

TESIS

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI
SIMBION BINTANG LAUT (*Protoreaster nodosus*) SEBAGAI
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

*ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF
STARFISH SYMBIONT (*Protoreaster nodosus*) AS A
PRODUCER OF ANTIBACTERIAL COMPOUND*

MUH DANIAL FAJRI

N012181019



**PROGRAM STUDI FARMASI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI
SIMBION BINTANG LAUT (*Protoreaster nodosus*) SEBAGAI
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

MUH DANIAL FAJRI

kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2021

TESIS

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI
SIMBION BINTANG LAUT (*Protoreaster nodosus*) SEBAGAI
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

Disusun dan diajukan oleh

MUH DANIAL FAJRI
Nomor Pokok N012181019

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
pada tanggal 15 Januari 2021.
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Prof. Dr. Sartini M.Si. Apt
Nip.19611111 198703 2 001

Pembimbing Pendamping



Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt
Nip.19750925 200112 1 002

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi,



Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
Nip.19800101 200312 1 004



Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin,



Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt
Nip.19750925 200112 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertandatangan di bawah ini

Nama : Muh Danial Fajri
NIM : N012181019
Program studi : Farmasi
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

'ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI SIMBION
BINTANG LAUT (Protoreaster Nodosus) SEBAGAI PENGHASIL
SENYAWA ANTIBAKTERI'

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 26 Januari 2021

Yang Menyatakan



Muh Danial Fajri

PRAKATA



Assalamu 'alaikum. Wr. Wb.

Puji dan syukur kehadiran Allah swt. atas segala limpahan rahmat dan hidayah yang telah di berikan sehingga penyusunan tesis ini dapat terselesaikan. Shalawat serta salam tercurahkan kepada Rasulullah SAW, keluarga dan sahabatnya.

Pada kesempatan yang indah ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada Kedua Orang Tua saya, bunda Hasmawati S.Ag., M.Pd, Rahmawati Habib, SE.,MM, adik-adik tercinta, Aulia, Amalia, Aris, Naya, Iwan, Faqi, Aci yang terus dan tak henti-hentinya memberi motivasi dan dorongan moril maupun material serta Doa tulus yang tak pernah terhenti dan terus terucap. Karena penulis yakin tanpa bantuan dan dukungan tersebut, sulit rasanya bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan tesis ini.

Perkenankan penulis untuk menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si.,Apt sebagai pembimbing pertama, Bapak Prof. Subehan M.Pharm, Sc., Ph.D., Apt selaku pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu selama ini untuk memberikan arahan, membagi ilmunya, menyumbangkan pikiran dan tenaga

dalam membimbing penulis selama melakukan penelitian hingga selesainya tesis ini.

2. Bapak Prof Dr Natsir Djide MS.,Apt, Prof Gemini Alam M.Si.,Apt, dan Ibunda Dr. Herlina Rante, M.Si.,Apt selaku komisi penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat membantu dalam perbaikan dan sempurnanya tesis ini.
3. Dekan Fakultas Farmasi Bapak Prof Subhan, M.Sc.,P.hD.,Apt, dan segenap Wakil Dekan Fakultas Farmasi, atas ilmu dan bantuannya yang telah diberikan kepada kami selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
4. Bapak Muhammad Aswad, S.Si.,M.Si.,Ph.D.,Apt.selaku ketua program studi magister ilmu farmasi telah membimbing penulis selama perkuliahan.
5. Ibu Dr Risfah Yulianti M.Si.,Apt selaku penasehat akademik yang senangtiasa memberikan masukan dan telah membimbing penulis selama perkuliahan.
6. Bapak ibu Dosen Fakultas Farmasi dan seluruh staf Fakultas Farmasi atas segala ilmu dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis.
7. Keluarga Besar Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UMI Ayahanda Rusli, S.Si.,M.Si.,Apt., Ayunda Fitriana, Ayunda Siska Nuryanti, kakanda Ayyub Harly Nurung, Kakanda Nasrul HAq, kakanda Amirullah, dan teman-teman Asisten yang selalu memberikan

motivasi, semangat, masukan dan memberi canda tawa untuk penulis selama mengikuti hingga menyelesaikan studi ini.

8. Teman-teman Seperjuangan Magister Farmasi Angkatan 2018, Fazrul, Hikmah, Muh Azwar AR, Zulfarhanah, Yuzrisal, Sirajul Firdaus, Wahudin Jumardin, Masyudi, Abdullah Mahmud, Anitsa, Nurfadilah, Nur Rahma rumata, Dwi Yulianti, Sulfiana selalu memberikan masukan dan motivasi untuk penulis. Doa terbaik yang selalu terucap hingga menjadi sebuah kenyataan, pemberi semangat yang tak segan menjadi penyemangat, Terima kasih untuk semua bantuan yang tersirat maupun yang tersurat.

Akhirnya penulis berharap semoga amal baik dari semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini mendapatkan balasan pahala dan rahmat Allah SWT. Kesempurnaan hanya milik Allah swt. Dan kekurangan milik penulis dalam penyusunan tesis ini. Semoga apa yang telah ditulis dalam tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Makassar, 26 Januari 2021



MUH DANIAL FAJRI

ABSTRAK

MUH DANIAL FAJRI. *Isolasi dan identifikasi molekular bakteri simbion bintang laut (Protoreaster nodosus) sebagai penghasil senyawa antibakteri* (Dibimbing oleh Sartini dan Subehan).

