yang secara alami memang berperan dalam memperbanyak DNA pada proses replikasi. Namun demikian, tidak seperti pada organisme hidup, proses PCR hanya dapat menyalin fragmen pendek DNA, biasanya sampai dengan 10 kb (kb=*kilo base pairs*=1.000 pasang basa). Fragmen tersebut dapat berupa suatu gen tunggal, atau hanya bagian dari suatu gen.

Proses PCR untuk memperbanyak DNA melibatkan serangkaian siklus temperatur yang berulang dan masing-masing siklus terdiri atas tiga tahapan. Tahapan yang pertama adalah denaturasi cetakan DNA (*DNA template*) pada temperatur 94-96 °C, yaitu pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal. Sesudah itu, dilakukan penurunan temperatur pada tahap kedua sampai

45-60 °C yang memungkinkan terjadinya penempelan (*annealing*) atau hibridisasi antara oligonukleotida primer dengan utas tunggal cetakan DNA<sup>2,3</sup>.

Primer merupakan oligonukleotida utas tunggal yang sekuens-nya dirancang komplementer dengan ujung fragmen DNA yang ingin disalin; *primer* menentukan awal dan akhir daerah yang hendak disalin. Tahap yang terakhir adalah tahap ekstensi atau elongasi (*elongation*), yaitu pemanjangan primer menjadi suatu utas DNA baru oleh enzim DNA polimerase. Temperatur pada tahap ini bergantung pada jenis DNA polimerase yang digunakan. Pada akhirnya, satu siklus PCR akan menggandakan jumlah molekul cetakan DNA atau DNA target, sebab setiap utas baru yang disintesis akan berperan sebagai cetakan pada siklus selanjutnya.

Reaksi berantai polimerase (PCR= Polymerase Chain Reaction) perkembangan selanjutnya dipacu oleh adanya penemuan enzim polimerase yang diekstraksi dari bakteri *Thermus aquaticus* dan enzim tersebut dikenal dengan nama komersial Taq-polymerase.

Prinsip dasar proses PCR adalah perbanyak molekul-molekul spesifik DNA dengan bantuan primer-primer yang berupa oligonukleotida secara *in vitro*. Proses PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA bakteri BAL dengan menggunakan primer universal dikelompokkan lima tahap, tahap-tahap ini dapat dijelaskan sebagai berikut:

- *Denaturasi template* pada suhu 95°C selama 5 menit dengan DNA template.
- *Denaturasi kedua* pada suhu 95°C selama 5 menit dengan buffer
- *Annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai tunggal DNA target 55°C selama 1 menit dengan dNTP.
- *Extension* (pemanjangan) yaitu polimerisasi dengan bantuan *Taq-Polymerase* pada suhu 72°C selama 3 menit dan primer forward dan reverse.
- *Final Extension* pada suhu 72 °C selama 7 menit dengan ddH<sub>2</sub>O.

Material yang dibutuhkan dalam proses PCR adalah template yaitu molekul DNA yang akan dianalisis, primer berupa oligonukleotid yang didesain berkomplemen dengan rantai DNA template dan menjadi titik batas multiplikasi segmen DNA target, Enzim DNA polimerase yang

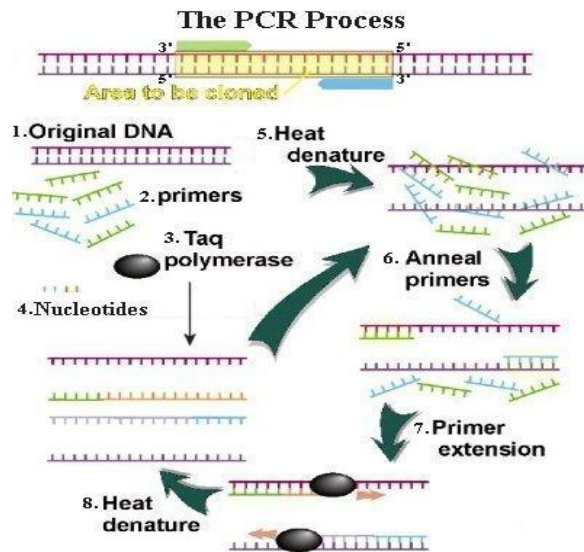
akan mensintesis sekuens DNA baru dengan menggunakan nukleotid-nukleotid bebas yang terdapat pada larutan reaksi, Larutan buffer mengandung garam magnesium chlorida ( $MgCl_2$ ), Deoksinukleotid (dNTPs): deoxy Nucleotida TriPhosphates (dATP, dCTP, dGTP & dTTP).

Secara ringkas, prinsip pelipatgandaan jumlah molekul DNA pada target yang diinginkan melalui teknik PCR dapat dijelaskan sebagai berikut. Pada suhu  $95^\circ C$ , molekul DNA mengalami denaturasi sehingga strukturnya berubah dari untai ganda menjadi untai tunggal. Pada suhu berkisar antara  $50^\circ C$  sampai dengan  $60^\circ C$ , primer *forward* yang urutan nukleotidnya berkomplemen dengan salah satu untai tunggal akan menempel pada posisi komplemennya, demikian juga primer *reverse* akan menempel pada untai tunggal yang lainnya.

Setelah kedua primer tersebut menempel pada posisinya masing-masing, enzim *polymerase* mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung 3' masing-masing primer. Sintesa molekul DNA baru ini terjadi pada suhu  $72^\circ C$ . Proses ini juga disebut sebagai ekstensi. Dengan demikian satu molekul DNA ganda akan berlipat jumlahnya menjadi dua molekul DNA. Setelah itu, diulang lagi proses denaturasi, penempelan dan sintesis pada suhu tersebut di atas dan seterusnya. Proses dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Suhu denaturasi dan ekstensi bersifat permanen, masing-masing pada  $95^\circ C$  dan  $72^\circ C$ , sedangkan penempelan bergantung pada panjang-pendeknya primer.

Setelah dilakukan Amplifikasi DNA, Untuk mengetahui berhasil tidaknya reaksi PCR, maka metode yang sering dipakai adalah elektroforesis dengan prinsip dasarnya adalah pemisahan molekul protein berdasarkan ukuran berat molekul dengan menggunakan arus listrik. Kemudian dilanjutkan pewarnaan dengan etidium bromida. Hasil elektroforesis dapat diamati dengan menggunakan sinar ultraviolet.

Proses PCR biasanya berlangsung 35-40 siklus. Seperti yang terlihat pada gambar berikut:



Gambar 6.1: Mekanisme PCR dalam memperbanyak molekul-molekul DNA

## 6.2 Penggunaan Amplifikasi gen 16S rRNA BAL dengan mesin PCR<sup>7,8</sup>

Untuk memberikan contoh penggunaan gen **16S rRNA** pada percobaan menggunakan bakteri Asam Laktat hasil isolasi fermentasi Sirsak, dapat dilakukan sebagai berikut:

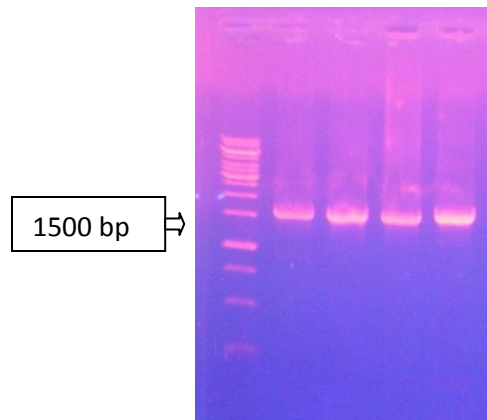
Genomik DNA diambil sebanyak 2µl dilarutkan dengan 48µL campuran PCR. Primer yang digunakan adalah Primer forward 9F dan 1541R untuk reverse primer.

9F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1541R : 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Total volume campuran untuk reaksi PCR 50 µl dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan program sebagai berikut:

Pre heat	96°C	5 menit
PCR (35 cycle):		
Denaturation	96°C	30 detik
Annealing	55°C	30 detik
Elongation	72°C	1 menit
Extention	72°C	7 menit
Stand by	4°C	



Gambar 6.2: Contoh hasil produk PCR BAL (1500 bp)

Setelah DNA teramplifikasi oleh primer 27F dan 1525R seperti yang terlihat pada gambar di atas maka jumlah basa yang teramplifikasi adalah  $\pm 1500$  bp. Untuk selanjutnya disekuensing dengan menggunakan primer reverse 1525R, hasil sekuensing diperoleh sebanyak 631 nukleotida, yang dapat kemudian diperbandingkan dengan data **GeneBank melalui program BLAST**. Data sekuensing bisa dilihat dibawah ini<sup>4,5,6</sup>.

>S48C Sampel

```

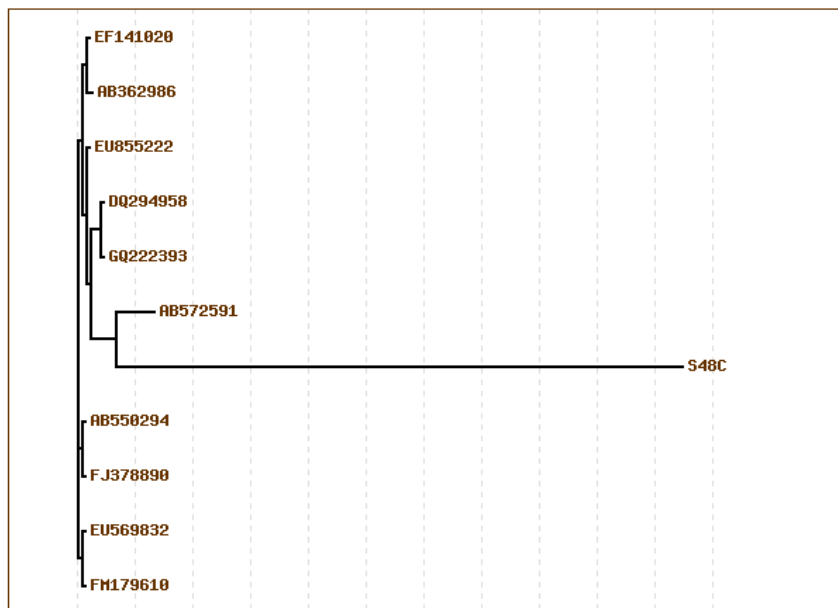
GTGCGACTTCCCCTAATCTCTGTCCCACCTTAGACGGGTAGCACCTAAAAGGT
TACCCACCGGCTTTGGGTGCTACAACTCTCAGGGTGACCCAATCAATCCTC
ACGAGCTCCCGGAAACGTATGGTCGCTCGGAGTTAATAACCCGAAACTTCCA
CCAGAGGAAGTCGTGAATCCTGTATGAGAGCGACTGGGCCCTTCCGTGGCTT
TTGAGGCGTTGTTTGGTTACCCCGACAATTTTCGACAAAGGAGCTCTTTAAGCG
GCTGACAATTTTCGTGAATCTGATCTTTGGCCAGCAGTGACTGCGCATTGGGTC
CGAAGCTGGGTTTCGCTGGAACCTTTGCGGCTTGGATACCTCCTTAAGTCCT
CGTGCCGGCGCTCGGCGGGACTGGTGCGTGGGCTCGTACCCAGCATTACCT
GTGTGATCGGCGGCGCCCTTGGGAGCGCCTGTCACATGACATCTGAGACTGC
CACCCATGACCTTATCTTTCCCTCCCGGTGTGCTGCGCAACTGTGTGTGGATGC
CGCCCGGCGCTTGTGTGCTCACTCAACTCGCGACTCTAGTAATGAAGGAGGG
TAGTTCGGGGGAGAACGTACTIONTGGTGCGTCAGAGTTGGAA.

```

Gambar 6.3: Sekuensing nukleotida DNA BAL S48C

Berdasarkan persen identitas dan E value yang diperoleh maka untuk contoh identifikasi isolat S48C (DNA BAL yang diisolasi dari sirsak) diambil yang mempunyai persen identitas yang lebih besar dan mempunyai nilai harapan (E value) terkecil. maka isolat S48C merupakan spesies *Pediococcus pentosaceus*. Secara taksonomi S48C merupakan genus dari *Pediococcus* yang memiliki satu family dengan *Lactobacillus*, kedekatan kekerabatan ini terlihat pada phylogenetik tree dibawah ini<sup>2,4,5</sup>.

Maksimum identifikasi isolat S48C dengan *Pediococcus pentosaceu* adalah 93% yaitu yang diperoleh dari data gen bank. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat S48C secara spesies tergolong kepada *Pediococcus pentosaceu* dari family *Lactobacillus* karena isolat S48C memiliki bentuk sel *coccus*. Karena maksimum identifikasi Bakteri ini kecil dari 97% maka dapat dikatakan bahwa isolat S48C telah mengalami keragaman genetik dari spesies *Pediococcus*, ini dipengaruhi oleh lingkungan di mana spesies itu hidup.



Gambar 6.4: Pohon filogenetik BAL S-48C



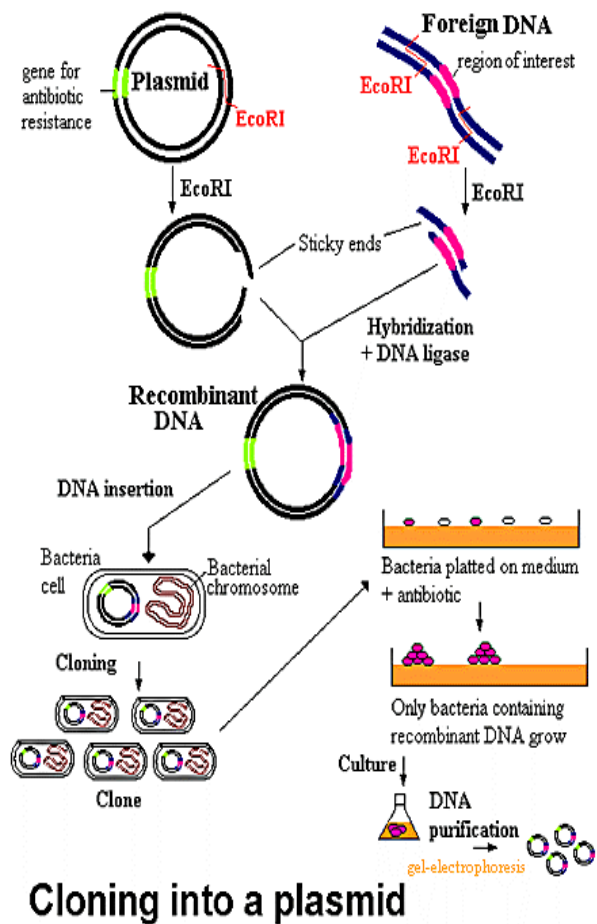
### 6.3 Daftar Pustaka

1. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, William ST (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, edition 9<sup>th</sup>. The William & Wilkim Co. Inc. USA
2. Kramer MF, Coen DM (2003). Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed vol.1-3. Gold Spring. Harbor laboratory. Press. USA Vollu R.E, Santos S.C.C, Seldin L (2003). 16S rDNA targeted PCR for the detection of *Paenbacillus macerans*, *Letters in Applied Microbiology*, 37:415420
4. Stackebrandt E, Goebel BM (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:846-849
5. Sumaryati Syukur, Zozy A.N, and Femylia P. (2009). *Transformasi A.rizogenese, Induksi Akar Rambut dan Produksi Katekin Pada Kakao (Theobroma cacao)*, *J.Riset Kimia*, 2 no 2, 156-168.
6. Tobing H,L, Syukur S, Purwati E, Zein R, R Muzahar, Gani E.H, Fachrial E, Tobing, Comparison of SD bioline malaria Ag-Pf/pan test with microscopic examination for detection of *P.Falciparum*, *P.Vivax* and Mixed infection in South Nias, North Sumatera, Indonesia, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6 (3), pp.917. 2015
7. Azhar, M, Natalia, D., Syukur, S, Vovien, Jamsari, Gene Fragments that encodes inulin hydrolysis enzyme from genomic *Bacillus licheniformis*: Isolation by PCR technique using new primers *International Journal of Biological Chemistry* 9 (2), pp.59, 2015
8. Syukur S, Edy F, and Jamsari, Isolation, Antimicrobial Activity and Protein Bacteriocin Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dadih in Solok, West Sumatera, Indonesia, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6, 106-1104. 2014

## **BAB VII. KLONING DNA**

### **7.1 Sejarah Kloning**

Awal tahun 70an, Herbert Boyer, Stanley Cohen, Paul Berg dan co-workers memulai teknologi rekombinasi DNA dengan menyisipkan beberapa bagian DNA asing ke dalam sel inang. Sel inang yang biasa digunakan untuk alat produksi adalah bakteri atau tanaman<sup>1</sup>.



