

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tempe

##### 2.1.1. Definisi Tempe

Tempe adalah salah satu produk fermentasi yang umumnya berbahan baku kedelai yang difermentasi dan mempunyai nilai gizi yang baik. Fermentasi pada pembuatan tempe terjadi karena aktivitas kapang *Rhizopus oligosporus*. Fermentasi pada tempe dapat menghilangkan bau langu dari kedelai yang disebabkan oleh aktivitas dari enzim lipoksigenase. Fermentasi kedelai menjadi tempe akan meningkatkan kandungan fosfor. Hal ini disebabkan oleh hasil kerja enzim fitase yang dihasilkan kapang *Rhizopus oligosporus* yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi inositol dan fosfat yang bebas. Jenis kapang yang terlibat dalam fermentasi tempe tidak memproduksi toksin, bahkan mampu melindungi tempe dari aflatoxin. Tempe mengandung senyawa antibakteri yang diproduksi oleh kapang tempe selama proses fermentasi (Cahyadi, 2007).

Menurut Dewi dan Aziz (2009), secara umum tempe berwarna putih, dikarenakan pertumbuhan miselia kapang yang merekatkan biji-biji kedelai sehingga terbentuk tekstur yang memadat. Tempe memiliki aroma yang khas dikarenakan adanya degradasi dari komponen-komponen dari kedelai itu sendiri.

##### 2.1.2. Sejarah Tempe

Sejarah

Awal (sebelum tahun 1875). Tempe mungkin berasal dari pulau Jawa setidaknya beberapa abad yang lalu. Pada saat itu orang-orang Jawa, tanpa

pelatihan formal di bidang mikrobiologi atau kimia berhasil mengembangkan sebuah makanan baru yang luar biasa dari proses fermentasi yang disebut tempe. Makanan ini bisa disebut ini produk pengganti daging, karena mereka memiliki banyak tekstur yang sama dengan daging, rasa, dan kandungan protein yang tinggi seperti makanan daging (Limando dkk., 2007).

Kata tempe diduga berasal dari bahasa Jawa kuno. Pada zaman Jawa kuno terdapat makanan berwarna putih terbuat dari tepung sagu yang disebut tumpi. Tempe segar yang juga berwarna putih terlihat memiliki kesamaan dengan makanan tumpi tersebut (Badan Standarisasi Nasional, 2012).

### 2.1.3. Jenis Tempe

#### 1. Tempe Kedelai

Tempe yang umum dikenal masyarakat Indonesia adalah tempe dari kacang kedelai berwarna kuning, bentuknya padat dan berwarna putih. Tempe kedelai memiliki struktur yang kompak, padat dan tertutup oleh miselium berwarna putih.



Gambar 1. Tempe Kedelai

Sumber : <http://penelitianterbaru.blogspot.com/2016/01/pengaruh-jenis-pembungkus-pada.html>

## 2. Tempe Koro

Tempe ini berasal dari daerah sekitar Waduk Kedung Ombo, dibuat dari biji koro benguk. Struktur dan warnanya seperti tempe kedelai, tempe koro sebenarnya mengandung senyawa alami asam sianida tetapi proses perendaman dan pencucian berulang kali membuat kandungan racunnya ini dapat hilang.



Gambar 2. Tempe koro

Sumber : <https://jelajahrasablog.wordpress.com/2016/09/27/tempe-benguk-anti-mainstream>.

## 3. Tempe Kacang Hijau

Tempe ini disebut juga “mungbean tempeh” dibuat dari kacang hijau, di Indonesia menempati urutan ke empat tempe yang dibuat dari legum. Terkenal di daerah Jawa Tengah dan Yogyakarta, Tempe kacang hijau ini memiliki tekstur yang khas.



Gambar 3. Tempe Kacang Hijau

Sumber : <https://cookpad.com/id/resep/3415511-homemade-tempe-kacang-ijo>

#### 4. Tempe Gembus

Tempe gembus dibuat dari ampas gude (kacang iris) pada pembuatan pati. Tempe ini populer di daerah Lombok dan Bali bagian timur, tempe ini memiliki tekstur yang lembut.



Gambar 4. Tempe Gembus

Sumber : [https://id.wikipedia.org/wiki/Tempe\\_gembus](https://id.wikipedia.org/wiki/Tempe_gembus)

#### 5. Tempe Kacang Merah

Istilah lain yang diberikan adalah “*Green bean tempeh*” dibuat dari kacang merah (buncis). Tempe ini banyak dikonsumsi di Indonesia, tetapi mendunia. Tempe ini juga memiliki kaya akan serat, kalsium, vitamin B dan zat besi.