Salah satu pencarian senyawa antibakteri yang saat ini banyak dikembangkan adalah dengan memanfaatkan bakteri simbion dari bahan alam termasuk biota laut. Tahap awal penelitian ini dilakukan isolasi bakteri simbion dari bintang laut (*Protoreaster nodosus*) dengan metode agar cawan. Isolat murni selanjutnya diproses melalui fermentasi dengan metode *submerged fermentation* menggunakan media *Nutrient broth* yang ditambahkan dengan ekstrak yeast dan digojok menggunakan shaker selama 7 hari pada kecepatan 200 rpm untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder yang akan diuji aktivitas dengan metode difusi agar dan KLT-biautografi untuk melihat kemampuan antibakterinya dan dilakukan skrining fitokimia untuk melihat golongan senyawanya.

Hasil Penelitian diperoleh 4 isolat bakteri, dengan kode BS 1T, BS 2T, BS 3T dan BS 4T menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella thypi* NCTC 786 dan *Escherichia coli* ATCC 25923, dengan golongan senyawa hasil identifikasi skrining fitokimia menunjukkan steroid. Selanjutnya 4 isolat yang potensial dilakukan identifikasi secara molekuler menggunakan sampel DNA dari isolat bakteri simbion bintang laut. Sampel DNA tersebut diamplifikasi menggunakan metode PCR dan selanjutnya dielektroforesis dan disekuensing. Sekuens DNA isolat bakteri simbion bintang laut selanjutnya diproses menggunakan program BLAST (NCBI) dan dianalisis menggunakan program MEGA 7 dengan metode Maximum Likelihood. Berdasarkan karakteristik molekuler diperoleh hasil bahwa Isolat bakteri simbion bintang laut dengan kode BS 1T identik *Bacillus Sp*, isolat kode BS 2T identik *Bacillus amyloliquefaciens*, dan 2 isolat kode BS 3T dan BS 4T belum teridentifikasi dan termasuk kelompok gram negatif.

Kata Kunci : Bakteri Simbion, *Protoreaster nodosus*, Antibakteri, Analisis filogenetik.

ABSTRACT

MUH DANIAL FAJRI. *Isolation and molecular identification of starfish symbiont (Protoreaster nodosus) as a producer of antibacterial compound* (Supervised by Sartini and Subehan).

One of the search for antibacterial compounds that are currently being developed is the utilization of symbiont bacteria from natural materials including marine life. The initial stage of this research was to isolate symbiont bacteria from starfish (*Protoreaster nodosus*) using agar plate method. Pure isolates were then processed through fermentation with the submerged fermentation method using Nutrient broth media added with yeast extract and shaken for 7 days at 200 rpm to produce secondary metabolites which will be tested for activity by the agar diffusion method and TLC-biutography to see the ability antibacterial and phytochemical screening wass carried out to see the class of compounds.

The results oprived 4 bacterial isolate, with the codes BS 1T, BS 2T, BS 3T and BS 4T showing antibacterial activity against the test bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella thypi* NCTC 786 and *Escherichia coli* ATCC 25923, with the compound group Phytochemical screening identification results showed steroids. Furthermore, 4 potential isolates were identified molecularly using DNA samples from sea star symbiont bacteria isolates. The DNA samples were amplified using the PCR method and then electrophoresed and sequenced. DNA sequences of starfish symbiont bacteria isolates were then processed using the BLAST program (NCBI) and analyzed using the MEGA 7 program with the Maximum Likelihood method. Based on the molecular characteristics, the results showed that the starfish symbiont bacteria isolate with the code BS 1T *Bacillus Sp*, the BS 2T isolate code *Bacillus amyloliquefaciens*, and 2 isolate coded BS 3T and BS 4T had not been identified and were gram-negative.

Keywords: Symbiont bacteria, *Protoreaster nodosus*, antibacterial, phylogenetic analysis.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	Xv
DAFTAR LAMPIRAN	Xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Bintang Laut Jenis <i>Protoreaster nodosus</i>	4
B. Uraian Bahan	5
1. Uraian umum	5
2. Manfaat bakteri simbion	6

C. Metode Fermentasi	7
D. Metabolit Sekunder	11
BAB III METODE PENELITIAN	21
A. Rancangan Penelitian	21
B. Lokasi dan Waktu Penelitian	21
C. Bahan dan Alat Penelitian	21
D. Prosedur Penelitian	22
1. Sterilisasi alat dan bahan	22
2. Isolasi bakteri	22
3. Produksi metabolit sekunder	23
4. Uji aktifitas secara difusi agar	24
5. Uji aktifitas secara difusi KLT-Biautografi	25
6. Identifikasi komponen kimia	25
7. Karakterisasi mikroba simbion	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	42
A. Isolat bakteri simbion bintang laut	31
B. Pemurnian isolat bakteri simbion bintang laut	32
C. Uji skrining aktifitas antibakteri	33
D. Hasil fermentasi dan ekstraksi isolat bakteri	35
E. Uji aktifitas antibakteri ekstrak etil asetat	36
F. Uji aktifitas antibakteri secara KLT-Biautografi	38
G. Identifikasi senyawa kimia ekstrak etil asetat	40
H. Identifikasi bakteri secara mikroskopik	41