- Keterangan :
1. DNA asing (foreign DNA) dengan DNA yang diinginkan (region of interest) harus diisolasi terlebih dahulu.
  2. Fragmen DNA yang telah dipotong dengan enzim restriksi *E.coRI* disisipkan pada plasmid yang juga dipotong dengan enzim *E.coRI* agar keduanya dapat disambungkan membentuk DNA rekombinan plasmid.
  3. DNA rekombinan diinsert atau ditransfer pada sel bakteri inang (kompeten sel) untuk dicopy sebanyak banyaknya.
  4. Proses selanjutnya adalah seleksi klon transforman sel pada medium + antibiotik, sesuai dengan antibiotik yang dibawa plasmid.
  5. Proses fermentasi bakteri transforman dan pemurnian produk protein/enzim.

Gambar 7.1: Prinsip kloning pada bakteri

Produk hasil kloning dapat berupa protein, enzim, hormon, vaksin atau produk lain sesuai dengan produk DNA yang diinginkan. Salah satu teknik dasar biologi molekular adalah *kloning ekspresi*, yang digunakan misalnya untuk mempelajari fungsi protein. Pada teknik ini, potongan DNA penyandi protein yang diinginkan ditransplantasikan ke suatu plasmid (DNA sirkular yang biasanya ditemukan pada bakteri; dalam teknik ini, plasmid disebut sebagai *vektor ekspresi*).

Plasmid yang telah mengandung potongan DNA yang diinginkan tersebut kemudian dapat disisipkan ke dalam sel bakteri atau sel hewan. Penyisipan DNA ke dalam sel bakteri disebut transformasi, dan dapat dilakukan dengan berbagai metode, termasuk elektroporasi, mikroinjeksi dan secara kimia. Penyisipan DNA ke dalam sel eukaryota, misalnya sel hewan, disebut sebagai

transfeksi, dan teknik transfeksi yang dapat dilakukan termasuk transfeksi kalsium fosfat, transfeksi liposom, dan dengan reagen komersial. DNA dapat pula dimasukkan ke dalam sel dengan menggunakan virus (disebut transduksi viral)<sup>2</sup>.

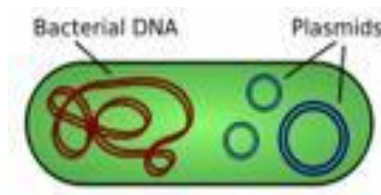
Setelah penyisipan ke dalam sel, protein yang disandi oleh potongan DNA tadi dapat diekspresikan oleh sel bersangkutan. Berbagai jenis cara dapat digunakan untuk membantu ekspresi tersebut agar protein bersangkutan didapatkan dalam jumlah besar, misalnya *inducible promoter* dan *specific cell-signaling factor*. Protein dalam jumlah besar tersebut kemudian dapat diekstrak dari sel bakteri atau eukaryot.

## 7.2 Plasmid/ Vektor Pembawa.

Plasmid adalah DNA lingkaran ekstra kromosom yang terdapat pada sel bakteri. Setiap organisme memiliki DNA yang terletak dalam inti sel atau nukleus yang disebut sebagai DNA kromosomal, begitu pula bakteri. Selain DNA kromosomal, bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal. Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal yang berbeda karakternya dengan DNA kromosomal. Bentuk plasmid adalah sirkuler double helix dengan ukuran 1 kb sampai lebih dari 200 kb.

Plasmid hanya memberikan sifat istimewa yang dimiliki oleh bakteri tersebut misalnya resistensi terhadap antibiotik. Beberapa karakteristik dari plasmid yang patut diketahui antara lain: dapat bereplikasi secara terpisah dari DNA kromosomal, dapat ditransfer ke bakteri lain, dan memiliki ORI (*Origin of replication*).

Perbedaan dari DNA kromosomal dan plasmid dapat dilihat dari gambar di bawah ini:



Gambar 7.2. Struktur sel bakteri

Plasmid berdasarkan fungsinya dapat dikelompokkan menjadi:

1. *Fertility-F-plasmids*, merupakan plasmid yang dapat ditransfer dari satu sel ke sel bakteri lain untuk proses konjugasi
2. *Resistance-(R)plasmids*, mengandung gen yang resisten terhadap antibiotik atau racun.
3. *Col-plasmid*, mengandung gen yang mengkode protein (bakterosin) yang dapat membunuh bakteri lain
4. *Degradative plasmids*, yang mampu mencerna subsansi yang tidak biasa, contoh toluen dan asam salisilat.
5. *Virulence plasmids*, yang menjadikan bakteri tersebut patogen

Selain fungsi, plasmid juga memiliki bentuk yang beragam, antara lain:

1. *Supercoiled (covalently closed-circular)*: DNA berbentuk sirkular dengan bentuk rantai yang terpilin
2. *Relaxed circular*: Kedua ujung DNA menyatu dan berbentuk sirkuler
3. *Supercoiled Denature*: kedua ujung DNA menyatu tapi pasangan basanya tidak sempurna
4. *Nicked open circular*: rantai DNA yang terpotong pada salah satu sisi saja
5. Linier: rantai DNA lurus yang terpotong pada kedua sisinya

Berbagai macam bentuk plasmid akan mempengaruhi kecepatan migrasi plasmid dalam elektroforesis. Urutan migrasi bentuk-bentuk plasmid tersebut dari yang paling cepat adalah *supercoiled*, *supercoiled denaturated*, *relaxed circular*, *linear*, dan *nicked open circular*. Bentuk plasmid yang semakin kecil atau ramping akan lebih mudah bergerak melalui pori gel agarose sehingga akan mencapai bagian bawah terlebih dahulu. Plasmid memiliki fungsi yang bisa dimanfaatkan keuntungannya, maka ada banyak cara yang digunakan untuk mengisolasi plasmid tersebut. Untuk memisahkan DNA kromosom dengan plasmid ada 2 pendekatan yang dapat digunakan untuk membedakan keduanya<sup>3,4</sup>:

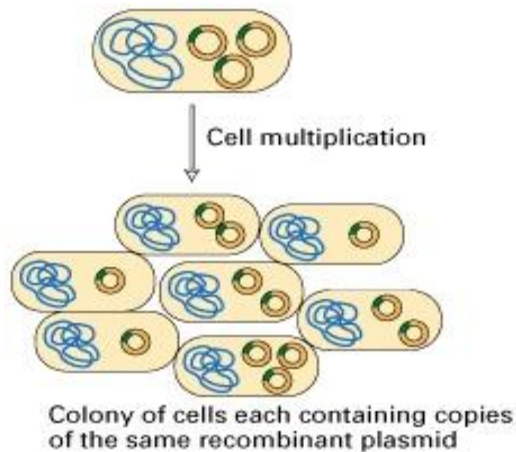
- Plasmid pada umumnya berada dalam struktur tersier yang sangat kuat atau dikatakan mempunyai bentuk *covalently closed circular* (CCC) sehingga DNA plasmid jauh lebih

tahan terhadap denaturasi apabila dibandingkan dengan DNA kromosom. Oleh karena itu, aplikasi kondisi denaturasi akan dapat memisahkan DNA plasmid dengan DNA kromosom.

- Untuk memisahkan DNA plasmid, membran sel dilisis dengan penambahan detergen. Proses ini membebaskan DNA kromosom, DNA plasmid, RNA, protein dan komponen lain. DNA kromosom dan protein diendapkan dengan penambahan potasium. DNA + protein + potasium yang mengendap dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Supernatan yang mengandung DNA plasmid, RNA dan protein yang tersisa dipisahkan. Kemudian ditambahkan RNase dan protease untuk mendegradasi RNA dan protein. Akhirnya DNA plasmid dapat dipresipitasi menggunakan etanol.

Tabel 7.1 : Ukuran Plasmid dari beberapa BAL

<i>Nama BAL</i>	<b>Ukuran plasmid</b>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3000 bp
<i>Bacillus sp1</i>	7000 bp
<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii ID6 3 1 1 23</i>	23000 bp
<i>L. delbrueckii subsp. lactis M2</i>	23000 bp
<i>leuconostoc sp LAB 145-3A</i>	23000 bp dan 48000 bp
<i>Streptococcus thermophilus</i>	4200 bp
<i>Lactobacillus spp</i>	10000 bp
<i>Lactobacillus acidophilus C7</i>	70000bp



Gambar 7.3: Sel bakteri dan proses penggandaan DNA Plasmid ekstrakromosom

### 7.3 Sifat-Sifat Penting Vektor untuk Kloning Gen

1. Mempunyai gen oriC (origin of replication) supaya dapat berplikasi memperbanyak DNA.
2. Plasmid adalah materi genetik yang dapat bereplikasi secara mandiri.
3. Dapat menerima DNA insert, kecil, dan tidak mudah terdegradasi.
4. Mempunyai site restriksi yang dapat digunakan untuk penyisipan gen yang akan diklon.
5. Membawa gen marker, misalnya resistensi antibiotika digunakan pada proses seleksi.
6. Besaran base pair DNA plasmid harus cocok dengan DNA insert.

### Jenis-Jenis Vektor

Vektor yang digunakan untuk kloning gen antara lain:

- a. Retrovirus
- b. Adenovirus
- c. Adeno-associated virus (AAV)
- d. Herpes simplex virus
- e. Human Immunodeficiency Virus (HIV)
- f. Plasmid of various types. Ex: plasmid pBR322 dan pUC; maksimal hingga 20 kb.
- g. Faga lambda
- h. Kosmid (hibrid plasmid dan faga lambda); maksimal sampai 50 kb.

Ada beberapa Enzim terpenting yang selalu digunakan dalam rekayasa genetika.

Hal tersebut akan dibahas sebagai berikut<sup>3,4</sup>:

## 1. *Cellular Enzymes* / Enzim seluler

Enzim yang dipakai oleh peneliti bioteknologi dalam memanipulasi DNA diantaranya adalah enzim Endonuklease, yaitu enzim yang mengenali batas-batas *sekuen nukleotida spesifik* dan berfungsi dalam proses *restriction* atau pemotongan bahan-bahan genetik. Penggunaan enzim ini yang paling umum antara lain pada sekuen *palindromik*. Enzim ini dibentuk dari bakteri yang dibuat sedemikian rupa sehingga dapat menahan penyusupan DNA, seperti genom *bacteriophage*.

DNA polimerisase, yaitu enzim yang biasa dipakai untuk meng-*copy* DNA. Enzim ini mensintesis DNA dari sel induknya dan membentuk DNA yang sama ke sel induk barunya. Enzim ini juga bisa didapatkan dari berbagai jenis organisme, karena semua organisme harus meng-*copy* DNA mereka.

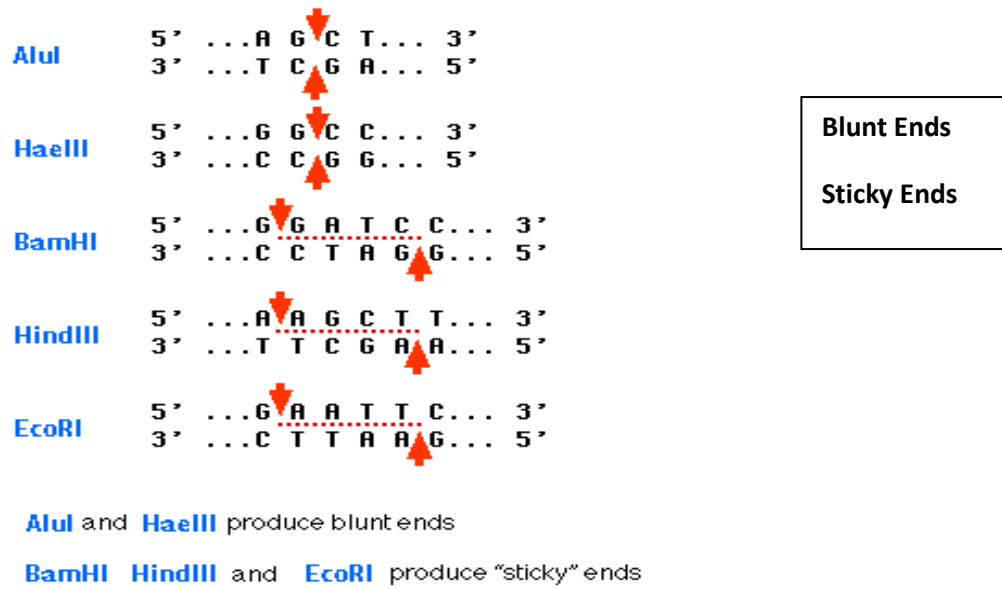
RNA polimerisasi yang berfungsi untuk 'membaca' sekuen DNA dan mensintesis molekul RNA komplementer. Seperti halnya DNA polimerisasi, RNA polimerisasi juga banyak ditemukan di banyak organisme karena semua organisme harus 'merekam' gen mereka

Enzim yang berfungsi untuk merekatkan DNA sesama DNA adalah DNA ligase. Enzim DNA ligase merupakan suatu enzim yang berfungsi untuk menyambungkan suatu bahan genetik dengan bahan genetik yang lain. Contohnya saja, enzim DNA ligase ini dapat bergabung dengan DNA (atau RNA) dan membentuk ikatan *phosphodiester* baru antara DNA (atau RNA) yang satu dengan lainnya.