Gambar 5. Tempe Kacang Merah

Sumber : <http://blogspot.com/2012/03/tempe-enak-sehat.html>

#### 1.2.4. Kandungan Gizi Tempe dan Manfaatnya

Tempe adalah makanan yang dibuat dari fermentasi terhadap biji kedelai atau beberapa bahan lain yang menggunakan beberapa jenis kapang *Rhizopus*, seperti *Rhizopus oligosporus*, *Rh. oryzae*, *Rh. Stolonifer* (kapang roti), atau *Rh. arrhizus*. Sediaan fermentasi ini secara umum dikenal sebagai "ragi tempe". Kapang yang tumbuh pada kedelai menghidrolisis senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana yang mudah dicerna oleh manusia. Tempe kaya akan serat pangan, kalsium, vitamin B dan zat besi. Berbagai macam kandungan dalam tempemempunyai nilai obat, seperti antibiotika untuk menyembuhkan infeksi dan antioksidan pencegahpenyakit degeneratif. Secara umum, tempe berwarna putih karena pertumbuhan miselia kapang yang merekatkan biji-biji kedelai sehingga terbentuk tekstur yang memadat. Degradasi komponen-komponen kedelai pada fermentasi membuat tempe memiliki rasa dan aroma khas (Yudana, 2003).

Tabel 2. Kandungan Zat Gizi Tempe

Zat Gizi	Satuan	Komposisi zat gizi 100 gram bddTempe
Energi	(kal)	201
Protein	(gram)	20,8
Lemak	(gram)	8,8
Karbohidrat	(gram)	12,7
Serat	(gram)	1,4
Abu	(gram)	1,6
Kalsium	(mg)	155
Fosfor	(mg)	326
Besi	(mg)	4
Karotin	(mkg)	34
Vitamin A	(SI)	50
Vitamin B	(mg)	0,17
Air	(g)	55,3
Bdd (berat yang dapat dimakan)	(%)	100

Sumber : Komposisi Zat Gizi Pangan Indonesia Depkes RI Dir. Gizi Masyarakat dan Puslitbang Gizi 1991.

Menurut Widianarko (2002), bahwa secara kuantitatif, nilai gizi tempe sedikit lebih rendah (Tabel 2). Namun, secara kualitatif nilai gizi tempe lebih tinggi karena tempe mempunyai nilai cerna yang lebih baik. Hal ini disebabkan kadar protein yang larut dalam air akan meningkat akibat aktivitas enzim Proteolitik. Secara spesifik, tempe memiliki kandungan gizi sebagai berikut :

a. Asam Lemak

Selama proses fermentasi tempe, terdapat tendensi adanya peningkatan derajat ketidak jenuhan terhadap lemak. Dengan demikian, asam lemak tidak jenuh majemuk (polyunsaturated fatty acids PUFA) meningkat jumlahnya. Dalam proses itu asam palmitat dan asam linoleat sedikit mengalami penurunan, sedangkan kenaikan terjadi pada asam oleat dan linolenat (asam linolenat tidak terdapat pada kedelai). Asam lemak tidak jenuh mempunyai efek penurunan terhadap kolesterol serum sehingga dapat menetralkan efek negatif sterol di dalam tubuh.

b. Vitamin

Dua kelompok vitamin terdapat pada tempe, yaitu larut air (vitamin B kompleks) dan larut lemak (vitamin A, B, E, dan K). Tempe merupakan sumber vitamin B yang sangat berpotensi. Jenis vitamin yang terkandung dalam tempe antara lain vitamin B1 (tiamin), B2 (riboflavin), asam pantotenat, asam nikotinat (niasin), vitamin B6 (piridoksin). Dan B12 (sianokobalamin). Vitamin B12 umumnya terdapat pada produk-produk hewan dan tidak dijumpai pada makanan nabati (sayuran buah-buahan, dan biji-bijian), namun tempe mengandung vitamin B12 sehingga tempe menjadi satu-satunya sumber vitamin yang berpotensi dari

bahan pangan nabati. Kenaikan kadar vitamin B12 paling mencolok pada pembuatan tempe, vitamin B12 aktivitasnya meningkat sampai 33kali selama fermentasi dari kedelai, riboflevin naik sekitar 8-47 kali, piridoksin 4-14 kali, niasin 2-5 kali, biotin 2-3 kali, asam folat 4-5 kali dan asam pantotenat 2 kali lipat. Vitamin ini tidak diproduksi oleh kapang tempe, tetapi oleh bakteri kontaminan seperti *Klebsiella pneumoniae* dan *Citrobacter freundii*. Kadar vitamin B12 dalam tempe berkisar antara 1,5 sampai 6,3 mikrogram per 100 g tempe kering. Jumlah ini telah dapat mencukupi kebutuhan vitamin B12 seseorang per hari.

#### c. Mineral

Tempe mengandung mineral makro dalam jumlah yang cukup. Jumlah mineral besi, tembaga dan berturut-turut 9,39; 2,87; dan 8,05 mg setiap 100 g tempe. Kapang tempe dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang meningkat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan teruainya asam fitat, mineral-mineral tertentu (seperti besi, kalsium, magnesium, dan zink) menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh.