I. Identifikasi molekular	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

nomor	halaman
1. Hasil isolasi bakteri simbion bintang laut	32
2. Deskriptif bentuk dan warna	33
3. Aktifitas antibakteri zona hambat hasil fermentasi	34
4. Diameter zona hambat aktifitas antibakteri	37
5. Hasil pewarnaan gram isolat bakteri	41
6. Analisis bioinformatika sekuen gen 16sRNA	43

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Kerangka teori	19
2. Kerangka konsep	20
3. Isolat bakteri simbion hasil pengenceran bintang laut	30
4. Hasil pemurnian isolat bakteri simbion bintang laut	32
5. Korelasi antara diameter zona hambat dan sampel uji	34
6. Hasil fermentasi dan ekstraksi isolat bakteri simbion	36
7. Hasil uji aktifitas anti bakteri	38
8. Hasil uji aktifitas anti bakteri ekstrak etil asetat	40
9. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia hasil fermentasi	41
10. Hasil pengecatan gram	43
11. Hasil elektroforesis	44
12. Phylogenetic tree	46
13. Sampel bintang laut	52
14. Hasil identifikasi sampel bintang laut	53
15. Hasil kromatogram DNA squencing Isolat bakteri BS 1T	54
16. Hasil kromatogram DNA squencing Isolat bakteri BS 2T	55
17. Hasil kromatogram DNA squencing Isolat bakteri BS 3T	56
18. Hasil kromatogram DNA squencing Isolat bakteri BS 4T	57
19. Data hasil BLAST isolat bakteri BS 2T	59
20. Data hasil BLAST isolat bakteri BS 3T	60

21. Data hasil BLAST isolat bakteri BS 4T	61
---	----

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	halaman
1. Skema kerja	51
2. Sampel penelitian	52
3. Hasil identifikasi bintang laut	53
3. Dokumentasi penelitian	51

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi masih menempati urutan teratas penyebab penyakit dan kematian di negara berkembang, termasuk Indonesia (WHO, 2019). Hal ini menyebabkan terjadinya kebutuhan senyawa kimia, antibiotika baru untuk mengobati penyakit tersebut. Mengingat 70 % permukaan bumi ditutupi oleh lautan, maka perlu adanya eksploitasi terhadap kekayaan laut sebagai pencarian senyawa antimikroba baru. Laut memiliki biodiversitas yang tinggi dan tentunya merupakan aset besar yang berpeluang untuk dimanfaatkan (Lariman, 2011).

Berbagai biota laut, antara lain: algae, sponges, starfish, diketahui memiliki kandungan bioaktif yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan bahan baku obat (Habbu *et al.*, 2016; Blunt *et al.*, 2018). Beberapa strain bintang laut diketahui memiliki aktivitas antimikroba. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bintang laut *Certonardoa semiregularis*, *Stellaster equestris*, *Astropecten indicus* *Protoreaster linckii* dan senyawa bioaktif *P.nonudus* mengandung sterol polihidroksilasi dan turunannya yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen (Chamundeeswari *et al.*, 2012; Thao *et al.*, 2015; Cockroft *et al.*, 2019; S *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mikroorganisme yang terkait dengan invertebrata laut dan alga laut memiliki aktivitas antimikroba. Mikroorganisme yang terkait dengan inangnya juga disebut mikroorganisme simbiosis. Mikroorganisme tersebut antara lain: bakteri, aktinomisetes, atau jamur. Salah satu bakteri yang terkait dengan spons adalah *Bacillus* sp (Thomas, 2010; Li, 2009; Santhi *et al.*, 2017; Ismail *et al.*, 2016). Penelitian Nakagawa *et al* (2017) menemukan adanya mikroba simbiosis dalam cairan selom dari 2 spesies bintang laut *Patiria pectinifera* dan *Asterias amurensis* yang teridentifikasi sebagai takson terkait *Helicobacter*.

Perbedaan lingkungan tempat hidupnya dapat mempengaruhi strain simbiosis mikroba yang ditemukan di inangnya. Berdasarkan latar belakang maka perlu dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi molekular bakteri simbiosis dari bintang laut *Protoreaster nodosus* diperoleh dari salah satu pesisir Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan, Indonesia Sebagai penghasil senyawa antibakteri.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang diatas maka permasalahan yang timbul adalah :

1. Apakah isolat bakteri simbion dari bintang laut (*Protoreaster nodosus*) mampu menghasilkan senyawa antibakteri dan bagaimana karakteristik molekulernya?
2. Apakah komponen senyawa kimia hasil fermentasi isolat bakteri simbion bintang laut (*Protoreaster nodosus*) yang memiliki aktivitas antibakteri?

C. Tujuan Penelitian

1. Memperoleh dan Mengetahui karakteristik molekuler isolat bakteri simbion bintang laut (*Protoreaster nodosus*) sebagai penghasil senyawa antibakteri.
2. Mengetahui komponen senyawa kimia hasil fermentasi isolat bakteri simbion bintang laut (*Protoreaster nodosus*) sebagai penghasil senyawa antibakteri.