*Enzim reverse transcriptases* yang berfungsi membentuk *blue-print* dari molekul RNA membentuk cDNA (DNA komplementer). Enzim ini dibuat dari virus RNA yang mengubah genom RNA mereka menjadi DNA ketika mereka menginfeksi inangnya. Enzim ini biasa dipakai ketika bertemu dengan gen eukariotik yang biasanya terpisah-pisah menjadi potongan kecil dan dipisahkan oleh *introns* dalam kromosom.



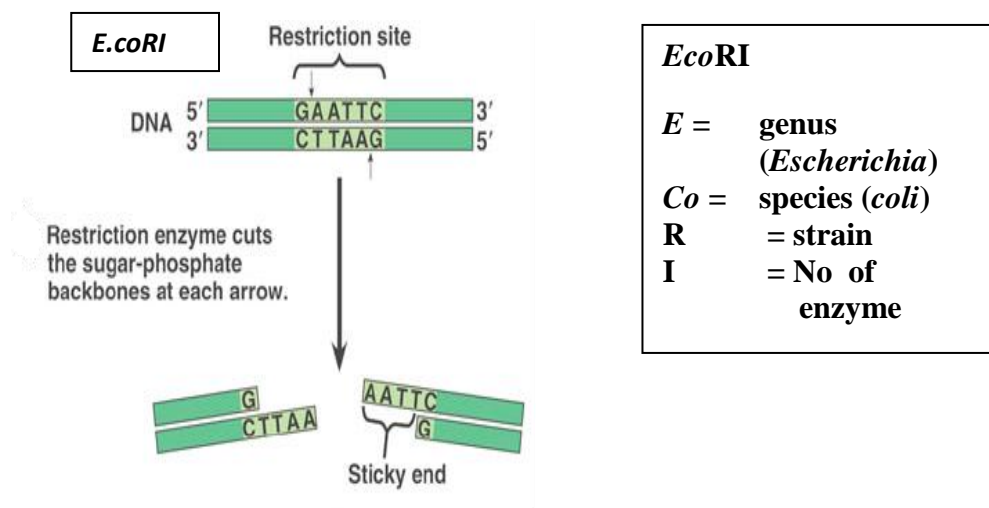
## 7.4 Kerja Enzim Restriksi Endonuklease



Gambar 7.4: Mekanisme kerja Enzim Restriksi

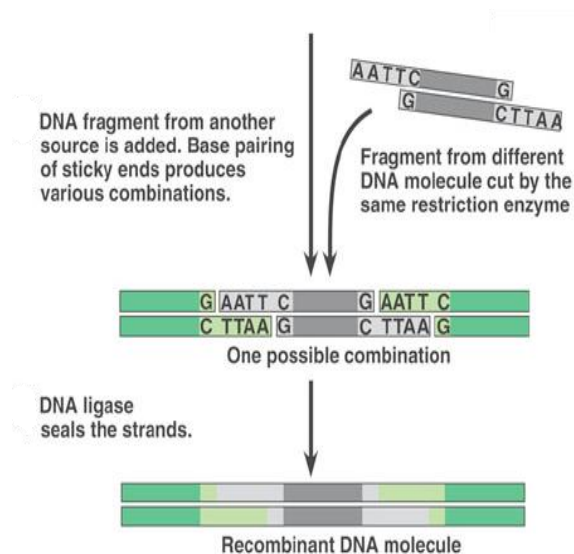
Kerja dari Enzim restriksi endonuklease adalah spesifik pada urutan basa basa DNA tertentu, dan mempunyai mekanisme pemotongan yang berbeda beda (blunt dan sticky end).

Contoh: Kerja Enzim Restriksi EcoRI dapat dilihat dibawah ini.



Gambar 7.5: Mekanisme pemotongan DNA dengan enzim restriksi

## Mekanisme Penyambungan DNA



Gambar 7.6: Mekanisme penyambungan DNA dengan Enzim Ligase

## 7.5 Metode Transformasi DNA

1. Transformasi
2. Transfeksi
3. Elektroporasi
4. Biolistik
5. Transduksi
6. Mikroinjeksi

### 1. Transformasi<sup>3,4,5</sup>

- DNA diambil langsung dari medium dan direkombinasikan ke genom sel kompeten, yaitu sel bakteri yang bisa mengambil DNA.
- DNA rekombinan diinsersi ke DNA sirkuler untai ganda pada salah satu untai saja (misalnya di luar), membentuk heteroduplex karena untai di dalam tidak mengalami rekombinasi.
- Kedua untai mengalami replikasi, sehingga bakteri yang dihasilkan ada yang mengandung gen insersi adapula yang tidak.

### 2. Transfeksi

- Prosesnya dilakukan dengan memperkenalkan materi asing pada sel eukariotik.
- Transfeksi melibatkan pembukaan pori di membran plasma, sehingga materialnya bisa diambil.

- Materi genetik seperti supercoiled plasmid DNA dan siRNA, bahkan protein antibodi dapat ditransfeksikan.
- Metode ini sering diikuti dengan mencampur lipid kationik dengan material tertentu untuk memproduksi liposom yang akan berfusi ke membran plasma dan mentransfer semua isi sel.
- Transfeksi sering digunakan untuk transfeksi yang berkaitan dengan sel mamalia, sedangkan pada bakteri dan terkadang, tumbuhan, jenis proses ini disebut transformasi.
- Disebut juga transformasi untuk proses yang terjadi di bakteri dan tumbuhan.
- HeBS (HEPES buffered saline solution) yang mengandung ion fosfat dikombinasikan dengan larutan kalsium klorida yang mengandung DNA.
- Ketika keduanya digabungkan, presipitat dari kalsium fosfat akan terbentuk dan akan mengikat DNA untuk ditransfeksikan.
- Suspensi dari presipitat ini kemudian ditambahkan ke dalam sel untuk ditransfeksikan (biasanya berupa kultur yang tumbuh di lapisan tunggal).
- Lalu, dengan suatu proses yang belum diketahui, sel akan mengambil beberapa presipitat, sehingga kandungan DNA di dalamnya turut masuk.
- Caranya: elektroporasi, heat shock, dan fusi gene, serta alat gen bombardement senjata gen (DNA dipasangkan dengan partikel nano dari solid inert (emas), kemudian ditembakkan ke nukleus sel target).

### 3. Elektroporasi

- Untuk host yang punya dinding sel, digunakan enzim untuk mencerna dinding sel, menyisakan protoplasma.
- DNA asing dimasukkan melalui kanal yang terbuka akibat tegangan listrik yang diekspose ke protoplast.
- Sel yang udah ditransformasikan lalu dikultur dan dimedia yang menginduksi pembentukan dinding sel dan pertumbuhan menjadi organisme utuh. Sel hewan gampang karena tidak memiliki dinding sel.

### 4. Biolistik

- Dibombardir dengan proyektil mikroskopis (terbuat dari substansi inert, seperti emas) dan diselubungi DNA.
- Ditembakkan pada kecepatan tinggi ke dalam sel atau jaringan.
- Teknik ini menjanjikan untuk digunakan pada organisme yang masih hidup.

### 5. Transduksi

- Melalui infeksi virus dengan afinitas tertentu untuk tipe sel tertentu, sehingga dapat digunakan sebagai vektor jika diisi oleh DNA asing.

## 6. Mikroinjeksi

- Tujuannya untuk memperbaiki genetik disorder, supaya sel yang DNA nya mengalami kelainan bisa berubah dan mensubstitusi gen yang fungsional.
- Contohnya untuk menghasilkan hewan transgenik, DNA diinsersi ke zigot atau embryo awal dengan injeksi menggunakan pipet kecil/halus.
- Zigot/embrio yang sudah ditransformasikan lalu diimplantasi ke rahim host untuk pertumbuhan dan perkembangan.

### 7.6 Seleksi klon yang mengandung insert DNA <sup>6,7,8</sup>

- Ampicilin  
biasanya dapat digunakan untuk seleksi kloning pada bakteri (tergantung gen Antibiotik yang ada pada plasmid).
- DNA library
- Adalah koleksi fragment klon terbatas yang berasal dari genom suatu organisme. Tujuannya untuk memiliki semacam database.
- Genomic library adalah perpustakaan/kumpulan genom komplet, dalam bentuk fragment kecil DNA (oligonukleotida) yang merepresentasikan gen yang telah diketahui.
- Bioinformatika cabang ilmu yang mengaplikasikan penggunaan komputer dalam analisa data genetik.
- cDNA library adalah perpustakaan yang berisikan basa basa cDNA yang direkonstruksi dengan reverse transkriptase dari beberapa mRNA organisme.

### 7.7 Kloning Pada Hewan

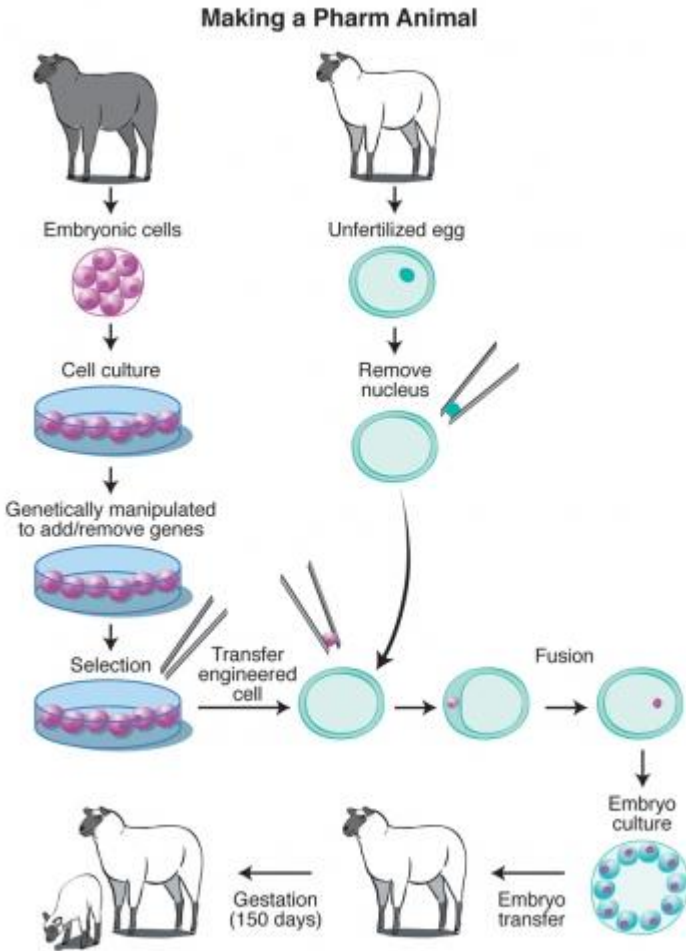
Domba Dolly : Mamalia yang pertama kali dikloning melalui sel induk dewasanya

Kloning hewan adalah suatu proses dimana keseluruhan organisme hewan dibentuk dari satu sel yang diambil dari organisme induknya dan secara genetika membentuk individu baru yang identik sama. Artinya, hewan kloning ini adalah duplikat yang persis sama baik dari segi sifat dan penampilannya seperti induknya, dikarenakan adanya kesamaan DNA.

Di alam, sebenarnya kloning bisa saja terjadi. Reproduksi aseksual pada beberapa jenis organisme dan penemuan mengenai munculnya sel kembar dalam satu telur juga merupakan apa

yang disebut dengan kloning. Dengan kemajuan bioteknologi sekarang ini, bukan mustahil untuk menciptakan lebih lanjut mengenai kloning pada hewan<sup>4</sup>.

Pertama kali para ilmuwan berusaha membentuk sel kloning pada hewan tidak berhasil selama bertahun-tahun lamanya. Kesuksesan pertama yang diraih oleh ilmuwan pada saat mereka berhasil mengkloning seekor kecebong dari sel embrio di tubuh katak dewasa. Namun demikian, kecebong tersebut tidak pernah berhasil tumbuh menjadi katak dewasa. Kemudian, dengan menggunakan *nuclear transfer* di sel embrio, para ilmuwan mulai melakukan penelitian terhadap kloning hewan mamalia. Tapi sekali lagi, hewan-hewan tersebut tidak pernah mencapai hidup yang panjang.



Gambar 7.7: Kloning pada Hewan (Dolly)

Kloning pertama yang berhasil diujicobakan dan bisa bereproduksi adalah seekor domba yang dinamakan Dolly. Dolly ditemukan oleh Ian Wilmut dan kawan-kawanya di Skotlandia pada tahun 1997. Tapi tidak sama dengan uji coba kloning sebelumnya yang menggunakan sel embrio, kloning dolly menggunakan sel dari domba dewasa. Karena sel domba dewasa ini dianggap sudah tua, maka, dolly pun jadi berumur pendek, walau tidak sependek hewan lain hasil kloningan dengan menggunakan sel embrio.

Sekarang ini, para ilmuwan sudah sukses mengkloning banyak hewan seperti tikus, kucing, kuda, babi, anjing, rusa, dan sebagainya dari sel embrio maupun sel non-embrio, tergantung dari tujuan pengkloningan tersebut. Jika, diharapkan hewan hasil kloning yang bisa bereproduksi, maka

digunakanlah sel non-embrio, sedangkan jika diharapkan hewan kloning yang tidak harus bisa bereproduksi, maka digunakan sel embrio<sup>3</sup>.

Proses kloning hewan melalui tahap berikut, yaitu mengekstrak nukleus DNA dari suatu sel embrio kemudian ditanamkan dalam sel telur yang sebelumnya intinya sudah dihilangkan. Kadang-kadang proses ini distimulasi menggunakan alat dan bahan-bahan kimia. Sel telur yang sudah dibuahi ini kemudian dimasukkan kembali ke dalam tubuh sel hewan inangnya dan membentuk sifat yang identik.

Beberapa ilmuwan menjadikan hewan hasil kloning yang tidak bisa bereproduksi sebagai bahan pangan. Namun baru-baru ini, diberitakan bahwa hewan hasil kloning, tidak layak untuk dikonsumsi sebagai makanan manusia walau belum ada bukti pasti mengenai hal tersebut. Penelitian lebih lanjut mengenai hal ini masih terus dilakukan.

### **7.8 Kloning Pada Tanaman (Transformasi Gen)**

Sampai hari ini, diketahui sudah cukup banyak DNA hewan dan tumbuhan yang sudah dikloning. Secara singkat kloning pada sel tumbuhan (baik dari akar, batang, dan daun) bisa dilakukan dengan cara memotong organ tumbuhan yang diinginkan. Lalu kita mencari eksplan, mengambil selnya dan memindahkan ke media berisi nutrisi agar cepat tumbuh. Eksplan ini akan menggumpal menjadi gumpalan yang bernama kalus. Kalus adalah cikal bakal akar, batang, dan daun. Kalus kemudian ditanam di media tanah dan akan menjadi sebuah tanaman baru.