#### d. Antioksidan

Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Seperti halnya vitamin C, E dan karotenoid, isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Dalam kedelai terhadap tiga jenis isoflavon yaitu daidzen, glisiein dan genisten. Pada tempe disamping ketiga jenis isoflavon tersebut juga terdapat antioksidan faktor II (6,7, 4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan isofon dalam kedelai .

antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coreyne bacterium*. Penuaan (aging) dapat dihambat bila dalam makanan yang dikonsumsi sehari-hari mengandung antioksidan yang cukup. Karena tempe merupakan sumber antioksidan yang baik konsumsinya dalam jumlah cukup secara teratur dapat mencegah terjadinya proses penuaan dini. Konsumsi harian kedelai antara 31-47 g diyakini mampu menekan kolesterol serum dan kolesterol LDL secara nyata. Kemampuan protein kedelai untuk menurunkan kolesterol tergantung kadar kolesterol awal seseorang. Namun, pada mereka yang kadar kolesterolnya sudah rendah (di bawah 250 mg/dl). Konsumsi protein kedelai hampir tidak ada pengaruhnya. Penurunan kadar kolesterol dilihat mencolok pada mereka yang kadar kolesterolnya berkisar antara 250-330 mg/dl. Pemberian protein kedelai mampu menurunkan kolesterol tersebut sebanyak 7,4 persen. Bahkan pada angka penurunannya bisa mencapai 19,6 persen hasil penelitian lain menunjukkan bahwa konsumsi tempe secara teratur dapat menurunkan kadar kolesterol total, kolesterol LDL, dan trigliserida darah. Selain itu tempe juga mengandung antioksidan yang dapat menghambat oksidasi kolesterol LDL darah manusia. Sehingga dapat menghambat infiltrasi lemak atau LDL teroksidasi, ke dalam jaringan pembuluh darah.

#### **1.2.5. Khasiat Tempe Untuk Kesehatan**

Menurut Sarwono (2002), tempe memiliki beberapa khasiat terhadap kelangsungan kesehatan tubuh, yaitu untuk menghindari diare akibat dari bakteri enteropatogenik, dapat melangsingkan tubuh karena dapat menghindari terjadinya

timbunan lemak dalam rongga perut, ginjal, dan dibawah kulit perut. Selain itu, tempe berpotensi untuk digunakan melawan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dan mencegah terjadinya penyakit degeneratif (aterosklerosis, jantung koroner, diabetes melitus, kanker, dan lain-lain). Selain itu, tempe juga mengandung zat penurun kolesterol darah, pencegah penyakit jantung, hipertensi, dan lain-lain.

#### **1.2.6. Syarat Mutu Tempe**

Badan Standardisasi Nasional (BSN) telah menerbitkan standar tempe, yakni: SNI 3144:2009, Tempe Kedelai. SNI ini merupakan revisi dari SNI 01-3144-1998, Tempe kedele. SNI 3144:2009 dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04.

Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 27 November 2008 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

SNI 3144:2009 menetapkan mengenai syarat mutu tempe kedelai. Sesuai dengan standar tersebut, syarat mutu tempe kedelai, dengan perincian sebagai berikut:

Tabel 3. Syarat Mutu Tempe

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1.	Keadaan		
	1.1 Bau	-	Normal, khas
	1.2 Warna	-	Normal
	1.3 Rasa	-	Normal
2.	Kadar air (b/b)	%	Maks. 65
3.	Kadar abu (b/b)	%	Maks. 1,6
4.	Kadar lemak (b/b)	%	Min. 10
5.	Kadar protein (N x 6,25) (b/b)	%	Min. 16
6.	Kadar serat kasar (b/b)		Maks. 2,5
7.	Cemaran logam		
	7.1 Kadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,2
	7.2 Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 0,25
	7.3 Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40
	7.4 Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03
8.	Cemaran arsen (As)	mg/kg	Maks 0,25
9.	Cemaran mikroba		
	9.1 Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	Maks. 10
	9.2 <i>Salmonella sp.</i>	-	Negatif

(Sumber: Badan Standardisasi nasional, 2012).

## 2.2. Bakteri

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme penghasil enzim yang paling banyak digunakan sebagai sumber enzim. Bakteri lebih dianggap menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang relatif murah dan mampu menghasilkan enzim (Akhdia, 2003).

Menurut Waluyo (2004) bakteri dikelompokkan atas tiga golongan berdasarkan daerah aktivitas temperatur yaitu bakteri psikrofil, bakteri mesofil dan bakteri termofilik. Bakteri termofilik adalah bakteri yang dapat tumbuh pada temperatur tinggi sekitar 40-80°C (Waluyo, 2004). Keanekaragaman bakteri termofilik memberikan gambaran potensi yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Pada saat ini bakteri termofilik dipelajari dan diteliti secara

intensif karena alasan pengembangan penelitian dasar dan aplikasi bioteknologi. Salah satu enzim yang dapat dihasilkan oleh bakteri termofilik yaitu protease.

Bakteri proteolitik adalah sekelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk memecah protein, dengan memutus ikatan peptida pada protein tersebut. Selain melalui kemampuan tersebut, bakteri proteolitik juga mempunyai kemampuan membusukkan bahan yang mengandung protein tinggi (bersifat putrefaktif). Proses pembusukan tersebut menghasilkan senyawa hidrogen dan sulfida yang berbau busuk, serta asam amino sebagai putrefaktif protein (Kuswanto dan Sudarmadji, 1989).