D. Manfaat Penelitian

Menambah koleksi Isolat bakteri simbion dari bintang laut (*Protoreaster nodosus*) sebagai penghasil senyawa antibakteri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Bintang Laut Jenis *Protoreaster nodosus*

Adapun klasifikasi bintang laut menurut WORMS (World Register of Marine Species) 2019 berikut :

Kingdom : Animalia

Sub kingdom : Bilateria

Subphylum : Asterozoa

Phylum : Echinodermata

Class : Asteroidaea

Subclass : Asteroidaea

Ordo : Valvatida

Super ordo : Valvatacea

Family : Oriasteridae

Genus : *Protoreaster*

Spesies : *Protoreaster nodosus*

Bintang laut *Protoreaster nodosus* adalah salah satu bintang laut berukuran besar yang dapat ditemukan dalam jumlah yang besar di perairan dangkal Indo-pasifik (Moosleitner, 2004). Spesies tersebut diketahui memakan meiofauna, mikroorganisme dan makrofauna pasir,

serta memilih habitat berpasir seperti rataan pasir atau padang lamun (Bos *et al.*, 2008).

Bintang laut (*Protoreaster nodosus*) merupakan salah satu spesies dari kelas Asteroidea, merupakan kelompok Echinodermata. Umumnya Echinodermata berukuran besar, yang terkecil berdiameter 1 cm. Bintang laut mempunyai bentuk seperti bintang pentamerous, kebanyakan spesies mempunyai 5 buah tangan. Beberapa spesies mempunyai tangan kelipatan 5. Diameter rata-rata antara 10-20 cm, terkecil 1 cm, dan terbesar 100 cm. Mulut terletak di pusat pisin (*central disk*). Seluruh permukaan pisin pusat dan tangan bagian bawah disebut oral, sedangkan bagian bawah disebut aboral. Dari mulut sampai ujung tangan terdapat lekukan memanjang. Pada tiap lekukan terdapat 2-4 deret kaki tabung. Tepi lekukan terdapat duri-duri yang dapat digerakkan untuk melindungi kaki tabung. Pada tiap ujung tangan terdapat tentakel dengan bintik pigmen merah. Anus terdapat di tengah pisin aboral, dimana juga terdapat madreporit (Suwignyo *et al.*, 2005).

B. Bakteri Simbion

1. Uraian Umum

Bakteri simbion dapat bertahan hidup pada lingkungan yang kaya nutrisi dapat bersembunyi dari sel predator. Sebaiknya sel-sel inang pencari makan mendapatkan keuntungan energi dan respirasi oksidatif melebihi sel fermentasi. Keuntungan-keuntungan komplementer tersebut

kemudian berevolusi menjadi sebuah hubungan simbiosis (hidup bersama) sampai ke suatu titik dimana salah satu entitas tidak dapat hidup tanpa entitas lainnya. Proses penggabungan sel inang dan endosimbion-endosimbionnya tersebut diduga telah memunculkan mitokondria pada sel-sel eukariotik modern 1,5 miliar tahun lalu (Stansfield, *et al.*,2003).

Simbion juga dapat mensuplai kebutuhan vitamin inangnya. Disamping peranan dalam mensuplai nutrisi, mempunyai peran yang bersifat genomik seperti halnya mitokondria atau kloro (Ishikawa, 1989).

2. Manfaat bakteri Simbion

Bakteri Simbion dapat diartikan sebagai spesies yang hidup berkoloni dalam jaringan internal maupun eksternal makhluk hidup tanpa menyebabkan efek yang merugikan secara langsung pada organisme tersebut. Organisme simbion memiliki potensi yang sangat besar untuk dieksploitasi dan menghasilkan produk alami baru yang bermanfaat di bidang kedokteran, pertanian, dan industry. Memiliki potensi yang sangat besar untuk dieksploitasi dan menghasilkan produk alami baru yang bermanfaat di bidang kedokteran, pertanian, dan industri. Diketahui setiap organisme multiseluler di alam yang tersebar di bumi kita, masing-masing individu tersebut merupakan inang dari satu atau lebih mikroba simbion (Strobel *et al.*,2004).

Keanekaragaman hayati di dalam suatu biosfer menggambarkan keragaman kandungan bahan kimia di dalamnya. Simbion yang hidup dalam hewan memiliki fungsi untuk mempertahankan eksistensi dari inang

untuk dapat bertahan hidup dan mempertahankan diri dari organisme patogen dan predator utama mereka. Hal ini membuat organisme simbion berevolusi secara konstan untuk menghasilkan senyawa-senyawa kimia baru untuk melindungi inang mereka. Daerah tropis termasuk di dalamnya ekosistem pantai dan terumbu merupakan contoh luar biasa dari jenis lingkungan ini. Dalam ekosistem di daerah ini, perlawanan mikroba simbion melawan patogen dan predasi cukup tinggi, sumber daya yang terbatas dan tekanan seleksi alam sangat tinggi (Strobel *et al.*, 2004). Hal ini menimbulkan kemungkinan besar bahwa endosimbion di daerah tropis seperti di negara kita merupakan sumber struktur senyawa baru dengan aktivitas biologis yang menarik (Bara *et al.*, 2013; Kartika *et al.*, 2014; Liwang *et al.*, 2014; Phoanda *et al.*, 2014; Posangi *et al.*, 2014; Dwilestari *et al.*, 2015; Faraknimella *et al.*, 2015; Kasi *et al.*, 2015; Menggelea *et al.*, 2015; Santoso *et al.*, 2015).