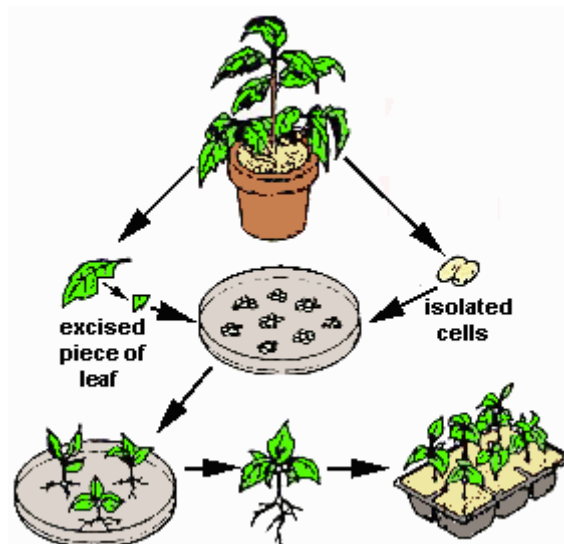
Nama lain dari kloning pada tumbuhan adalah kultur jaringan, yaitu suatu teknik untuk mengisolasi sel, protoplasma, jaringan, dan organ dan menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna kembali<sup>5,6</sup>.

Ada dua teori dasar yang berpengaruh dalam kultur jaringan. Yang pertama adalah teori bahwa sel dari suatu organisme multiseluler di mana pun letaknya, sebenarnya sama dengan sel zigot

karena berasal dari satu sel tersebut. Yang kedua adalah teori **totipotensi sel** atau *Total Genetic Potential*. Artinya, setiap sel yang memiliki potensi genetik mampu memperbanyak diri dan berdiferensiasi menjadi suatu tanaman lengkap<sup>4,6</sup>.

Dalam kultur jaringan ada beberapa factor yang mempengaruhi regenerasi tumbuhannya, yaitu :

1. Bentuk regenerasi dalam kultur in vitro, seperti pucuk adventif atau embrio somatiknya
2. Eksplan, yaitu bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan awal untuk memperbanyak tanaman. Yang penting dalam eksplan ini adalah factor varietas, umur, dan jenis kelaminnya. Bagian yang sering menjadi eksplan adalah pucuk muda, kotiledon, embrio, dan sebagainya.
3. Media tumbuh, karena di dalam media tumbuh terkandung komposisi garam anorganik, zat pengatur tumbuh, dan bentuk fisik media.
4. Zat pengatur tumbuh tanaman. Faktor yang perlu diperhatikan dalam penggunaan zat ini adalah konsentrasi, urutan penggunaan dan periode masa induksi dalam kultur tertentu.
5. Lingkungan Tumbuh yang dapat mempengaruhi regenerasi tanaman meliputi temperatur, panjang penyinaran, intensitas penyinaran, kualitas sinar, dan ukuran wadah kultur.



Gambar 7.8: Proses Kultur Jaringan



### 7.9 Daftar Pustaka:

1. Soomro,A.H, and Masud.,T. *Protein Pattern and Plasmid Profile of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dahi, A Traditional Fermented Milk Product of Pakistan.* Food Technol. Biotechnol. 45 (4) 447–453 .2007
2. Wide dan Syukur S., (2011) Isolasi Plasmid bakteri Asam Laktat *Pediococcus pentasacicus*. Proceeding regional Seminar, Unand Nov 1, 5-10
3. Sumaryati Syukur, 2008. *Agrobacterium rhizogenese* Transformation and Catechin Production in Hairy Roots Culture of *Theobroma cacao*, Research DP2M Fundamental Report, Grant no: 005/SP2H/PP/DP2M/III/2008, 1-52
4. Sumaryati Syukur, Purwati E, 2010 , Isolasi dan Karakterisasi Gen 16 RNA Bakteri Probiotik Termophilic, In Proceeding Seminar IBIO-Dalian, China, (Grand Seminar International DP2M-Dikti)
5. Sumaryati Syukur, Molecular Farming For Pharmaceutical Products. (2009),*In Proceeding 2<sup>nd</sup> International Molecular Biology Seminar- South East Asian Study, 15 August 2009, Univ. of Andalas* 15-25
6. Syukur, Sumaryati (2010) *Molecular Pharmaceutical Farming in Transgenic Plants.* Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, 13 (2). ISSN 1410 – 0177
7. Nova,B., Syukur, S., and Jamsari, Molecular Cloning and Characterization of Npr1 Ankyrin Domain from *Capsicum Annum L.* Der Pharmacia Lettre, 2017, 9(3), 148-155,2017
8. M Azhar, D Natalia, S Syukur, V Vovien, 2015, Gene fragmen that encodes inulin hydrolisis enzyme from genomic *Bacillus licheniformis* isolation by PCR technique using new primers, International Journal of biological chemistry,59-69

## **BAB VIII . ELEKTROFORESIS PROTEIN (PAGE)**

### **8.1 Poly Acryl Amid Gel Elektroforesis (PAGE)**

Teknik electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan suatu metoda yang banyak digunakan untuk analisis protein hasil isolasi dan memperkirakan sifat-sifat fisik, misalnya komposisi sud unit protein, titik isoelektrik, ukuran dan muatannya. Elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular. Prinsip dasar teknik ini adalah bahwa DNA, RNA, atau protein dapat dipisahkan oleh medan listrik. Dalam hal ini, molekul-molekul tersebut dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekul bersangkutan. Elektroforesis gel biasanya dilakukan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode-metode lain seperti spektrometri massa, PCR, kloning, sekuensing DNA, atau *immuno-blotting* yang merupakan metode-metode karakterisasi lebih lanjut<sup>1</sup>.

Gel yang digunakan biasanya merupakan polimer bertautan silang (*crosslinked*) yang porositasnya dapat diatur sesuai dengan kebutuhan. Untuk memisahkan protein atau asam nukleat berukuran kecil (DNA, RNA, atau oligonukleotida), gel yang digunakan biasanya merupakan gel poliakrilamida, dibuat dengan konsentrasi berbeda-beda antara akrilamida dan zat yang memungkinkan pertautan silang (*cross-linker*), menghasilkan jaringan poliakrilamida dengan ukuran rongga berbeda-beda. Untuk memisahkan asam nukleat yang lebih besar (lebih besar dari beberapa ratus basa), gel yang digunakan adalah agarosa (dari ekstrak rumput laut) yang sudah dimurnikan.

Dalam proses elektroforesis, sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur (*well*) pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga, dan listrik dialirkan kepadanya. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Dalam hal asam nukleat, arah pergerakan adalah menuju elektrode positif, disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya. Untuk menjaga agar laju perpindahan asam nukleat benar-benar hanya berdasarkan ukuran (yaitu panjangnya), zat seperti natrium hidroksida atau formamida digunakan untuk menjaga agar asam nukleat berbentuk lurus. Sementara itu, protein didenaturasi dengan deterjen (misalnya natrium dodesil sulfat, SDS) untuk membuat protein tersebut berbentuk lurus dan bermuatan negatif<sup>2</sup>.

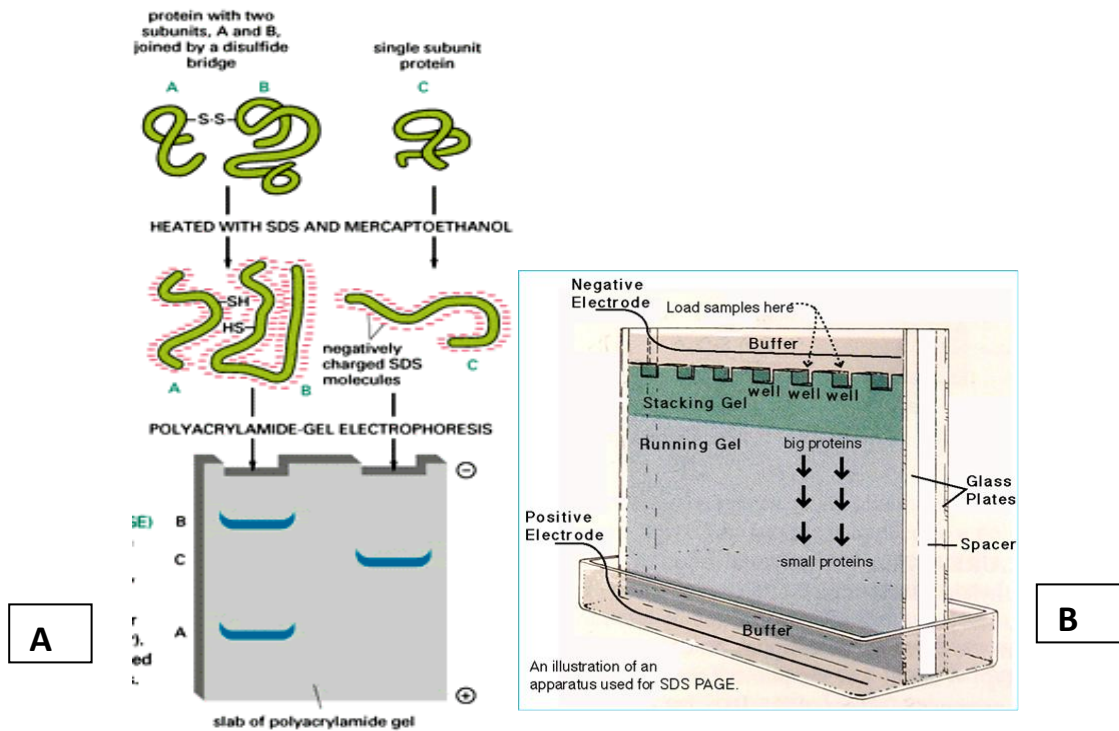
Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan proses pewarnaan (*staining*) agar molekul sampel yang telah terpisah dapat dilihat. Etidium bromida, perak, atau pewarna "biru Coomassie" (*Coomassie blue*) dapat digunakan untuk keperluan ini. Jika molekul sampel berpendar dalam sinar ultraviolet (misalnya setelah "diwarnai" dengan etidium bromida), gel difoto di bawah sinar ultraviolet. Jika molekul sampel mengandung atom radioaktif, autoradiogram gel tersebut dibuat. Pita-pita (*band*) pada lajur-lajur (*lane*) yang berbeda pada gel akan tampak setelah proses pewarnaan; satu lajur merupakan arah pergerakan sampel dari "sumur" gel. Pita-pita yang berjarak sama dari sumur gel pada akhir elektroforesis mengandung molekul-molekul yang bergerak di dalam gel selama elektroforesis dengan kecepatan yang sama, yang biasanya berarti bahwa molekul-molekul tersebut berukuran sama. "Marka" atau penanda (*marker*) yang merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel dengan meng-elektroforesis marka tersebut pada lajur di gel yang paralel dengan sampel. Pita-pita pada lajur marka tersebut dapat dibandingkan dengan pita sampel untuk menentukan ukurannya. Jarak pita dari sumur gel berbanding terbalik terhadap logaritma ukuran molekul<sup>3</sup>.

Prinsip kerja elektroforesis adalah berdasarkan migrasi partikel bermuatan melalui medium cair maupun semi padat, di bawah pengaruh potensial elektrik. Elektroforesis berkembang menjadi teknik pemisahan penyusun suatu molekul protein berdasarkan muatan, ukuran dan bentuk. Umumnya protein bermuatan positif atau negatif tergantung jumlah asam amino yang

dikandungnya. SDS yang digunakan dalam metoda ini berfungsi untuk melarutkan, denaturasi dan memberi muatan negatif pada protein sehingga mengubah konformasi protein asli menjadi bentuk, rasio muatan dan massanya yang sama seperti yang terlihat pada dibawah ini. Elektroforesis dengan adanya SDS memisahkan protein berdasarkan massa (berat molekul). Polipeptida yang lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat.

Gel poliakrilamid yang digunakan terdiri dari dua bagian, yaitu stacking gel dan running gel. Stacking gel terdiri dari poliakrilamid dengan konsentrasi rendah (3%) sehingga ukuran pori-pori gel lebih besar dan tidak berpengaruh terhadap protein yang dipisahkan. Antara stacking gel dan running gel terdapat perbedaan pH, pH stacking gel lebih kecil dari pada running gel. Perbedaan ini bertujuan untuk kemampuan sampel tetap stabil sebelum bermigrasi karena pengaruh medan listrik. Kecepatan migrasi molekul dalam gel poliakrilamid dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya<sup>4</sup>:

- a. Bentuk dan ukuran molekul, apabila ukuran molekul lebih kecil dan lebih pendek maka akan lebih cepat bermigrasi bila di bandingkan molekul yang lebih besar.
- b. Tegangan listrik, apabila tegangan listrik dinaikkan maka kecepatan molekul bermigrasi akan semakin cepat.
- c. Konsentrasi gel poliakrilamid, semakin kecil konsentrasi berarti pori-pori yang terbentuk semakin besar sehingga molekul yang melewati akan semakin cepat.



Gambar 8.1: SDS-Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)

A. Mekanisme alat SDS-PAGE, B. Perubahan protein akibat mercaptoetanol dan SDS.

## 8.2 Penentuan Berat Molekul Bakteriosin dengan SDS-PAGE

Prosedur untuk menentukan berat molekul bakteriosin BAL hasil isolasi Sirsak yang strukturnya merupakan protein, dapat dilakukan dengan SDS-PAGE sebagai berikut: <sup>4,5</sup>

Supernatan bakteriosin hasil produksi ditambahkan 60 % ammonium sulfat sebanyak satu sendok setiap 5 menit sambil distirer pada suhu 4<sup>0</sup>C sampai semua ammonium sulfat habis. Diamkan selama semalam dalam suhu 4<sup>0</sup>C agar bakteriosinnya mengendap. Disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Diambil pelletnya, kemudian ditambahkan 1,5 ml Tris HCl pH 8,5. Dipipet campuran sebanyak 1,5 ml dimasukkan ke dalam membrane dialisis. Didialisis semalam dalam buffer dialisis yang terdiri dari 100 mM NaCl, tris HCl pH 8,5 dan glyserin dengan perbandingan 8: 1 : 1. Bakteriosin yang sudah didialisis kemudian dipisahkan

dengan Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) dengan marker yang berkisar antara 10 - 200 kDa (Bio-Rad). Konsentrasi gel yang digunakan 10 % dengan komposisi dapat dilihat pada Tabel dibawah berikut<sup>6</sup>:

**Tabel 8.1 . Komposisi Reagen untuk Pembuatan Gel 10 %**

Reagen	Running Gel	Stacking Gel
30 % acrylamid	2 ml	284 µl
1,5 M Tris HCl pH 8,8	3 ml	733 x 2 µl
dH <sub>2</sub> O	1 ml	1ml
APS (Ammonium Phenol Sulphat) 10%, w/v	45,9 µl	21,6 µl
TEMED	10,2 µl	4,8 µl

SDS PAGE dirunning selama 90 menit, 40 mA. Gel distaining dengan Commasie Blue selama 1 jam kemudian didestaining selama semalam. Dilihat band yang terbentuk.