Bakteri proteolitik terdiri atas banyak jenis misalnya *E.Coli*, *Klebsiella* dan *Pseudomonas*. Kelompok bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim protease. Secara umum enzim protease dibedakan menjadi dua kelompok yaitu proteinase (mengkatalis hidrolisis molekul protein menjadi peptida) dan peptidase (menghidrolisis fragmen peptida menjadi asam amino) (Suhartono, 1991).

### **2.3. Enzim Protease**

Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein. Enzim ini akan mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan air pada ikatan spesifik substrat. Enzim ini termasuk dalam kelas utama enzim golongan hidrolase. Protease ialah enzim yang sangat bervariasi. Protease dapat dihasilkan secara ekstrasel dan intrasel, protease mempunyai peranan penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel. Protease merupakan enzim industri yang penting. Enzim ini digunakan terutama dalam industri

detergen, farmasi, kulit, makanan, dan pengolahan limbah. Protease-protease diproduksi secara komersial dari bakteri dan jamur (Rao dkk., 2007).

Protease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada molekul protein yang menghasilkan peptida atau asam amino. Protein terdiri atas molekul asam amino yang bervariasi jumlahnya, berkisar antara 10 sampai ribuan yang berfungsi sebagai unit penyusun polimer protein yang terangkai melalui ikatan peptida. Protein yang memiliki lebih dari 10 asam amino disebut polipeptida, sedangkan istilah protein ditujukan bagi polimer asam amino dengan jumlah di atas 100 (Suhartono, 1989).

Protease berperan dalam sejumlah reaksi biokimia seluler. Selain diperlukan untuk degradasi protein nutrisi, enzim protease terlibat dalam sejumlah mekanisme patogenisitas, proses koagulasi darah, proses sporulasi, diferensiasi, sejumlah proses pasca translasi protein dan mekanisme ekspresi protein ekstraseluler (Rao dkk., 1998).

### 2.3.1. Klasifikasi Enzim Protease

Klasifikasi enzim Menurut Martoharsono (1993) enzim dapat diklasifikasi menjadi 6 kelas berdasarkan fungsinya dan tiap kelas mempunyai beberapa subkelas berdasarkan IUPAC:

- a. Oksidoreduktase, dibagi menjadi 5 sub-golongan mengkatalisis substrat yang bergugus fungsional;  $>\text{CHOH}$ ,  $>\text{C}=\text{O}$ ,  $>\text{C}=\text{CH}-$ ,  $>\text{CH}-\text{NH}_2$ ,  $>\text{CH}-\text{NH}-$ .
- b. Transferase, enzim yang memindahkan gugus berkarbon 1, aldehidik/ketonik, asil, fosfat dan gugus yang mengandung S.

- c. Hidrolase, enzim yang berkerja menghidrolisis substrat yang dibagi menjadi enzim yang menghidrolisis senyawa; ester, glikosidik, peptida, lain-lain ikatan C-N dan anhidrida.
- d. Liase, dibagi menjadi 3 sub-golongan mengkatalisis reaksi addisi terhadap ikatan;  $>C=C<$ ,  $C=O$ ,  $C=N-$ .
- e. Isomerase adalah enzim yang mengkatalisis semua reaksi isomer dan resemase.
- f. Ligase yang mengkatalisis pembentukan ikatan karbon-oksigen, karbon-sulfur, karbon-nitrogen dan karbon-atom lainnya. Energi yang diperlukan untuk pembentukan ikatan diperoleh dari hidrolisis ATP.

## **2.4. Identifikasi Bakteri**

### **2.4.1. Identifikasi Morfologi**

Morfologi bakteri dapat dibedakan menjadi dua yaitu, morfologi makroskopik dan mikroskopik. Secara makroskopik dilakukan pengamatan karakteristik koloni berdasarkan pada plate agar (bentuk koloni, ukuran, elevasi, warna, permukaan, dan konsistensi). Sedangkan secara mikroskopik dilakukan pengamatan struktur sel bakteri.

### **2.4.2. Uji biokimia**

Uji biokimia merupakan salah satu uji yang digunakan untuk menentukan spesies bakteri melalui sifat-sifat fisiologinya. Uji biokimia yang biasanya digunakan dalam kegiatan identifikasi bakteri yaitu uji MR-VP, uji gula-gula, uji SIM, uji TSIA, uji Indol, dan uji Simmons citrate.

Uji biokimia yakni untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi dari suatu biakan isolat murni melalui sifat-sifat fisiologi yaitu dengan melakukan uji katalase, uji fermentasi glukos, uji fermentasi maltosa, uji fermentasi laktosa, uji hidrolisa glatin uji hidrolis amilum, uji CO<sub>2</sub>, uji sitrat, dan uji moilitas.