B. Metode Fermentasi

Beberapa ahli mendefinisikan kata fermentasi dengan pengertian yang berbeda. Fardiaz (1992) mendefinisikan fermentasi sebagai proses pemecahan karbohidrat dan asam amino secara anerobik, yaitu tanpa memerlukan oksigen. Senyawa yang dapat dipecah dalam proses fermentasi terutama karbohidrat, sedangkan asam amino hanya dapat difermentasi oleh beberapa jenis bakteri tertentu. Satiawihardja (1992) mendefinisikan fermentasi dengan suatu proses dimana

komponen-komponen kimiawi dihasilkan sebagai akibat adanya pertumbuhan maupun metabolisme mikroba. Pengertian ini mencakup fermentasi aerob dan anaerob. Fermentasi dapat meningkatkan nilai gizi bahan yang berkualitas rendah serta berfungsi dalam pengawetan bahan dan merupakan suatu cara untuk menghilangkan zat antinutrisi atau racun yang terkandung dalam suatu bahan makanan.

Fermentasi secara umum dibagi menjadi 2 model utama yaitu fermentasi media cair (liquid state fermentation, LSF) dan fermentasi media padat (solid state fermentation, SSF). Fermentasi media cair diartikan sebagai fermentasi yang melibatkan air sebagai fase kontinue dari sistem pertumbuhan sel bersangkutan (Satiawiharja, 1992) atau substrat baik sumber karbon maupun mineral terlarut atau tersuspensi sebagai partikel-partikel dalam fase cair.

Fermentasi media padat merupakan proses fermentasi yang berlangsung dalam substrak tidak terlarut, namun mengandung air yang cukup sekalipun tidak mengalir bebas (Dharma, 1992). Dalam fermentasi tradisional baik fermentasi medium cair maupun medium padat telah lama dikenal. Fermentasi cair meliputi fermentasi minuman anggur dan alkohol, fermentasi asam cuka, yogurt dan kefir. Fermentasi media padat seperti fermentasi tape, oncom, kecap, tape dan silase.

1. Fermentasi Media Cair Komponen tambahan yang diperlukan pada pakan generasi baru seringkali disintesa secara terpisah dan ditambahkan kemudian. Cara yang digunakan biasanya dengan cara

fermentasi media cair, yang dapat mensintesa asam-asam amino, asam-asam organik, enzim-enzim dan beberapa vitamin. Fermentasi cair dengan teknik tradisional tidak dilakukan pengadukan, berbeda dengan teknik fermentasi cair modern melibatkan fermentor yang dilengkapi dengan: pengaduk agar medium tetap homogen, aerasi, pengatur suhu (pendingin dan pemanasan) dan pengaturan pH. Proses fermentasi cair modern dapat dikontrol lebih baik dan hasil lebih uniform dan dapat diprediksi. Juga tidak dilakukan sterilisasi, namun pemanasan, perebusan dan pengukusan mematikan banyak mikroba kompetitor. Jenis-jenis fermentasi media cair yang dapat dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Fermentasi yang diagitasi dimana substratnya larut dalam air.

Jenis fermentasi ini dikerjakan dalam suatu labu atau gelas yang cocok atau yang lebih modern dengan menggunakan fermentor dimana substratnya larut sempurna dalam air. Pengambilan substrat oleh mikroba melalui fase larutan dalam air. Pada kultur labu yang dikocok, agitasi dilakukan dengan bantuan alat pengocok (shaker). Pada fermentor agitasi dikerjakan dengan pengaduk yang dijalankan oleh motor dan dapat dibantu aerasi (gelembung udara)

- b. Fermentasi yang diagitasi dimana zat yang tak larut dalam air tersuspensi dalam fase cair.

Pada fermentasi ini substrat zat padat tidak larut dalam air tetapi dalam bentuk bubuk-bubuk halus yang tersuspensi dalam sejumlah air yang banyak. Garam dan zat-zat hara lain mungkin terlarut dalam air.

Konsentrasi substrat dalam media dapat bervariasi mulai dari satu persen sampai pada suatu keadaan yang menyerupai bubur. Pengambilan substrat oleh mikroba biasanya disertai dengan produksi suatu faktor yang dapat melarutkan yang mungkin sifatnya ekstraseluler atau terletak didalam dinding dalam air sehingga partikel substrat tersipresi secara merata dalam medium yang mengandung air dengan mikroba secara maksimum.

c. Fermentasi yang diagitasi dimana zat cair yang tak larut dalam air tersuspensi dalam fase cair. Jenis fermentasi ini dan mekanisme pengambilan substrat dengan substrat bersifat cair. yang kedua kecuali substrak bersifat cair

d. Fermentasi yang tidak diagitasi dimana substratnya larut dalam fase air. Pada fermentasi ini substrat larut dalam air tetapi medianya tidak diagitasi atau dikocok. Pengambilan substrat melalui fase cair. Medium didistribusikan berupa larutan yang dangkal dalam suatu baki atau dalam suatu wadah yang mempunyai permukaan yang luas dan dalamnya media biasanya 2.5-5.0 cm untuk produksi yang tinggi.