Dari hasil optimasi pembentukan bakteriosin didapatkan isolat terpilih yaitu S48C untuk dilanjutkan pada penentuan berat molekul bakteriosin. S48C memiliki kondisi optimum dalam menghasilkan bakteriosin yaitu pada pH 4-5. Untuk isolasi bakteriosin isolat S48C ditumbuhkan pada medium dengan pH 4,5. Kultur sel bakteri disentrifuse untuk memisahkan bakteriosin dari sel bakteri. Supernatan di tambahkan dengan 60% amonium sulfat dengan tujuan untuk mengendapkan bakteriosin, proses ini dilakukan pada suhu 4<sup>0</sup>C dan distirer perlahan untuk mencegah kerusakan struktur protein. Campuran didiamkan semalam dengan tujuan agar protein terendapkan secara sempurna. Lalu disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Untuk mengekstrak protein dari pelet maka diresuspensi dengan Tris HCl pH 8,5. Kemudian didialisis dengan membran dialisis dengan tujuan mengilangkan sisa-sisa garam yang masih tersisa. Proses ini menghasilkan crude bakteriosin atau bakteriosin parsial. Berat molekul crude bakteriosin ditentukan dengan SDS-PAGE, konsentrasi gel yang di pakai adalah 10%. Pita bakteriosin diamati

setelah di staining dengan comassie blue dan didestaining semalam untuk menghilangkan noda comassie blue yang masih tertinggal pada gel<sup>5</sup>.

### 8.3 Daftar Pustaka

1. Coventry MJ, Gordon JB, Wilcock A, Harmark K, Davidson BE, Hickey MW, Hillier AJ, Wan J. (1997). Detection of bacteriocin of LAB isolated from food and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.* 83, 248–258
2. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85–106
3. Sumaryati Syukur, Della Amelia Utami dan Abdi Darma, 2011, Isolasi, Karakterisasi Bakteri Asam laktat dan Penentuan Protein Antimikroba Bakteriosin dari Fermentasi Buah Sirsak (*Annona maricata L*) di Sumatra Barat, Seminar MIPA-BKS barat, Banjarmasin, Mei 9-11.
4. Gálvez A. (2003). Antimicrobial activity of Enterocin EJ.97 on *B. coagulans* CECT12. *Food Microbiol.* 20, 533–536
5. Garneau S, Martin N, Vederas JC. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577–592
6. Syukur, S., Purwati, E., *Bioteknologi Probiotik Untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat*, Andi Yogyakarta, ISBN: 978-979-29-3998-9

## **BAB IX. BAKTERIOSIN ANTIMIKROBIAL**

### **9.1 Bakteriosin**

Bakteriosin adalah komponen ekstraseluler berupa peptida atau senyawa berupa protein antimikroba yang memperlihatkan suatu respon berlawanan terhadap bakteri tertentu. Sebagai senyawa antimikroba, bakteriosin mampu menghambat bakteri gram positif dan bakteri gram negatif seperti *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Listeria sp.*, *Shigella sp.*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio sp.*, yang menyebabkan berbagai macam penyakit pada manusia.

Dewasa ini, berbagai macam antibiotik sintesis yang beredar di pasaran seperti penisilin, ampisilin, amoxylin dimanfaatkan sebagai antimikroba untuk membunuh bakteri penyebab penyakit pada manusia. Namun kadang kala pemberian dosis antibiotik yang tidak sesuai menyebabkan bakteri penyebab penyakit tidak mati dan menjadi resistens, sehingga pada jangka waktu tertentu akan terjangkiti penyakit yang sama. Selain itu penggunaan antibiotik sintesis memberikan efek samping terhadap kesehatan seperti gangguan ginjal dan sesak nafas karena antibiotik sintesis sulit didegradasi di dalam tubuh. Salah satu alternatif untuk melindungi manusia dari efek resisten mikroba penyebab penyakit tanpa ada gangguan kesehatan lainnya adalah dengan memanfaatkan bakteriosin sebagai antibiotik alami<sup>1</sup>.

Bakteriosin selain sebagai antibiotik alami juga dapat di manfaatkan sebagai biopreservasi makanan karena memiliki beberapa keuntungan, yaitu tidak toksik dan mudah mengalami biodegradasi karena bakteriosin adalah senyawa protein yang tidak membahayakan mikroflora usus, mudah dicerna oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan, aman bagi lingkungan. Bakteriosin dihasilkan oleh beberapa galur bakteri asam laktat (BAL).

BAL telah digunakan sebagai pengawet makanan, kultur fermentasi dan pangan probiotik karena mempunyai aktivitas yang berlawanan dengan mikroorganisme patogen dan pembusuk makanan. BAL mampu memproduksi asam organik, metabolit primer dan menurunkan pH lingkungannya dengan mengekresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), diasetil,  $CO_2$ , asetaldehid, d-isomer asam-asam



amino, dan bakteriosin yang berperan penting dalam menjaga dan memperpanjang masa simpan produk. Beberapa genera yang memproduksi bakteriosin adalah *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* dan *Propionibacterium* mempunyai aktivitas hambat yang besar terhadap pertumbuhan beberapa bakteri pathogen.

BAL selain penghasil bakteriosin juga memberikan efek fisiologis bagi kesehatan yaitu sebagai suplemen (pada makanan dan minuman), obat-obatan (antibiotik alami), efek terapi (hipokolesterol, antihipertensi, pencegah diare). BAL ini disebut sebagai probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang mana ketika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup memberi manfaat kesehatan terhadap inangnya. Mencari sumber-sumber mikroorganisme produktif mensintesis bakteriosin (BAL) adalah langkah yang paling memungkinkan untuk dilakukan<sup>2</sup>.

Indonesia memiliki banyak sumber-sumber habitat organisme BAL yang tumbuh secara alami, karena perbedaan kondisi lingkungan menjadikan keanekaragaman mikroorganisme. Selanjutnya keanekaragaman jenis BAL tersebut perlu dieksplorasi sifat-sifat dan potensinya sebagai bakteri probiotik yang potensial mensintesa bakteriosin.

Penelitian tentang isolasi BAL dan bakteriosin telah banyak dilakukan terutama pada produk-produk daging mentah ataupun kalengan, produk susu (yoghurt, keju, dadih), fermentasi (tape, tempe, beer). Namun belum begitu banyak yang diisolasi dari buah-buahan dan sayur-sayuran tropis. Beberapa sumber memaparkan bahwa pada buah-buahan dan sayuran seperti durian, nenas, sirsak, cacao, pisang, mangga, tomat, kubis, asinan sawi, selada, kacang panjang dan lain sebagainya adalah potensial sebagai sumber BAL.

Bakteriosin adalah produk metabolisme bakteri asam laktat yang bersifat antimikrobia. Bakteriosin berupa peptida atau senyawa berupa protein antimikroba yang memperlihatkan suatu respon berlawanan terhadap bakteri patogen lain. Bakteriosin dikelompokkan menjadi empat yaitu:

1. Lantibiotics bersifat hidrofobik, memiliki cincin lantionin dan merupakan peptida tahan panas.

2. Bakteriosin kecil ( $< 10\text{kDa}$ ) relatif tahan panas, peptida pada sisi aktifnya tidak memiliki cincin lantionin. 3 sub kelas bakteriosin ini adalah:
  - a. Kelas Ia, strukturnya menyerupai pediocin memiliki sifat antilisteria yang kuat. Contoh: Nisin, Lacticin, Streptococcin.
  - b. Kelas Ib, bakteriosin yang terdiri dari dua peptida yang memiliki aktivitas antimikroba.
  - c. Kelas Ic, bakteriosin yang dikeluarkan melalui mekanisme khusus.
3. Bakteriosin dengan berat molekul besar ( $> 30\text{ kDa}$ ) dan tidak tahan panas
4. Kompleks bakteriosin terdiri dari komponen karbohidrat dan lipid.

Beberapa sifat-sifat bakteriosin yang menguntungkan adalah sebagai berikut:<sup>3</sup>

- a. Mudah diuraikan oleh enzim-enzim dalam saluran pencernaan karena merupakan senyawa protein.
- b. Mampu menghambat pertumbuhan mikroba secara filogenetik dekat dengan bakteri penghasil bakteriosin.
- c. Berupa protein yang bersifat bakterisidal, bakteri target memiliki sifat pengikat spesifik (specific binding site).
- d. Gen pengkode bakteriosin terdapat di dalam plasmid..
- e. Tahan terhadap pemanasan misalnya pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  atau  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dan aktivitasnya masih ada pada lingkungan sangat asam.

Beberapa keuntungan ini bakteriosin di manfaatkan sebagai biopreservasi dalam industri makanan dan industri farmasi.

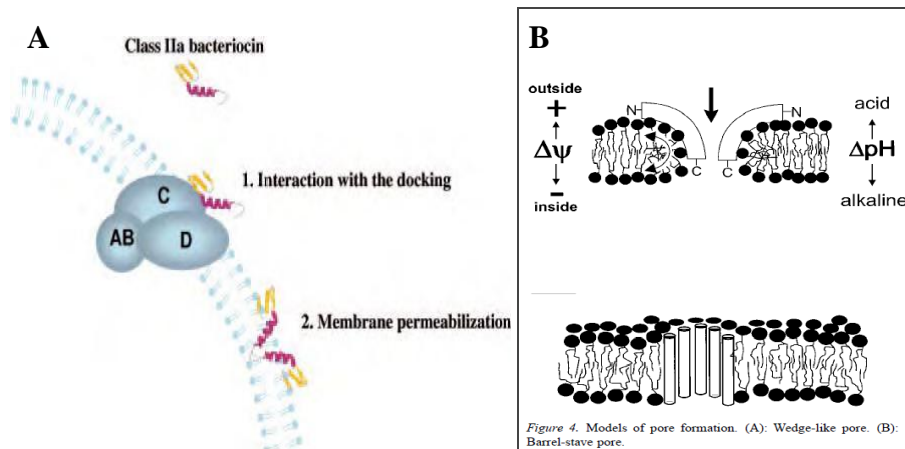
## 9.2 Kinerja bakteriosin dalam aktivitas antimikroba

Target kerja bakteriosin dari BAL adalah membrane sitoplasma sel bakteri yang sensitive. Karena reaksi awal bakteriosin adalah merusak permeabilitas membrane dan menghilangkan Proton Motive Force (PMF) sehingga menghambat produksi energy dan produksi protein atau asam nukleat.

Aktivitas menghambat bakteri membutuhkan reseptor spesifik permukaan sel, contohnya pada pediocin AcH. Selain itu mengakibatkan terjadinya lisis pada sel. Hal ini adalah efek sekunder dari aktivitas pediocin AcH melalui depolimerisasi dari lapis peptidoglikan sehingga secara tidak langsung mengaktifkan sistem autolysis sel<sup>4</sup>.

### 9.3 Mekanisme aktivitas bakterisidal bakteriosin adalah sebagai berikut:

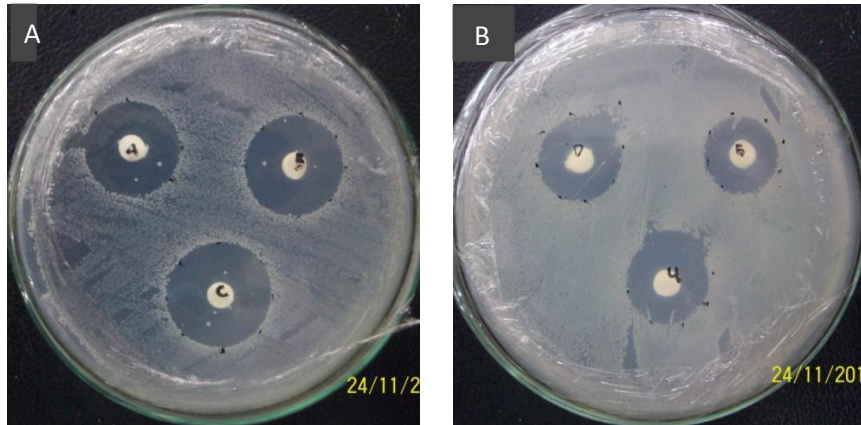
1. Molekul bakteriosin kontak langsung dengan membrane sel.
2. Proses kontak mengganggu potensial membrane berupa destabilitas membrane sitoplasma sehingga sel menjadi tidak kuat.
3. Kestabilan membran mampu memberi dampak pembentukan lubang atau pori pada membrane sel melalui proses gangguan terhadap PMF. kebocoran yang terjadi akibat pembentukan lubang ditunjukkan adanya aktivitas keluar masuknya molekul seluler. kebocoran ini berdampak pada penurunan gradient pH seluler sehingga terjadi pelepasan molekul intraseluler dan masuknya substansi ekstraseluler. Efek ini menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel dan terjadi proses kematian pada sel yang sensitive terhadap bakteriosin. Mekanisme biosintesis bakteriosin dapat dilihat pada Gambar dibawah ini.



**Gambar 9.1: Mekanisme aksi Bakteriosin merusak membran sel bakteri patogen, A=Penempelan Bakteriosin, B= Pembentukan Pori pada dinding sel (Drider *et al.*, 2006)**

#### 9.4 Uji Antimikroba Terhadap *Staphylococcus aureus*

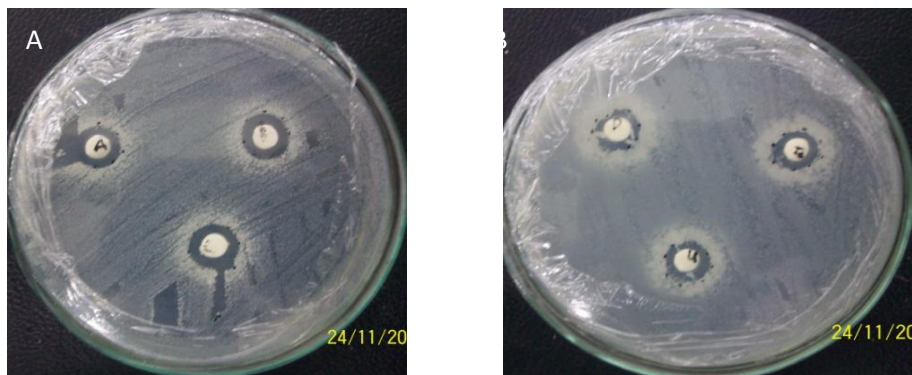
Metode yang digunakan dalam uji ini adalah metode cakram dengan diameter disc 7 mm seperti yang terlihat pada contoh dibawah ini menggunakan 6 isolat BAL yang diisolasi dari fermentasi Sirsak.



**Gambar 9.2: Zona hambat ke-6 isolat *Staphylococcus aureus*, A. Isolat S48A, S48B, S48C dan B. Isolat S48D, S48E, S36A.**

Uji antimikroba yang dilakukan terhadap kultur sel dari isolat BAL dengan mengamati besarnya zona bening yang terbentuk pada gambar diatas memperlihatkan aktivitas hambat 6 isolat terhadap *Staphylococcus aureus*. Ke-6 kultur sel isolat memperlihatkan kemampuan hambat terhadap bakteri patogen yang sangat baik, hingga jam ke 72<sup>5,6,7</sup>.

Uji antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus sp* dari 6 isolat memperlihatkan zona hambat berkisar antara 10-15 mm seperti yang terlihat pada gambar berikut.