#### **2.4.3. Identifikasi Molekuler Menggunakan 16S rRNA**

Salah satu bentuk pendekatan analisis molekuler adalah menggunakan pembandingan sekuen RNA khususnya ribosom termasuk dengan menggunakan komponen gen 16S (Malikdkk., 2007). Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Diantara ketiganya 16S paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler. Molekul 5S rRNA memiliki struktur urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis. 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler yang dikenal dengan sebutan *ribotyping* atau *riboprinting*. Identifikasi tersebut didasarkan pada tingkat kesamaan dalam sekuens DNA ribosomal 16S sebagai sidik jari genetik bakteri atau disebut sebagai sekuens sidikjari (Madigan dkk., 2000).

Molekul 16S rRNA ini bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul ini juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang urutan basanya konservatif dan beberapa urutan basanya variatif (Pangastuti, 2006). Hal ini salah satunya didukung oleh telah tersedianya *database* dari 16S rRNA yang dapat dipakai sebagai

pembandingan sekuen 16S rRNA bakteri lain untuk melihat hubungan kekerabatan genetik. Teknik ini berkembang setelah diciptakannya mesin DNA *sequencer*. Secara teknis metode ini melibatkan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk amplifikasi sekuen rRNA dari strain bakteri. Hasil amplifikasi ini kemudian disekuensing untuk mendapatkan informasi sekuen basa nitrogen. Sekuen basa nitrogen kemudian dibandingkan dengan sekuen bakteri lain (Vaughan dkk., 1999).

Sekuensing DNA ribosomal 16S dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu sekuensing secara langsung dan sekuensing dengan bantuan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode yang lebih baru, yaitu dengan teknik PCR, merupakan metode terpilih karena teknik PCR membutuhkan lebih sedikit bahan, lebih cepat, dan lebih praktis dilakukan untuk penelitian dari pada sekuensing DNA ribosomal secara langsung. Teknik PCR digunakan untuk mengamplifikasi DNA ribosomal 16S menggunakan primer komplemen yang diproduksi secara sintetik. Kemudian DNA hasil amplifikasi dengan PCR tersebut disekuensing dengan bantuan mesin sequencer dan pita yang terbentuk dideteksi oleh detektor dan dianalisis langsung oleh komputer (Madigan dkk., 2000).

### **2.5. *polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Menurut US FDA (2001), terhadap beberapa tahapan dalam mendeteksi bakteri patogen yaitu pra pengkayaan, pengkayaan, isolasi, identifikasi dan konfirmasi baik secara serologi ataupun dengan metode molekular. Selama beberapa tahun terakhir telah berkembang sejumlah metode baru dalam identifikasi mikroba patogen pada produk pangan. Salah satu metode yang dapat

digunakan untuk mendeteksi gen yaitu dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR adalah suatu reaksi untuk mengandakan jumlah molekul *Deoxyribo nucleat Acid* (DNA) pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam satu *thermocycler* (Campbell, 2004).

Kegunaan dari metode PCR didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifisitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA *polymerase* mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk (Mahardika 2005). Teknik ini menggunakan sepasang primer yang merupakan oligonukleotida yang berperan untuk mengawali proses amplifikasi molekul DNA. Keberadaan primer PCR tersebut menyebabkan gen target akan teramplifikasi sepanjang reaksi PCR berlangsung. Analisis PCR dengan primer spesifik merupakan langkah terbaik untuk kepentingan deteksi bakteri patogen karena dapat menghasilkan penentuan secara cepat keberadaan gen target, cukup sensitif dan mudah digunakan dalam kegiatan rutin (Aris, 2011).

Menurut Yuwono (2006) terdapat empat komponen utama pada PCR meliputi DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, Dioksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, DNTP, dan enzim DNA polimerase yaitu suatu enzim yang melakukan katalis reaksi

sintesis rantai DNA dan komponen lain yang juga penting adalah senyawa *buffer* PCR, magnesium klorida ( $MgCl_2$ ). Teknik PCR dapat mengeksploitasi berbagai sifat alami replikasi DNA. Dalam proses tersebut, *Polymerase-DNA* menggunakan DNA untai tunggal sebagai cetakan (*template*) untuk mensintesis untai baru yang komplementer. Cetakan untai tunggal dapat diperoleh melalui pemanasan DNA untai ganda pada temperatur mendekati titik didih. *Polimerase-DNA* juga memerlukan suatu wilayah untai ganda pendek untuk memulai (*primer*) proses sintesis. Pada saat PCR, posisi awal dan akhir sintesis DNA dapat ditentukan dengan menyediakan suatu oligonukleotida sebagai primer yang menempel secara komplementer pada cetakan sesuai dengan keinginan peneliti. Salah satu keunggulan PCR adalah *polymerase DNA* dapat diarahkan untuk sintesis wilayah DNA tertentu (Mahardika, 2005).