Faktor yang mempengaruhi fermentasi media padat diantaranya:

1. Kadar air Kadar optimum tergantung pada substrat, organisme dan tipe produk akhir. Kisaran kadar air yang optimal adalah 50-75. Kadar air yang tinggi akan mengakibatkan penurunan porositas, pertukaran gas, difusi oksigen, volume gas, kontaminasi dengan bakteri

2. Temperatur tetapi meningkatkan resiko Temperatur berpengaruh pada laju reaksi biokimia selama proses fermentasi.
3. Pertukaran gas Pertukaran gas antara fase gas dengan substrat padat mempengaruhi proses fermentasi.

C. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis oleh suatu mikroba, tidak untuk memenuhi kebutuhan primernya melainkan untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan lingkungannya. Metabolisme sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme endofit merupakan senyawa antibiotik yang mampu melindungi tanaman dari seranga insekta, mikroba pathogen atau hewan pemangsanya, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen biotkontrol. Radji (2005), menyebutkan bahwa berbagai metabolit sekunder yang diproduksi oleh fungi endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta telah dielusidasi struktur molekulnya.

Beberapa Obat asal mikroba seperti Penisilin antibiotik dari *Penicillium* sp., siklosporin immunosupresan dari *Tolypocladium inflatum* dan *Cylindrocarpon lucidum*, agen antijamur *griseofulvin* dari Jamur *Penicillium griseofulvum*, penghambat biosintesis kolesterol lovastatin dari jamur *Aspergillus terreus*, dan B-laktam Antibiotik dari berbagai taksa jamur, telah bergeser fokus penemuan obat dari tanaman ke mikroorganisme.

D. Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reacton (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan diketemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekular. (Handoyo, et ,al. 2001).

Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya (Yusuf, 2010) :

1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP); metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derifat dari perbedaan DNA.
2. Inverse-PCR, metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yangdiketahui. Template didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi "sekuen antara" dari beragam gen.

3. Nested-PCR, proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut primer inner disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai outer primer. Pada prakteknya, reaksi pertama dari PCR menggunakan outer primer, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan inner primer atau nested primer menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. Nested primer akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama.
4. Quantitative-PCR; digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas, dimulai dari jumlah DNA, cDNA, atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel Reverse Transcriptase (RT-PCR); metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh reverse transcriptase (mengubah RNA menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan.

5. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini dikembangkan oleh Welsh and Mc Clelland (1990) dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer – primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom.

Untuk melakukan proses PCR diperlukan komponen-komponen seperti yang telah disebutkan di atas. Pada bagian ini akan dijelaskan secara rinci kegunaan dari masing-masing komponen tersebut. (Handoyo, et.al.2001).

1. Templat DNA

Fungsi DNA templat di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. Penyiapan DNA templat untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA templat tergantung dari tujuan eksperimen.

Pembuatan DNA templat dengan menggunakan metode lisis dapat digunakan secara umum, dan metode ini merupakan cara yang cepat dan

sederhana untuk pendedahan DNA kromosom ataupun DNA plasmid. Prinsip metode lisis adalah merusak dinding sel tanpa harus merusak DNA yang diinginkan. Oleh karena itu kerusakan dinding sel umumnya dilakukan dengan cara memecahkan dinding sel menggunakan buffer lisis. Komposisi buffer lisis yang digunakan tergantung dari jenis sampel.

Beberapa contoh buffer lisis yang biasa digunakan mempunyai komposisi sebagai berikut: 5 mM Tris-Cl pH8,5; 0,1 mM EDTA pH 8,5; 0,5 % Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Buffer lisis ini umumnya digunakan untuk jenis sampel yang berasal dari biakan, sel-sel epitel dan sel akar rambut. Contoh lain dari buffer lisis adalah buffer lisis K yang mempunyai komposisi sebagai berikut: buffer PCR (50mM KCl, 10-20 mM Tris-Cl dan 2,5 mM MgCl₂); 0,5 % Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Buffer lisis K ini biasanya digunakan untuk melisis sampel yang berasal dari sel darah dan virus. Selain dengan cara lisis, penyiapan DNA templat dapat dilakukan dengan cara mengisolasi DNA kromosom ataupun DNA plasmid menurut metode standar yang tergantung dari jenis sampel asal DNA tersebut diisolasi.

Metode isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid memerlukan tahapan yang lebih kompleks dibandingkan dengan penyiapan DNA dengan menggunakan metode lisis. Prinsip isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid adalah pemecahan dinding sel, yang diikuti dengan

pemisahan DNA kromosom / DNA plasmid dari komponen-komponen lain. Dengan demikian akan diperoleh kualitas DNA yang lebih baik dan murni.

2. Primer

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

Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari database GenBank. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat.

Sintesis dan pengadaan DNA dengan PCR ini berlangsung di luar sel organisme, tepatnya dalam suatu "mesin PCR". Pada dasarnya prinsip yang terjadi dalam sintesis DNA tersebut sama dengan proses replikasi DNA terjadi di dalam sel (*in vivo*). Dalam proses PCR, materi pokok berupa DNA utas ganda hasil isolasi dari suatu organisme, diantaranya direaksikan dengan : enzim DNA polymerase, deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), MgCl₂, dan primer (potongan pendek DNA utas tunggal, yang mengawali sintesis DNA). Setelah larutan mix PCR tersebut

homogen, larutan itu siap direaksikan dalam "mesin PCR". Dalam "mesin PCR", terjadi proses sintesis dan penggandaan DNA yang terdiri dari tiga tahap : Denaturation, Annealing dan Extension.