**Gambar 9.3: Zona hambat ke-6 isolat *Streptococcus sp.*, A. Isolat S48A, S48B, S48C dan B. Isolat S48D, S48E, S36A.**

Zona hambat terbesar dan stabil adalah pada isolat S48A, S48B dan S48C sedangkan isolat S48D, S48E dan S36A memiliki kemampuan hambat tetapi tidak terlalu besar ini terlihat dari lingkaran putih di sekitar zona bening. Kemampuan hambat terhadap *Streptococcus sp.* ini di amati sampai jam ke-72. Rata-rata ke-6 isolat mulai memperlihatkan penurunan aktivitas hingga jam ke-72<sup>5</sup>.

## 9.5 Daftar Pustaka

1. Conventry MJ, Gordon JB, Wilcock A, Harmark K, Davidson BE, Hickey MW, Hillier AJ, Wan J. (1997). Detection of bacteriocin of LAB isolated from food and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.* 83, 248–258
2. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 85–106
3. Gálvez A. (2003). Antimicrobial activity of Enterocin EJ.97 on *B. coagulans* CECT12. *Food Microbiol.* 20, 533–536
4. Garneau S, Martin N, Vederas JC. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577–592
5. Sumaryati Syukur, Della Amelia Utami dan Abdi Darma, 2011, Isolasi, Karakterisasi Bakteri Asam laktat dan Penentuan Protein Antimikroba Bakteriosin dari Fermentasi Buah Sirsak (*Annona maricata L*) di Sumatra Barat, Seminar MIPA-BKS barat, Banjarmasin, Mei 9-11.
6. Syukur S, Edy F, and Jamsari, Isolation, Antimicrobial Activity and Protein Bacteriocin Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dadih in Solok, West Sumatera, Indonesia, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* , 6, 106-1104. 2014
7. Syukur S, Hermansyah A, Fachrial E, Probiotic strong antimicrobial of buffalo milk fermentation (Dadiah) from different places in west Sumatra Indonesia, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(6)pp 386. 2016

## BAB X. PRODUKSI BAKTERIOSIN

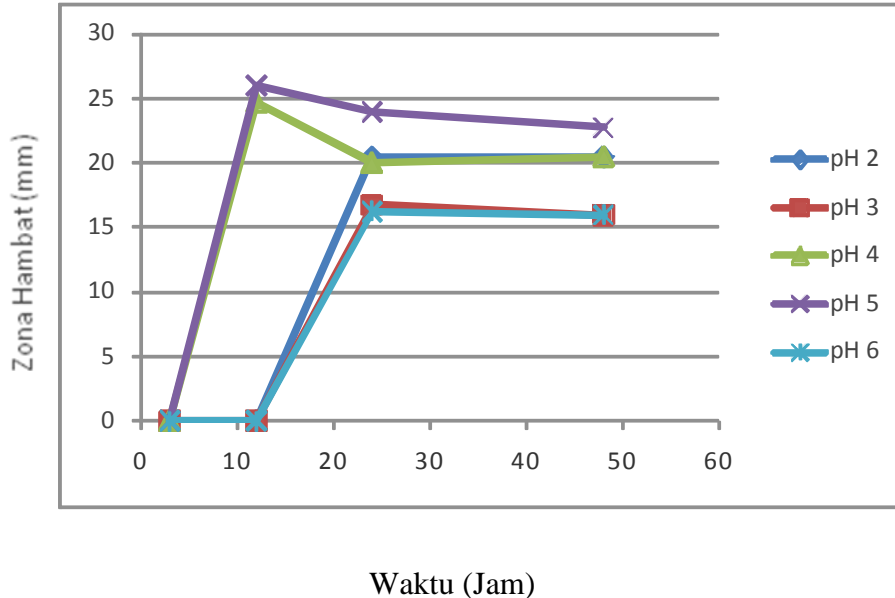
### 10.1 Fungsi Bakteriosin<sup>3</sup>

Bakteri asam laktat (BAL) dari waktu ke waktu digunakan di dalam proses fermentasi dan senyawa antibakteri (bakterisidal) yang dihasilkan bakteri asam laktat dapat menghambat mikroorganisme lainnya. Beberapa senyawa antibakteri yang disintesis oleh bakteri asam laktat adalah **hidrogen peroksida, karbondioksida, diasetil, asam organik, asam lemak, dan bakteriosin.**

Dari beberapa komponen bioaktif yang dihasilkan, bakteriosin merupakan hasil metabolisme bakteri asam laktat yang banyak dikaji dan digunakan sebagai **bahan pengawet**, karena memiliki sifat yang **tahan terhadap panas**, tidak mudah menguap seperti hidrogen peroksida dan alkohol, **tidak merubah aroma**, dan rasa seperti asam laktat, serta **tidak merubah warna produk akhir.**

### 10.2 Optimasi Pembentukan Bakteriosin<sup>3</sup>

Analisis dari uji antimikroba dipilih isolat yaitu S48C dengan zona hambat terhadap bakteri patogen terutama pada *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp.* yang lebih besar. Isolat terpilih ditumbuhkan ke dalam MRS broth dengan range pH 2, 3, 4, 5, dan 6. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa supernatan isolat S48C menghasilkan zona bening yang besar terhadap bakteri indikator *Streptococcus sp.* yaitu berkisar antara 16-22,75 mm untuk semua variasi pH namun zona bening paling luas adalah pada pH 5. Seperti yang terlihat pada gambar kurva berikut.

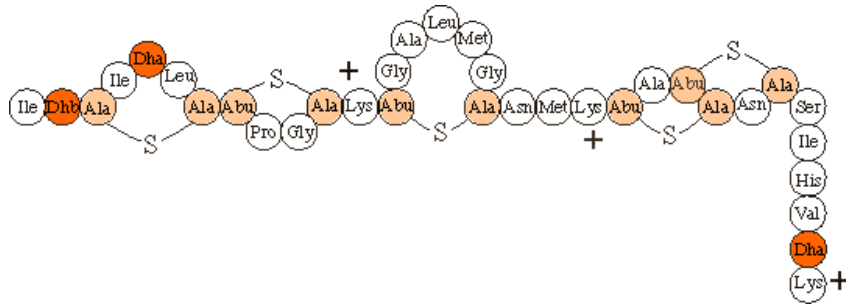


Gambar 10.1: Zona hambat supernatan isolat S48C terhadap *Streptococcus sp.*

Kemampuan Isolat S48C pada BAL fermentasi sirsak dalam menghambat bakteri patogen dari golongan bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp.*) membuktikan bahwa kemampuan menghambat lebih besar terhadap mikroorganisme yang secara filogenetik memiliki kekerabatan yang dekat. Sama halnya dengan yang dikatakan bahwa beberapa kriteria bakteriosin berupa protein, bersifat bakterisida memiliki sifat pengikat spesifik (*specific binding site*) dan aktif terhadap bakteri yang dekat secara filogenetik <sup>1</sup>.

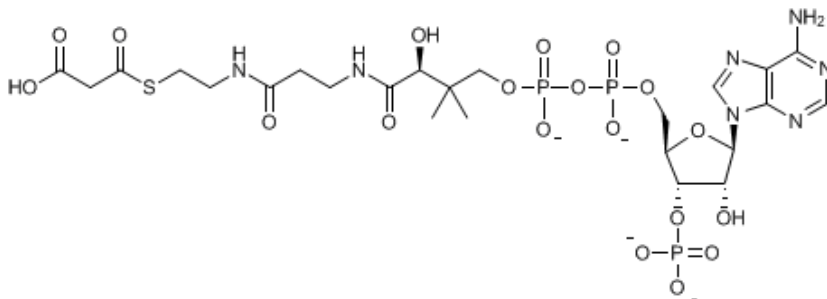
Syukur S, (2012) mendefinisikan bakteriosin sebagai protein atau polipeptida yang disintesis oleh ribosom pada bakteri yang mempunyai aktivitas bakterisidal dan mudah dicerna oleh protease (enzim pencernaan manusia). Bakteriosin efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri pathogen dan pembusuk, diantaranya *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Morganella morganii*, serta bakteri asam laktat lainnya <sup>1,2</sup>

Beberapa BAL diketahui menghasilkan bakteriosin dengan spektrum antibakteri yang luas melawan bakteri Gram positif sehingga potensial digunakan sebagai biopreservatif makanan <sup>2,3</sup>.



Gambar 10.2: Struktur primer asam amino protein Nisin

**Nisin** mampu menghambat *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* dan bakteri asam laktat lain (Meghroun et al., 1999); Pediocin PA-1 dapat menghambat *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* dan bakteri asam laktat lain (Eijsink et al., 1998); sakacin A menghambat *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus cereus* serta BAL lainnya<sup>1,2,3</sup>.



Gambar 10.3: Struktur Kimia Enterocin

Bakteriosin disintesis selama fase eksponensial pertumbuhan sel mengikuti pola klasik sintesis protein. Sistem ini diatur oleh plasmid DNA ekstra kromosomal dan dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama pH. Umumnya bakteriosin disintesis melalui jalur ribosomal<sup>1,2</sup>, sedangkan kelompok lantibiotik disintesis secara ribosomal sebagai prepeptida kemudian mengalami modifikasi. Sekresi prepeptida dilakukan pada fase eksponensial dan diproduksi secara maksimal pada fase stasioner. Prinsip regulasi sintesis bakteriosin diatur oleh adanya gen pengkode produksi dan pengkode immunitas.



Cara meningkatkan produksi bakteriosin adalah, <sup>1,2,3</sup>

1. Menyeleksi BAL yang potensial mempunyai antibakteri yang tinggi terhadap bakteri patogen
2. Menumbuhkan pada media kompleks semi sintesis seperti MRS (deMann Rogosa Sharpe) dapat menghasilkan populasi sel bakteri yang tinggi dan bakteriosin yang relatif banyak . Protein tinggi seperti tripton, pepton, ekstrak daging, dan ekstrak khamir akan dikonsumsi oleh bakteri untuk produksi bakteriosin.
3. Produksi bakteriosin umumnya dilakukan dalam kultur substrat cair
4. Mengoptimasikan media dengan berbagai kondisi faktor pH, suhu, sumber karbon, serta fase pertumbuhan yang sesuai karena mempengaruhi produksi bakteriosin dalam media tersebut. Aktivitas produksi bakteriosin oleh BAL dipengaruhi oleh. Jenis sumber karbon maupun sumber nitrogen yang digunakan dalam medium produksi mempengaruhi laju pertumbuhan sel BAL, selanjutnya berpengaruh terhadap metabolisme produksi bakteriosin.
5. Selain itu tingkat salinitas medium produksi seperti kandungan garam dari media turut mempengaruhi metabolisme produksi bakteriosin. Secara umum kondisi optimum produksi bakteriosin selain dipengaruhi oleh fase pertumbuhan, pH media, suhu inkubasi, jenis sumber karbon dan sumber nitrogen juga konsentrasi NaCl.

### **10.3 Sintesis Bakteriosin** <sup>1,2</sup>

Bakterisin disintesis oleh ribosom bakteri asam laktat, namun tidak semua bakteri asam laktat memproduksi bakteriosin. Optimalisasi produksi bakteriosin tergantung pada nutrisi media, kondisi kultur selama inkubasi (pH, suhu, aerasi) dan fase pertumbuhan (lamanya inkubasi). Masing-masing bakteri asam laktat memiliki kondisi optimum pembentukan bakteriosin yang berbeda, namun secara umum media nutrisi harus memenuhi kebutuhan sumber karbon, nitrogen, pospor, vitamin, dan mineral, selain itu umumnya produksi bakteriosin optimum pada pH netral dengan suhu yang berkisar antara 25-37°C. Produksi bakteriosin juga dapat ditingkatkan dengan menggunakan teknologi cloning DNA/plasmid penanda bakteriosin pada bakteri produser seperti *Escherichia coli*.

Bakteriosin disintesis selama fase eksponensial pertumbuhan sel mengikuti pola klasik sintesis protein. Sistem ini diatur oleh plasmid DNA ekstra kromosomal dan dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama pH. Umumnya bakteriosin disintesis melalui jalur ribosomal, sedangkan kelompok **lantibiotik** disintesis secara ribosomal sebagai **prepeptida** kemudian mengalami modifikasi. Prinsip regulasi sintesis bakteriosin diatur oleh adanya gen pengkode produksi dan pengkode imunitas.

Biosintesis lantibiotik dimulai dengan penyusunan gen pengkode prebakteriosin untuk menyusun prepeptida (Lan A). Prebakteriosin dimodifikasi oleh enzim Lan B dan Lan C, ditranslokasikan melalui *ABC-transport* LanT dan diproses oleh LanP yang menghasilkan bakteriosin, demikian pula dengan protein yang bersifat sebagai *self-protection (immunity)* diproduksi bersamaan dengan produksi bakteriosin. Histidin protein kinase (HPK) yang terdapat pada bakteriosin mengalami autophosphorilasi menghasilkan phosphor yang ditransfer ke *respon regulator (RR)*. RR mengaktifasi transkripsi gen bakteriosin <sup>1,2</sup>.

Biosintesis pada bakteriosin kelas II, dimuai dengan formasi prebakteriosin dan prepeptida sebagai *induction factor (IF)*. Prebakteriosin dan pre-IF diproses dan ditraslokasi oleh *ABC-transport* yang menghasilkan bakteriosin dan IF. Histidine proein kinase mengalami *autophosphorilasi* dengan adanya IF yang menghasilkan *phosphor* yang ditransfer ke RR. RR mengaktifasi transkripsi gen bakteriosin dan imunitas.

Sekresi prepeptida bakteriosin dilakukan pada fase eksponensial dan diproduksi secara maksimal pada fase stasioner, sehingga bakteriosin tergolong sebagai metabolit sekunder dari bakteri asam laktat.

#### **10.4 Bakteri Asam Laktat Penghasil Bakteriosin** <sup>3</sup>

Bakteriosin dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL), namun tidak semua bakteri asam laktat menghasilkan bakteriosin. Oleh karena itu skrining bakteri asam laktat diperlukan untuk mengisolasi BAL penghasil bakteriosin. Skrining BAL penghasil bakteriosin dapat dilakukan dengan metode skringing langsung dan metode skrining tidak langsung.

Yang termasuk dalam Metode skrining langsung adalah metode difusi sumur. Metode ini dikembangkan dengan menumbuhkan organism yang diuji sebagai penghasil bakteriosin dan bakteri indikator (antagonis) secara bersamaan. Supernatan dari kultur yang diduga penghasil bakteriosin ditempatkan dalam sumuran sehingga akan berdifusi pada media agar. Timbulnya zona jernih penghambatan pada media agar (media uji) disekitar sumuran merupakan pertanda adanya bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat yang menghambat pertumbuhan bakteri indikator.

Metode difusi sumur sering digunakan dalam skrining bakteri asam laktat penghasil bakteriosin. Beberapa factor yang dapat memberikan hasil negative yang salah dalam menggunakan uji difusi sumur adalah adanya agregasi, bakteriosin yang bersifat non-diffusable, adanya inaktivasi bakteriosin oleh protease, dan kosentrasi bakteriosin yang rendah <sup>3</sup>.