Menurut Mulandno (2002), terdapat 3 tahap teknik PCR meliputi :

a. Tahap Denaturasi

Pada tahap ini, *double-stranded DNA* (dsDNA) didenaturasi menjadi *single-stranded DNA* (ssDNA). Faktor utama yang mempengaruhi tahap ini adalah *melting temperature* atau temperatur yang diperlukan dari untai *doublehelix* DNA untuk dapat terdenaturasi menjadi ssDNA. Temperatur yang diperlukan ditentukan berdasarkan komponen nukleotida terutama komponen GC memiliki ikatan hidrogen yang lebih kuat sehingga memerlukan energi yang lebih besar untuk terdisosiasi dibandingkan ikatan hidrogen pada temperatur  $94^{\circ}C$  selama 6 sampai 8 menit (Barlett dkk., 2003).

b. Tahap *Annealing*

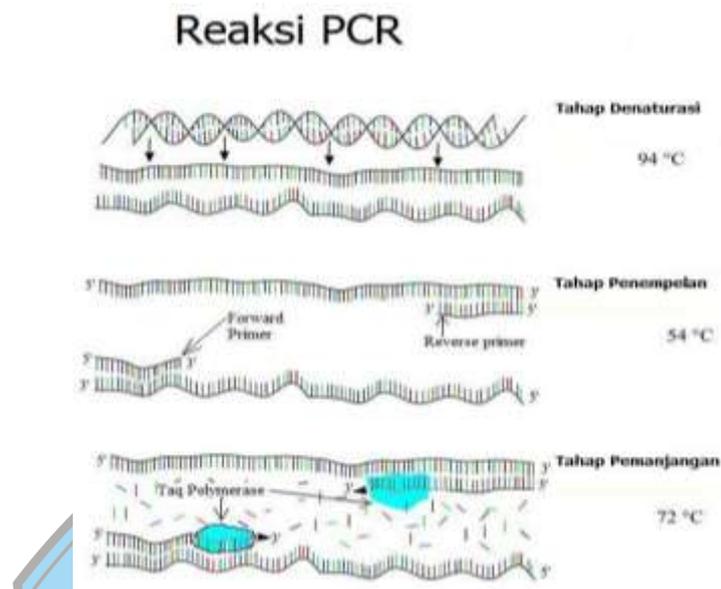
Pada tahap ini, DNA yang telah terdenaturasi menjadi ssDNA akan mengalami proses annealing yaitu primer oligonukleotida akan menempel pada sekuen target secara spesifik. Temperatur yang digunakan pada tahap ini ditentukan melalui optimasi. Tahap annealing berlangsung selama 1 sampai 2 menit (Barlett dkk., 2003).

c. Tahap Ekstensi

Setelah primer menempel pada sekuen target, maka menjadi pemanjangan (polimerase) utai DNA komplementer sehingga dihasilkan salinan sekuen DNA target atau yang disebut dengan ampikon. Proses polimerase tersebut merupakan tahapan ekstensi. Tahapan ini ditentukan oleh dua faktor utama yaitu temperatur dan panjang ekstensi.

Faktor temperatur berkaitan dengan aktifitas optimum DNA polimerase dan panjang ekstensi ditentukan berdasarkan aktifitas DNA polimerase dan panjang sekuen target. Secara umum, tahap ekstensi dilakukan pada temperatur 72°C dengan waktu 1 menit per kilo pasang basa (kbp) nukleotida. Waktu ekstensi bersifat spesifik untuk tiap reaksi dan ditentukan melalui optimasi, sehingga dengan adanya pengulangan siklus PCR maka jumlah ampikon yang akan dihasilkan dari satu molekul DNA target dinyatakan dengan  $2^x$  yang mana x menyatakan jumlah siklus PCR yang dilakukan. Reaksi-reaksi tersebut diatas diulangi lagi dari 25 sampai 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda baru yang merupakan hasil polimerase dalam jumlah jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA

cetakan yang digunakan (Barlett dkk., 2003). Tahapan dalam teknik PCR dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6. Tahapan dalam Teknik PCR**

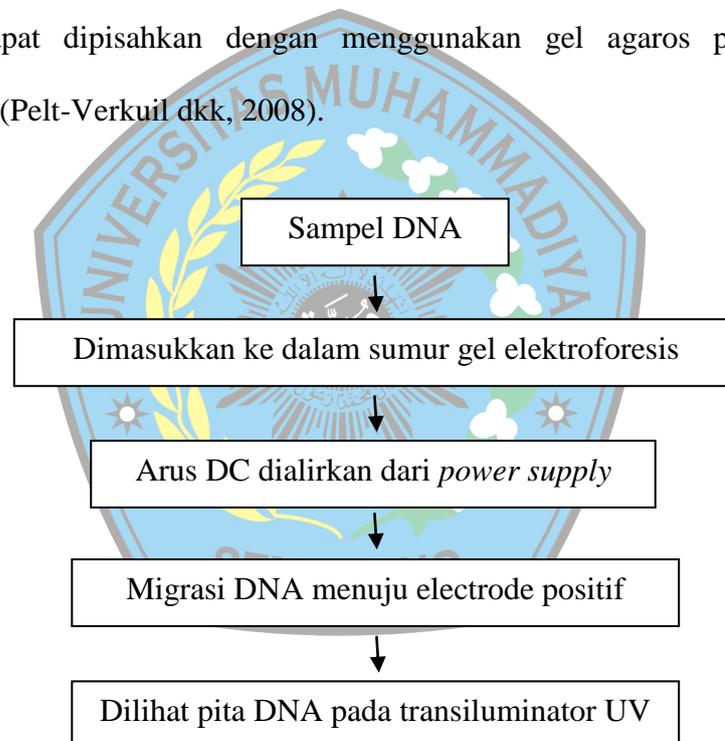
Sumber : [http://19.uhamzah.web.id/id3/2823-2721/Nested-Pcr\\_203195\\_19-uhamzah.html](http://19.uhamzah.web.id/id3/2823-2721/Nested-Pcr_203195_19-uhamzah.html)