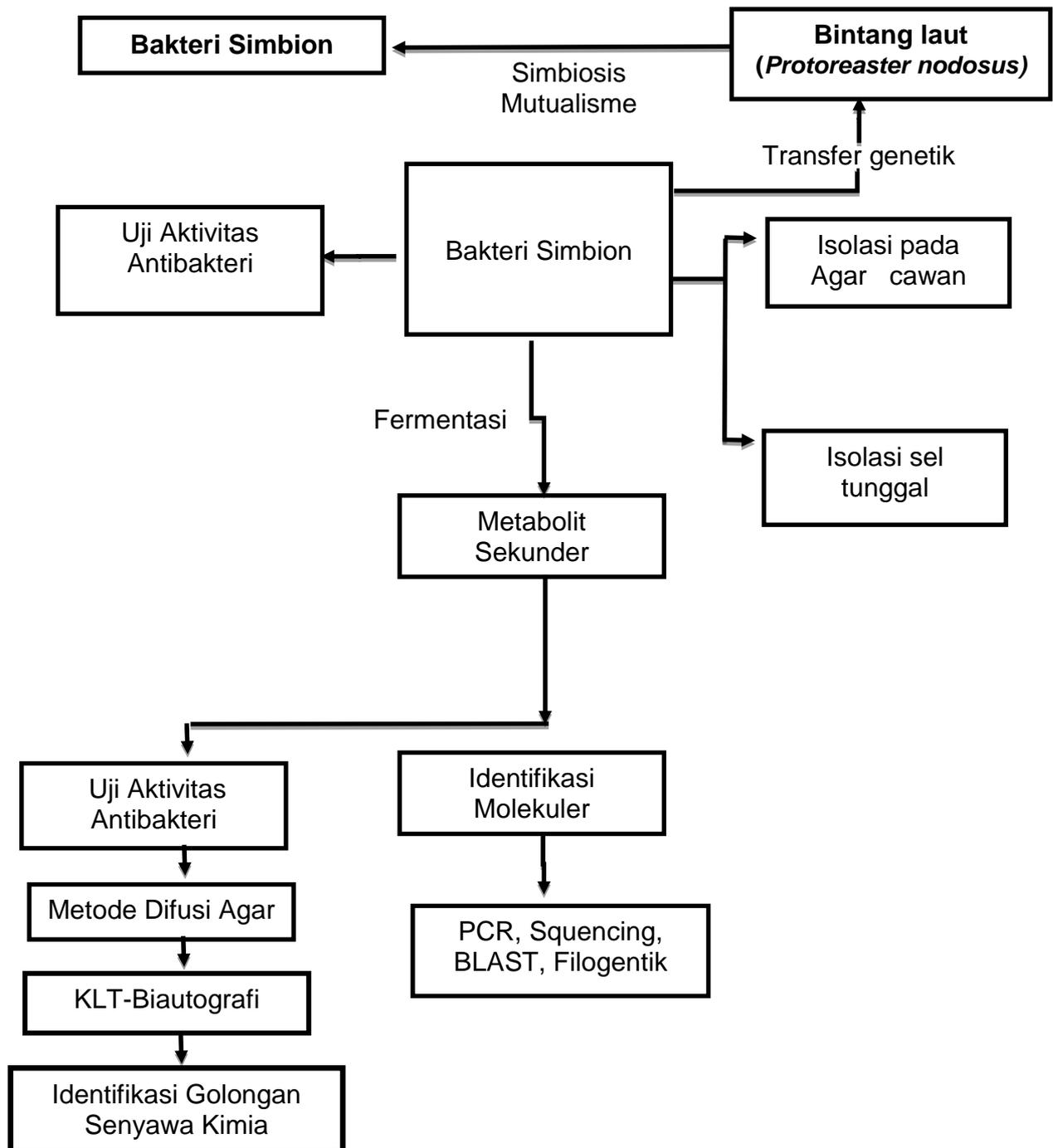
Rincian dari masing-masing tahap tersebut adalah sebagai berikut (Kusumawaty.2007) :

1. Pada tahap denaturation, reaksi PCR terjadi pada suhu tinggi ($\pm 94^{\circ}\text{C}$) sehingga DNA utas ganda terdenaturasi atau terpisah menjadi dua utas tunggal.
2. Tahap awal sintesis sekuen spesifik DNA secara in vitro dimulai pada tahap annealing, dimana primer akan menempel pada sekuen komplementer utas tunggal DNA cetakan (DNA template). Sintesis DNA ini berlangsung dari arah 5' ke 3'. Agar sintesis DNA dapat berlangsung dengan baik maka dalam reaksi tersebut diperlukan adanya enzim DNA polymerase, misalnya Taq Kursus Singkat Isolasi dan amplifikasi DNA polymerase dan MgCl_2 , sementara kebutuhan energi dan nukleotida terpenuhi dari dNTPs (terdiri dari : dTTP, dGTP, dATP dan dCTP). Reaksi sintesis DNA pada tahap ini tergantung pada suhu annealing dari primer yang digunakan. Suhu annealing primer tersebut ditentukan diantaranya dari ukuran panjang primer dan kandungan basa (G+C) dari primer yang digunakan. Misalnya primer yang terdiri dari 24-30 pasang basa, dapat bekerja dengan baik pada suhu annealing 60°C atau lebih.