Uji *spot on the lawn* dan metode *flip streak* merupakan metode skrining bakteriosin tidak langsung. Pada kedua metode ini, isolat bakteri asam laktat yang diduga menghasilkan bakteriosin ditumbuhkan terlebih dahulu pada media uji, sehingga akan membentuk koloni dan bakteriosin terlebih dahulu. Pada uji *spot on the lawn*, koloni dilapisi (*overlay*) dengan bakteri indikator. Sedangkan pada metode *flip streak*, bakteri indikator digoreskan tegak lurus dengan bakteri asam laktat. Adanya zona jernih membuktikan bahwa bakteri indikator tidak tumbuh karena adanya bakteriosin dari bakteri asam laktat. Hasil aktivitas antagonis bakteriosin terhadap bakteri indicator <sup>1,2,3</sup>.

Aktivitas penghambatan bakteriosin dinyatakan dalam *activity unit* (AU) ataupun *bacteriocin unit* (BU). Nilai AU ataupun BU dapat diperoleh dengan dua cara, yaitu pertama, kebalikan dari pengenceran yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan sebesar 50% dibandingkan dengan sampel kontrol (tanpa bakteriosin) yang dilakukan dengan metode turbidimetri. Kedua, kebalikan dari pengenceran tertinggi yang menghasilkan zona jernih penghambatan pertumbuhan pada media pertumbuhan yang dilakukan dengan metode *agar plate assay*.

## 10.5 Kondisi Optimum Produksi Bakteriosin<sup>1,2,3</sup>

### 1. Optimasi pertumbuhan Bakteri Asam Laktat

Pertumbuhan bakteri asam laktat akan mengalami peningkatan dengan meningkatnya waktu inkubasi. Peningkatan ini berlangsung secara logaritma. Meningkatnya jumlah biomassa akan menyebabkan jumlah bakteriosin yang dihasilkan juga akan meningkat kemudian turun setelah mencapai fase stasioner.

Kultur Bakteri asam laktat:

#### 1. Metoda Enrichment

Kultur BAL pada metoda Enrichment ini adalah pemindahan sampel setelah difermentasi dapat dilakukan pada medium MRS Broth atau Tioglikolat (TGE).

#### 2. Metoda Serial Dilution

Setelah Enrichment, dilakukan pengenceran sampai  $10^{-7}$  atau  $10^{-9}$  untuk mencari isolat BAL. medium yang digunakan adalah pepton water.

#### 3. Metoda Plating

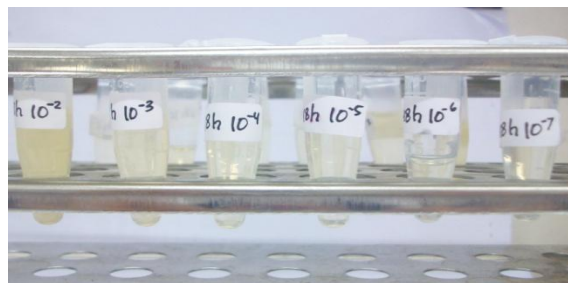
Kultur selanjutnya adalah penanaman kedalam medium MRS agar. Untuk menumbuhkan BAL dalam bentuk koloni-koloni.

#### 4. Produksi Bakteriosin

Kultur yang dilakukan untuk produksi bakteriosin dan untuk pemurnian adalah dengan medium MRS Broth.

#### 5. Uji Antimikroba

Medium kultur untuk uji antimikroba adalah dengan medium MRS Agar atau Nutrient agar.



Gambar 10.4: Metode Pengenceran<sup>3</sup>

Setiap pengkulturan diperhatikan Faktor media akan mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri selanjutnya akan mempengaruhi produksi bakteriosin. Produksi bakteriosin akan meningkat dengan meningkatnya pH sampai pH optimum dan kemudian akan mengalami penurunan. pH optimum untuk produksi bakteriosin dari isolat *Lactobacillus lactis* adalah 6.5. Sementara itu faktor suhu mempunyai dua pengaruh yang bertentangan yaitu meningkatkan produksi bakteriosin tetapi juga dapat membunuh bakteri asam laktat penghasil bakteriosin. Suhu optimum merupakan batas keduanya. Peningkatan suhu sebelum mencapai suhu optimum akan meningkatkan pertumbuhan bakteri dan produksi bakteriosin.

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang tergolong fastidious yang tumbuh pada media kompleks. Beberapa media yang sering digunakan untuk pembiakan bakteri asam laktat adalah media MRS (*de Man Rogosa and Sharpe*), *Triptone Glukose yeast Extract* (TGE). dan *Glucose, Yeast Pepton* (GYP). Beberapa komponen nutrisi penyusun media kultur bakteri asam laktat yaitu glukosa dan gliserol sebagai sumber karbon dan energy, yeast extract dan beef extract sebagai sumber vitamin dan nitrogen, pepton/tripton sebagai sumber asam amino, N, S, dan P, serta berbagai mineral  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , dan  $\text{PeSO}_4$  serta  $\text{CaCO}_3$  sebagai penstabil pH.

Sejumlah BAL yang ditumbuhkan pada media kompleks semi sintetis yang mengandung protein tinggi seperti tripton, pepton, ekstrak daging, dan ekstrak khamir seperti MRS (*de Man Rogosa Sharpe*) dapat menghasilkan populasi sel bakteri yang tinggi dan bakteriosin yang relatif banyak. Untuk melakukan produksi bakteriosin dari *Lactobacillus brevis* OG1 dengan menggunakan media MRS (glukosa 0,25% dan pepton 0,5%) yang ditambahkan beberapa nutrisi tambahan yaitu trypton, yeast extract, beef extract, NaCl, glucose, Tween 80, tri-amonium sitrat, Sodium asetat,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Produksi bakteriosin *Lactobacillus brevis* OG1 dikondisikan pada  $30^\circ\text{C}$  selama 72 jam, Produksi bakteriosin tertinggi sebesar 6400 AU/mL terdapat pada penggunaan MRS dengan penambahan masing-masing Yeast extract (2-3%), NaCl (1-2%), glukosa (1%), dan Tween 80 (0.5%)<sup>1,2,3</sup>.

## 2. Medium *Bacillus thuringiensis*

Bakteri ini memproduksi bakteriosin pada media **glukosa** yang sebelumnya dikultur pada media LB. Media glukosa terdiri dari glukosa dan gliserol sebagai sumber karbon, ammonium sulfat dan yeast extract sebagai sumber nitrogen dengan penambahan mineral  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , dan  $\text{PeSO}_4$  serta  $\text{CaCO}_3$  sebagai penstabil pH. Kosentrasi Kombinasi media glukosa 0,5% dan gliserol 0,75%, yeast extract 5%, menghasilkan bakteriosin dengan aktivitas tertinggi dibandingkan dengan kosentrasi lainnya.

## 3. Bakteri *Pediococcus*<sup>3</sup>

Bakteri BAL *Pediococcus* pada fermentasi yang terdiri dari glukosa (1%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2%), NaCl (0,2%), yeast autolysate (35mg%). Substitusi sukrosa terhadap glukosa meningkatkan aktivitas bakteriosin sebesar 26% (dari 3890 IU/mL menjadi 5180 IU/mL) dan penambahan isoleusin meningkatkan aktivitas 28,5% (5250 IU/mL).

## 4. *Pediococcus acidilactici* H<sup>3</sup>

Antimikrobal Pediosin AcH dari *Pediococcus acidilactici* H diproduksi optimum pada media **TGE broth** dengan komposisi triptikosa/triptosa (1%), glukosa (1%), ekstrak khamir (1%), tween 80 (0,2%),  $\text{Mg}^{2+}$  (0,005%),  $\text{Mn}^{2+}$  (0,005%), pada pH 6,5 dan suhu inkubasi 37°C. Pada pH 4 dan dibawahnya, bila perbanyakkan sel dan produksi asam hampir turun maka sejumlah besar pediosin AcH akan disekresikan ke dalam medium.

Mahalnya media kultur bakteri asam laktat penghasil bakteriosin, memunculkan berbagai cara untuk mengganti, mensubstitusi maupun menambahkan komponen alami untuk mengurangi penggunaan media sintetis. Penggunaan hidrolisat protein dari **ikan herring dan mackerel** sebagai sumber **pepton** dengan penambahan **dextrose**, *yeast extract*, NaCl dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dengan pH dikondisikan 7. Kandungan asam amino hidrolisat protein ikan yang lengkap sebagai sumber nitrogen. Penggunaan hidrolisat protein ikan, meningkatkan pertumbuhan *Lactococcus lactic* dan *Pediococcus acidilactici* bila dibandingkan dengan penggunaan media MRS.

### **Peranan aerasi terhadap produksi bakteriosin**

Sebagian besar bakteri asam laktat bersifat *anaerobic fakultatif* meskipun ada yang bersifat *anaerobic obligat* seperti *Bifidobacteria*. Keberadaan oksigen pada kultur bakteri asam laktat akan berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan berbagai komponen metabolit yang dihasilkan. Pada produksi bakteriosin bacthuricin F4 dari *Bacillus thuringiensis*, produksi optimum bakteriosin terdapat pada kultur dengan sedikit aerasi sedangkan produksi sel optimum terdapat pada kultur dengan aerasi tinggi <sup>1,2,3</sup>.

### **Peranan suhu terhadap produksi bakteriosin**

Suhu merupakan faktor penting dalam pertumbuhan bakteri asam laktat dan produksi bakteriosin. Secara umum bakteri asam laktat tumbuh dan membentuk bakteriosin pada kisaran suhu 25-37°C dengan suhu optimum yang berbeda-beda. *L. brevis* OG1 tumbuh dan memproduksi bakteriosin optimum pada suhu 30°C selama 48-60 jam inkubasi <sup>1,2,3</sup>.

### **Peranan pH terhadap produksi bakteriosin**

Seperti halnya suhu, pH merupakan factor penting dalam pertumbuhan dan pembentukan bakteriosin pada bakteri asam laktat. *L. casei* RN 78 tumbuh baik dan membentuk bakteriosin optimum pada pH 5 dan 6 dalam media MRS <sup>1,2,3</sup>.

### **Kloning Gen Bakteriosin <sup>3</sup>**

Produksi bakteriosin dalam sel bakteri asam laktat berhubungan dengan gen penanda penghasil bakteriosin dalam plasmid DNA. Kemajuan teknologi menghasilkan teknologi isolasi gen penanda bakteriosin pada plasmid bakteri asam laktat tertentu. Oleh karena itu plasmid bakteri asam laktat sebagai penanda yang memproduksi bakteriosin dapat diisolasi dan dikloning dalam plasmid bakteri lain untuk kepentingan produksi bakteriosin. Isolasi dan cloning plasmid pembentuk bakteriosin dimulai dengan mapping plasmid bakteriosin. Restrecsion menggunakan enzim tertentu akan menghasilkan fragmentasi dari plasmid serta dapat mengetahui bagian plasmid yang menjadi penanda produksi bakteriosin.

Pada mapping plasmid penanda aktivitas bakteriosin, fragmen plasmid pMB 225 dengan enzim restriksi ClaI-ScaI serta pMB553 dengan enzim ScaI-HindII merupakan fragmen plasmid penanda produksi bakteriosin. Cloning gen pMB225 dan pMB553 dari *Lactococcus lactis* dilakukan pada *Escherichia coli*. Hasil cloning menunjukkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan dari *E. coli* memiliki aktivitas yang berbeda terhadap berbagai bakteri indikator bila dibandingkan dengan bakteriosin dari *L. lactis*. Ini menunjukkan keberagaman aktivitas bakteriosin. Bakteriosin yang berasal dari genus bakteri asam laktat yang sama terkadang mempunyai daya aktivitas yang berbeda-beda.

### **Purifikasi bakteriosin**<sup>1,2,3</sup>

Bakteriosin merupakan rangkaian polipeptida yang dihasilkan dari rangkaian metabolisme kompleks dalam sel bakteri. Kondisi ini menyebabkan keberadaan bakteriosin bercampur dengan metabolit lainnya yang kemungkinan berpengaruh terhadap aktivitas bakteriosin. Aktivitas bakteriosin meningkat seiring dengankemurniannya. Beberapa bakteriosin yang sudah dimurnikan adalah nisin, laktosin, diplokokin, laktasin B, pediosin AcH, dan pediosin PA-1. Beberapa tahapan dalam purifikasi bakteriosin adalah presipitasi ammonium sulfat, kromatografi pertukaran ion, kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi cair kinerja tinggi fase balik. Purifikasi terhadap bakteriosin dari *BAL Pediococcus* mendapatkan aktivitas bakteriosin hasil purifikasi meningkat 89,8% dibandingkan dibandingkan dengan supernatant dari kultur bakteri. Selengkapnya dapat dilihat pada table berikut ini.



Tabel 10.1. Purifikasi dan aktivitas bakteriosin *Pediococcus*<sup>3</sup>

Sample	Vol (mL)	Protein (mg/mL)	Sp Activ. (AU/mg)	Purity (%)
Culture supernatant	6.500	1,2	14.000	0
Crude (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	480	3,2	29.000	9,1
SP Sepharose cation exchange	314	2,1	235.000	62,3
Octyl-Sepharose hydrophobic interaction chromatography	250	1,3	540.000	89,8



Gambar 10.5: Bakteriosin Pediosin

## 10.6 Daftar Pustaka

1. Ivanova, I. *et. al.* 2000. *Detection, Purification and Partial Characterization of a Novel Bacteriocin Substance Produced by Lactococcus lactis subsp. Lactis b14 Isolated from Boza Bulgaria Traditional Cereal Beverage.* Journal of Biocatalisys, Fundamental and Applications. Vol. 41, no. 6.

2. Jagadesswari, S., Vidya. P, *at. al.*, 2010. *Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing Lactobacillus sp. From Traditional Fermented Food.* Electronic journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry, 9(3) 575-581.
3. Sumaryati Syukur, 2012. *Isolasi, Karakterisasi, Penentuan Struktur Bakteriosin Sebagai Antimikroba/Antibiotik Alami dari Mikroba Pangan Fermentasi Lokal dan Bakteri Termophilik Sumatra Barat Untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat, Laporan Penelitian Hibah Pasca, DP2M DIKTI, pp 25-35.*

## BAB XI. PROBIOTIK UNTUK MENURUNKAN KOLESTEROL

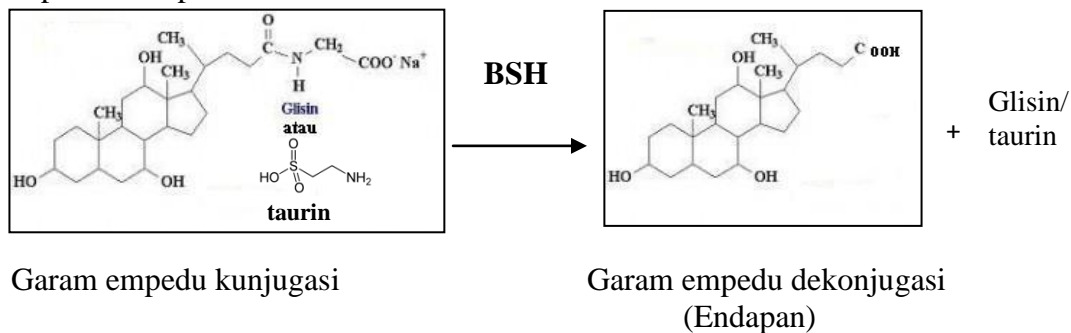
### 11.1 Peran Probiotik BAL terhadap Kolesterol

Kolesterol bersama lemak jahat (LDL) cenderung menempel di dinding pembuluh darah sehingga lama kelamaan menimbulkan penyempitan pembuluh darah, berlanjut dengan gangguan jantung bahkan stroke. Kadar kolesterol dapat diturunkan salah satunya adalah dengan mengkonsumsi probiotik.

Pengaruh bakteri probiotik terhadap penurunan kadar kolesterol diduga karena kemampuannya dalam mengasimilasi kolesterol dan mendeconjugasi asam empedu. Bakteri asam laktat yang mempunyai kemampuan spesifik akan bekerja efektif apabila dapat bertahan pada kondisi yang ada dalam saluran pencernaan. Oleh karena itu strain dari bakteri asam laktat tersebut harus tahan terhadap garam empedu dan kondisi asam lambung apabila dikonsumsi<sup>1</sup>.

Proses dekonjugasi ini terjadi karena bakteri memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) yang dapat menghidrolisis atau memutuskan ikatan C-24 N-acyl amida yang terbentuk diantara asam empedu dan asam amino pada garam empedu terkonjugasi. Proses dari dekonjugasi menghasilkan garam empedu terdekonjugasi (*Unconjugated Bile Salt*) yang memiliki tingkat solubilitas/kelarutannya di dalam pH fisiologis lebih rendah, sehingga garam empedu terdekonjugasi lebih hidrofobik, kurang ionik dan secara pasif dapat langsung diabsorpsi oleh mukosa usus kembali ke hati melalui peredaran darah. Garam empedu terdekonjugasi memiliki kemampuan antimikroba yang rendah, sehingga tidak terlalu membahayakan kehidupan bakteri. Proses dekonjugasi dapat dilihat pada gambar dibawah ini<sup>2</sup>

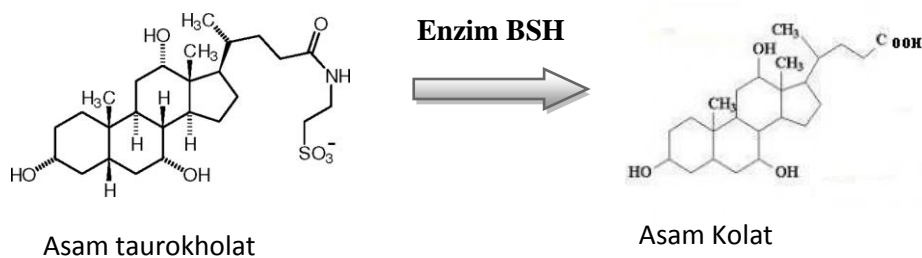
dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 11.1 Peranan BAL membentuk asam empedu dekonjugasi

Garam empedu yang bergabung dengan taurin dan glisin merupakan garam empedu terkonjugasi. Garam empedu terkonjugasi adalah suatu senyawa amphipatik, yang salah satu sisinya dapat larut dalam air (*polar/hydrophilic*) dan sisi lainnya tidak larut dalam air (*nonpolar/hydrophobic*). Struktur amphipatik ini mampu mengakumulasi atau menggabungkan antara air dan minyak/lemak dan menstabilkannya<sup>3</sup>.

Strain bakteri asam laktat yang memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH), berperan dalam membentuk asam empedu dekonjugasi dengan penghilangan molekul air antara glisin dengan asam kolat menghasilkan asam kolat bebas (*unconjugated bile acid*). Asam kolat bebas tidak mudah diserap oleh usus halus dibanding asam empedu yang berikatan dengan glisin. Asam empedu dekonjugasi (asam kolat bebas) akan terbuang lewat feses sehingga jumlah asam empedu yang kembali ke hati berkurang. Untuk menyeimbangkan jumlah asam empedu, tubuh akan mengambil kolesterol tubuh sebagai prekursor. Proses itu pada gilirannya akan menurunkan kadar kolesterol darah secara keseluruhan. Reaksi dapat dilihat dibawah ini.



Gambar 11.2: Reaksi garam empedu dengan enzim BSH/ dekonjugasi garam empedu

Khusus BAL *Lactobacillus acidophilus* mempunyai kemampuan menurunkan kolesterol dalam usus halus sebelum kolesterol diserap oleh tubuh dengan cara pengikatan kolesterol oleh sel bakteri sehingga menyebabkan turunnya kadar kolesterol<sup>4</sup>.

Analisis kolesterol dengan metode Warna Enzimatik

1. Sebanyak 1 ml reagent (kit) kolesterol dipipetkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan hasil ekstraksi sebanyak 0,01 ml.

2. Larutan kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar sehingga warna larutan berubah menjadi warna lembayung (Lampiran 6).
3. Pembuatan blanko: 1 ml kit kolesterol dipipet ke dalam tabung reaksi. Blanko dibuat sebagai pembanding. Setiap satu analisa dibuatkan satu seri blanko.
4. Blanko dimasukkan ke dalam sel spektrofotometer setelah diarahkan pada panjang gelombang 550 nm, setelah angka dimonitor menunjukkan angka 0 dimasukkan sampel yang akan dibaca. Kadar kolesterol merupakan angka yang terbaca di monitor spektrofotometer.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada  $P < 0,05$  terhadap kolesterol kuning telur itik perlakuan dan campuran kuning dan putih telur itik perlakuan. Berdasarkan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT), terlihat bahwa perlakuan pemberian probiotik berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) menurunkan kadar kolesterol kuning telur dan campuran kuning dan putih telur dibandingkan dengan perlakuan tanpa pemberian probiotik. Ini disebabkan adanya BAL dalam saluran pencernaan yang mampu menurunkan kolesterol.

Kolesterol pada kuning telur yang didapat selama penelitian dari perlakuan B, C dan D berturut-turut adalah 234,13 mg/dl, 219,70 mg/dl dan 118,62 mg/dl. Kolesterol pada campuran kuning dan putih selama perlakuan B, C dan D berturut-turut adalah 139,64 mg/dl, 102,60 mg/dl dan 75,37 mg/dl. Adanya penurunan kadar kolesterol pada kuning telur maupun campuran kuning dan putih dari perlakuan disebabkan semakin besar jumlah probiotik yang diberikan sehingga semakin tinggi jumlah mikroba di dalam saluran pencernaan. Pemberian 1 ml *Pediococcus pentosaceus* setara dengan  $1,27 \times 10^7$  CFU/g. Peningkatnya jumlah mikroba mengakibatkan terhambatnya kerja enzim Hydroxi Metyl Glutaryil-KoA reduktase (HMG-KoA reduktase) yang berperan dalam pembentukan mevalonat dalam proses sintesis kolesterol sehingga tidak terbentuknya kolesterol. Sesuai dengan banyak hasil penelitian menyatakan penurunan kolesterol terjadi karena senyawa yang dihasilkan mikrobia berkompetisi dengan HMG-KoA untuk berikatan dengan enzim HMG-KoA reduktase.

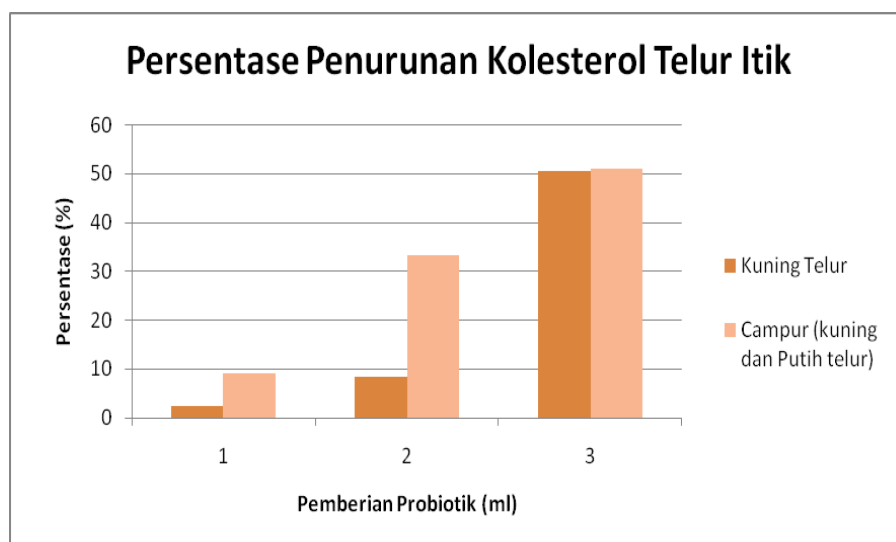
Hasil penelitian lain juga menjelaskan bahwa pemberian probiotik pada ayam meningkatkan kualitas telur ayam diantaranya penurunan kadar kolesterol dan trigiliserida telur

ayam. Hal ini diterangkan bahwa kolesterol pada telur di sintesis dalam hati unggas, kemudian dibawa oleh darah dalam bentuk lipoprotein dan tersimpan dalam folikel pertumbuhan dan diteruskan ke ovarium. BAL sebagai probiotik mampu menurunkan kolesterol sehingga kolesterol yang akan diteruskan ke ovarium akan berkurang dan menyebabkan turunnya kolesterol telur.

Penurunan kolesterol disebabkan karena kemampuan probiotik dalam mendekongugasi garam empedu. Proses dekonjugasi terjadi karena bakteri probiotik memproduksi enzim *Bile Salt Hydrolase* (BSH) (*cholylglycine hydrolase*; EC 3.5.1.24) yaitu enzim yang mengkatalisis hidrolisis glisin- dan taurin-garam empedu terkonjugasi menjadi residu asam amino dan garam empedu bebas (asam empedu). Mekanismenya adalah BSH menghidrolisis atau memutuskan ikatan C-24 N-Acyl amida yang terbentuk diantara asam empedu dan asam amino pada garam empedu terkonjugasi menghasilkan garam empedu terdekonjugasi dan glisin/taurin. Garam empedu terdekonjugasi memiliki tingkat kelarutan rendah, lebih hidrofobik dan secara paif langsung diserap oleh mukosa usus kembali ke hati melalui peredaran darah. BSH juga berperan dalam penghilangan molekul air antara glisin/taurin dengan asam kolat yang menghasilkan asam kolat bebas.

Asam kolat yang terbentuk kurang diserap oleh usus halus dibandingkan garam empedu terkonjugasi, dengan demikian asam empedu yang kembali ke hati selama sirkulasi enterohepatik menjadi berkurang dan terbuang melalui feses. Jadi asam empedu terdekonjugasi (asam kolat) akan terbuang melalui feses dan mengakibatkan semakin banyak kolesterol yang dibutuhkan untuk mensintesis garam empedu lagi sehingga menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh dan juga berkurangnya tranfer kolesterol pada ovarium itik, sehingga kolesterol yang terkandung pada telur itik juga menurun.

Menurunnya kolesterol pada telur itik mengindikasikan bahwa dengan pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* berpengaruh sangat nyata dan membuktikan bahwa probiotik dapat memberikan dampak yang positif untuk kesehatan.



Gambar 11.3: Persentase Penurunan Kolesterol Telur itik

Grafik diatas menggambarkan bahwa pengaruh pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* terhadap kadar kolesterol adalah pada penambahan 1 ml, 2 ml dan 3 ml *Pediococcus pentosaceus* persentase penurunannya secara berturut-turun adalah 2,4%, 8,35% dan 50,5% untuk kuning telur dan 9,1%, 33,20% dan 50,9% untuk campuran kuning dan putih telur. Pemberian probiotik *Pediococcus pentosaceus* dengan dosis 3 ml ( $3,81 \times 10^7$  CFU/g) mampu menurunkan kadar kolesterol telur itik pitalah mencapai 50,9%<sup>4</sup>.

## 11.2 Daftar Pustaka

1. Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. 1985. Assimilation of cholesterol Chou by *L. acidophilus*. Appl Environ Microbiol 49:377-381
2. LZ, Weimer B. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *L. acidophilus*. J Doivy Sci 82:23-31
3. Hypocholesterolemic action of *L. acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. J Dairy Sci 79:2121-2128
4. Syukur S, Syafrizayanti, Zulaiha S, Virgin Coconut Oil Increase HDL, lower triglyceride and fatty acids profile in blood Serum of *mus musculus*, Research journal of Chemical and Pharmaceutical Research 8(2) pp 1077. 2017.

## PROFIL AUTHOR



**Sumaryati Syukur** is Professor in Biochemistry and Biotechnology at the Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Andalas University (UNAND) Padang West Sumatra Indonesia. She obtained her BSc (1978), and Dra (1979) degree from University of Andalas Padang and Master Biochemistry from ITB , Bandung Indonesia (1983), Ph.D (1992) in Molecular Biology and Biotechnology from Institute Molecular Biology Vrije Universiteit Brussels, Belgium. She work at Univ. of Andalas Padang and teaching Biotechnology and Molecular Biology at Under Graduate or Graduate Program Fac. of Sciences and Fac.of Medicine, and was promoted and Inaugurated to full professor in 2004.

After her Ph.D she was postdoctorate research in (1995) at Disney Cancer Institute and Univ of Florida, both in Orlando Florida USA. She was Consultant USAID- HEDS for 9 Universities Project for Biochemistry and Biotechnology during (1993-1996) located in Sumatra and Kalimantan. In 1996, she become First outstanding Lecturer in University of Andalas Padang, and Nasional Outstanding Lecturer. She has over more than 50 publications both in local and international journals. She has been Invitee Speaker in International Seminar in Japan, Germany, China and Belgium from (2011, 2009, and 2010) supported Grant all from DP2-M DIKTI (Derectorate General Higher Education) . Visiting Professor scientist at Univ. of Hamburg (2009) and univ.of Munster (2010) both in Germany Supported By PAR Program DITNAGA-DIKTI. She has been chairman of some International seminar In Biotechnology and molecular Biology, and Workshop in 2000, 2005, 2008 and 2011, Invitee speaker in Probiotic research at 2015 2016, at University Putra Malaysia, She has been head of Biochemistry and Biotechnology Laboratory at departemen of chemistry, FMIPA-University of Andalas Padang, and she was Coordinator of Graduate Study at Faculty of Mathematic and Natural Sciences , on 2011-2013, Andalas University Padang, Indonesia. At 2016-2017 she received Grand researchs Hibah kompetisi from Derectorate General Higher Education and Hibah Guru Besar. Now she is teaching Molecular Biology at graduate study and under graduate at faculty of Matematic and Natural Science , Chemistry Departement, Graduate Study Biomedic (S3) Programe Faculty of Medicine, and Graduate study Biotechnology at Andalas University, and has been promotor for graduate and under graduate program.