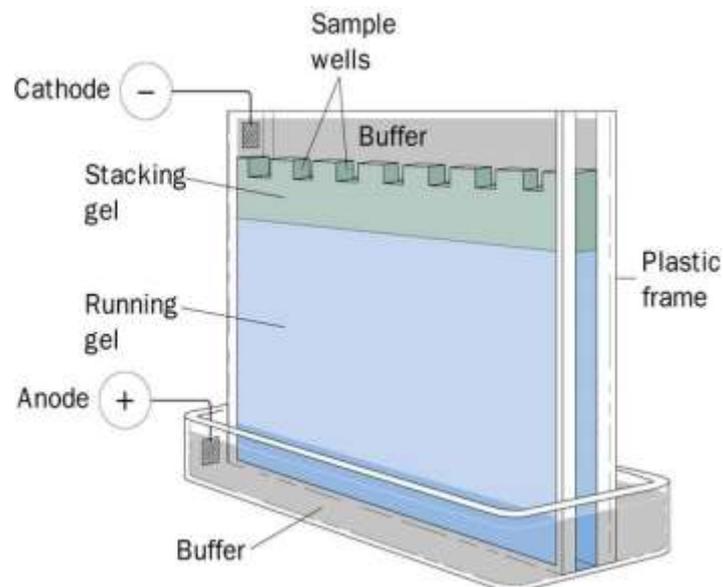
## 2.6. Elektroforesis Gel Agaros

Elektroforesis gel dikenal sebagai teknik untuk memisahkan dan mengidentifikasi makromolekul seperti DNA, RNA dan protein berdasarkan berat, ukuran atau titik isoelektrik. Pemisahan antara molekul dengan teknik elektroforesis ini berdasarkan muatan molekul yang bermigrasi melalui matriks gel (Giot 2010). Pada teknik ini memanfaatkan muatan listrik yang adapaa makromolekul misalnya DNA yang bermuatan listrik yang ada pada makromolekul misalnya DNA yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, misalnya gel agaros kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. Selain bergantung pada rasio dapat dipengaruhi oleh

bentuk molekul, tegangan listrik (voltase) yang digunakan dan sifat medium (Yuwono, 2006).

Elektroforesis dengan medium gel agarosa atau poliakrilamid merupakan metode standar untuk pemisahan, identifikasi dan pemurnian fragmen DNA. Agaros merupakan polisakarida yang diperoleh dari alga merah yang memiliki daya pemisahan lebih rendah jika dibandingkan dengan gel poliakrilamid namun memiliki rentang pemisahan yang lebih besar. DNA dengan ukuran 100 bp hingga 10 kpb dapat dipisahkan dengan menggunakan gel agaros pada berbagai konsentrasi (Pelt-Verkuil dkk, 2008).





Gambar 7. Bagan kerja gel elektroforesis

(Sumber : Handoyo, 2001)

## 2.7. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengetahui urutan nukleotida atau basa dalam suatu fragmen DNA. DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida. Dengan mengetahui urutan nukleotida suatu gen, maka dapat ditentukan urutan asam amino protein yang dikodenya. Sebaliknya, urutan asam amino protein tidak dapat memberikan informasi lengkap tentang urutan nukleotida gen yang mengkodonya. Karena alasan tersebut, selain karena mahalnya sekuensing protein, maka sekuensing DNA jauh lebih banyak digunakan (Gaffar, 2007).

Metode Maxam-Gilbert melibatkan bahan radioaktif seperti fosfat, sejumlah senyawa kimia, fragmen DNA dan auto radigrifi. Fragmen DNA dilabel radioaktif pada salah satu ujung 5'-nya melalui penempelan enzimatik radioaktif fosfat dipecah secara parsial dalam lima reaksi terpisah yang masing-masing

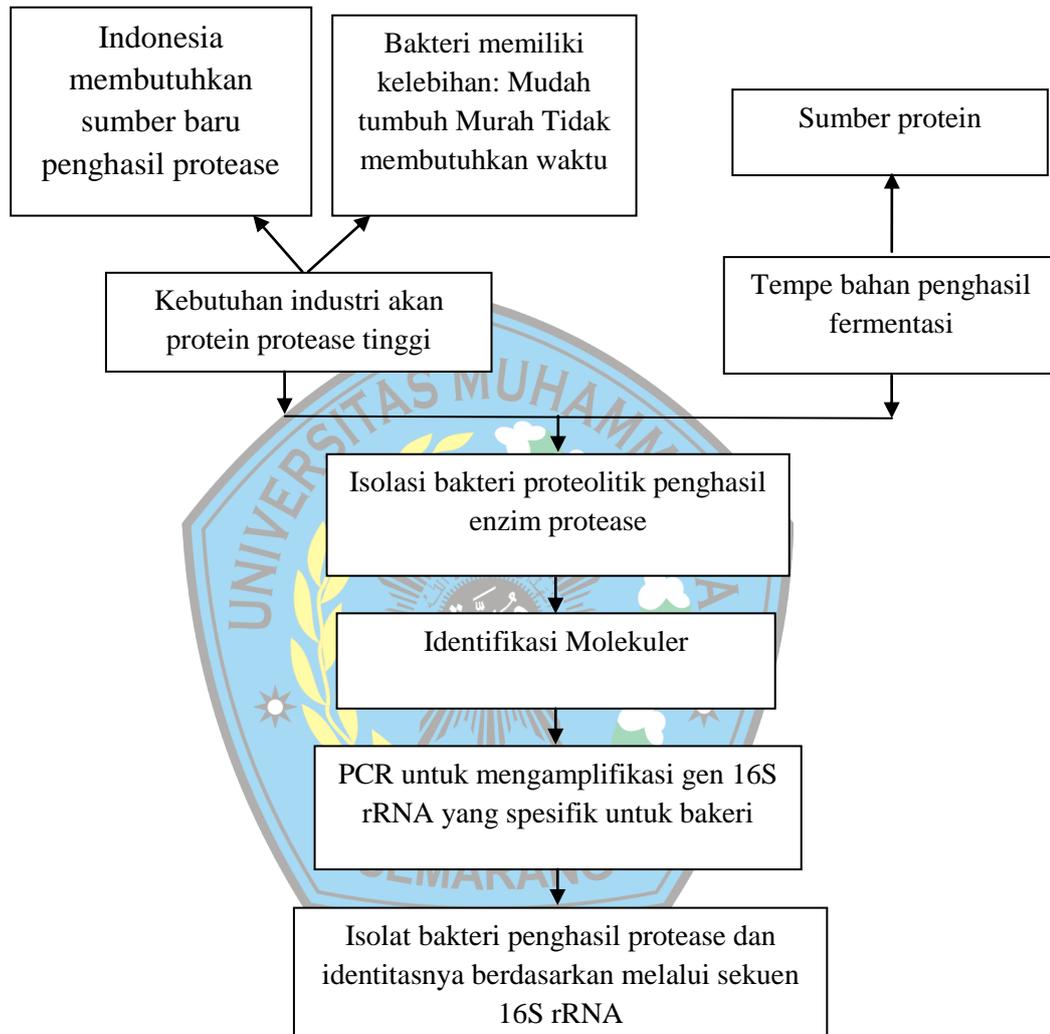
spesifik untuk basa tertentu. Tahap pertama yaitu basa-basa spesifik yang mengalami modifikasi secara kimia. Tahap kedua yaitu basa yang termodifikasi dipisahkan dari gugus gulanya dan pemutusan ikatan 5' dan 3' fosfodiester dengan basa termodifikasi (Sambrook dkk., 1989).

Metode lain yang lebih populer digunakan dalam sekuensing adalah metode Sanger atau yang disebut *The Sanger Chain-Termination Sequencing Method*. Metode terpilih ini disebut juga metode dideoxy nucleotide atau metode enzimatik. Prinsip kerja metode Sanger yaitu terminasi sintesis DNA oleh *dideoksinukleotida* yang ditempatkan pada empat tabung yang berbeda sehingga menghentikan sintesis urutan basa sesudah basa termodifikasi tersebut. Setiap tabung memiliki satu jenis ddNTP. ddNTP tidak memiliki gugus -OH pada ujung 3', hal tersebut berguna untuk menghentikan sintesis primer pada sekuen yang tidak memiliki gugus -OH. Terminasi sintesis DNA akan menghasilkan *chain terminating dideoxynucleotide* sehingga terbentuk fragmen-fragmen tersebut kemudian dilakukan melalui elektroforesis dengan mengidentifikasi jenis dideoksinukleotida yang digunakan untuk terminasi (Cooper, 1997; Fairbanks and Andersen, 1999).

Metode Maxam-Gilbert melibatkan bahan radioaktif seperti fosfat, sejumlah senyawa kimia, fragmen DNA dan auto radigradi. Fragmen DNA dilabel radioaktif pada salah satu ujung 5'-nya melalui penempelan enzimatik radioaktif fosfat dipecah secara parsial dalam lima reaksi terpisah yang masing-masing spesifik untuk basa tertentu. Tahap pertama yaitu basa-basaspesifik yang mengalami modifikasi secara kimia. Tahap kedua yaitu basa yang termodifikasi

dipisahkan dari gugus gulanya dan pemutusan ikatan 5'dan 3' fosfodiester dengan basa termodifikasi (Sambrookdkk., 1989).

## 2.8. Kerangka Teori



Gambar 2.8. Kerangka teori