3. Pada tahap extension, umumnya terjadi pada suhu 72°C , proses sintesis yang telah dimulai dari tempat penempelan primer, terus berlanjut sampai bertemu dengan sintesis DNA yang dilakukan oleh primer lainnya dengan arah yang berlawanan pada komplemen utas DNA template, sehingga terbentuklah DNA utas ganda yang baru. Sintesis DNA tersebut akan terus berlanjut melalui ketiga tahapan tersebut di atas secara berulang. Pada akhirnya maka akan diperoleh produk PCR, berupa sekuen DNA yang diinginkan dalam jumlah yang berlipat ganda, yakni sebanyak 2^n (n = banyaknya siklus PCR yang digunakan). Selanjutnya, produk PCR yang diperoleh dapat disimpan pada suhu 4°C , sampai saatnya tiba untuk dianalisis lebih lanjut. Untuk melihat hasil amplifikasi DNA tersebut, maka produk PCR yang diperoleh dimigrasikan pada gel agarose (elektroforesis). Umumnya, hasil amplifikasi DNA dengan PCR ini dipengaruhi beberapa faktor, yaitu : kualitas dan kuantitas DNA, temperatur annealing primer, kualitas dan konsentrasi primer, konsentrasi MgCl_2 , dNTP, enzim DNA polymerase, dan jumlah siklus PCR yang digunakan.

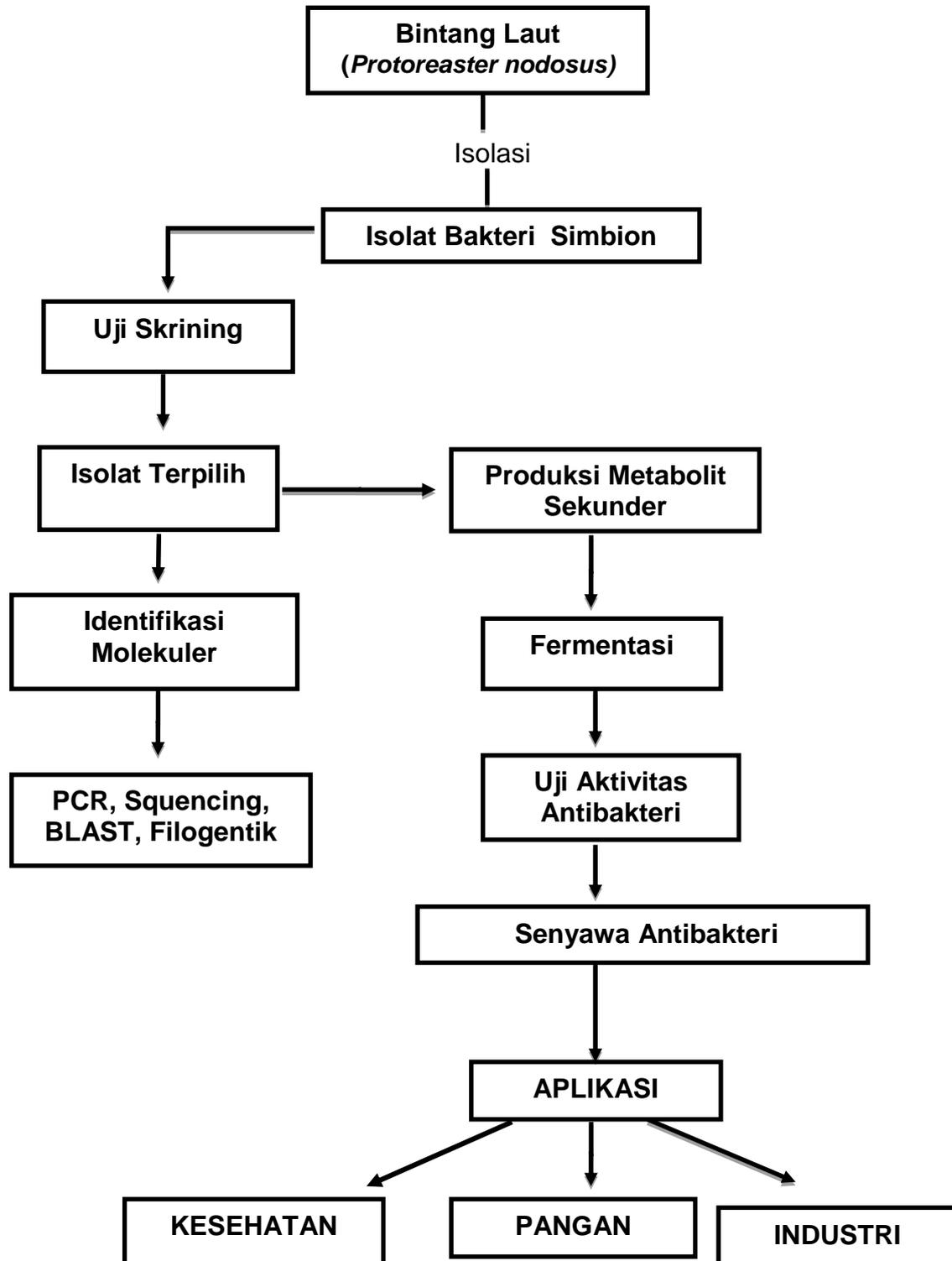
E. Kerangka Konsep

1. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

2. Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep