

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Oncom Merah

Oncom merupakan salah satu makanan fermentasi asal Indonesia. Fermentasi yaitu suatu proses metabolisme yang menghasilkan energi dengan cara menguraikan protein, karbohidrat dan lemak tanpa kehadiran oksigen bebas. Oncom berasal dari daerah Jawa barat namun sangat populer dan digemari masyarakat diberbagai daerah. (Sarwono, 2010).

Cara fermentasi atau peragian telah digunakan oleh manusia sejak zaman dahulu untuk memproduksi makanan dan minuman. Oncom merah terbuat dari bungkil tahu yang berasal dari kedelai dan didegradasi oleh kapang oncom *Neurospora sitophilia* atau *N. Intermedia* yang mempunyai strain jingga, merah muda dan merah (Saidah, 2016).



Gambar 1. Oncom merah  
(Yullia, 2014)

### 2.1.1 Kandungan Oncom Merah

Oncom diketahui mengandung protein yang tinggi. Protein dalam oncom termasuk dalam golongan protein nabati. Dalam 100 g oncom mengandung protein sebesar 13 g, lemak 6 g, mineral kalsium 96 mg, dan fosfor 115 mg (Yullia, 2014). Oncom juga mengandung tinggi serat yaitu sekitar 50 g oncom mengandung serat total sebesar 24,6 g. Kelebihan oncom yang paling menonjol adalah harganya yang tergolong murah dan terjangkau dibanding makanan kaya protein lainnya seperti tahu dan tempe (Almatsier, 2006).

### 2.1.2 Enzim Protease

Protease merupakan salah satu enzim yang penting dan sering digunakan di bidang industri dan kesehatan. Protease adalah enzim yang terdiri dari oksidoreduktase dan hidrolase yang memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, seperti oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptide. Protease juga dikenal dengan nama peptidase atau proteinase (Poliana, 2007).

Enzim protease berperan dalam tubuh untuk membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah dan aktivitas berbagai jenis protein, enzim, hormon, serta neurotransmitter. Pemanfaatan enzim protease dalam bidang pangan antara lain digunakan sebagai pengempuk daging, penjernih bir, pembuatan keju, dan pembuatan *craker*. Sedangkan dalam bidang non pangan dimanfaatkan dalam industri tekstil, pembuatan deterjen dan industri kulit (Gupta, 2002).

### 2.1.3 Sumber-Sumber Enzim Protease

Sumber enzim protease yang telah diketahui berasal dari hewan, mikroba dan tanaman. Tanaman merupakan sumber protease terbesar yaitu 43,85% diikuti oleh bakteri sebesar 18,09%, jamur 15,08%, hewan 11,15%, alga 7,20% dan virus 4,41% (Mahajan dan Shamkat, 2010). Salah satu sumber penghasil enzim protease yang paling banyak diteliti adalah bakteri. Pemilihan bakteri sebagai sumber enzim protease disebabkan beberapa alasan yaitu:

1. Bakteri mudah cepat tumbuh dengan kecepatan yang lebih cepat dibandingkan makhluk hidup lainnya.
2. Skala produksi enzim mudah ditingkatkan.
3. Biaya produksi enzim relatif rendah.
4. kondisi produksi tidak bergantung pada musim dan waktu proses produksi lebih pendek (Poernomo dan Purwanto, 2003).

### 2.1.4 Klasifikasi Enzim Protease

Berdasarkan sistem klasifikasi IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), enzim-enzim proteolitik mikroba dikelompokkan menjadi endopeptidase dan eksopeptidase. Eksopeptidase (eksopeptidase) memecah protein dari ujung rantai polipeptida baik dari ujung amino atau karboksi substrat sehingga menghasilkan asam amino dan sisa peptida, sedangkan endopeptidase (endopeptidase) memotong ikatan polipeptida protein pada bagian dalam sehingga menghasilkan sejumlah peptida. Endopeptidase terdiri atas protease serin, protease sistein, protease aspartat dan protease metal. Penamaan tersebut menunjukkan bagian penting dari sisi katalik

enzim. Sedangkan eksopeptidase terdiri atas amino peptidase, *carboxypeptidase* dan omega peptidase (Ward, 1983).

## 2.2 Bakteri Proteolitik

Bakteri adalah kelompok mikroorganisme bersel tunggal dengan konfigurasi selular prokariotik (tidak memiliki inti). Bakteri sebagai makhluk hidup memiliki informasi genetik berupa DNA tetapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. DNA pada bakteri berbentuk sirkuler, panjang dan biasa disebut nukleoid. DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun atas ekson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Jawetz, 2004).

Berdasarkan peranannya dalam memproduksi enzim, terdapat bakteri yang disebut sebagai proteolitik. Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi didalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel (Abraham, 1993). Pada umumnya bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus*, dan *Staphylococcus*.

Semua bakteri umumnya mempunyai enzim protease didalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler. Struktur protein yang lebih kompleks menyebabkan dekomposisi protein oleh mikroorganisme lebih kompleks dibandingkan pemecahan karbohidrat dan produk akhirnya juga lebih bervariasi. Mikroorganisme melalui sistem enzim yang kompleks, memecah

protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Senyawa-senyawa intermediet dan produk akhir hasil pemecahan asam amino sangat bervariasi.

Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok:

1. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, tidak membentuk spora, misalnya *Pseudomonas* dan *Proteus*.
2. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora, misalnya *Bacillus*.
3. Bakteri anaerobik pembentuk spora, misalnya sebagian spesies *Clostridium*.

### 2.3 Identifikasi Bakteri proteolitik

Identifikasi bakteri proteolitik secara mikrobiologi dilakukan dengan cara mengidentifikasi koloni bakteri penghasil protease dengan menggunakan analisis fenotip yang meliputi pengamatan morfologi dan pewarnaan gram. Pengamatan morfologi bakteri penghasil protease dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada medium non selektif *Nutrient Agar* (NA). Morfologi yang dapat diamati secara makroskopis meliputi warna koloni, bentuk, tepi, elevasi, ukuran, dan konsistensi (Putri, 2012).

Bakteri juga dapat dilihat jenis dan bentuknya secara mikroskopis melalui pewarnaan gram. Pada pewarnaan gram akan diketahui bakteri tergolong dalam gram negatif atau gram positif. Selain itu bentuk bakteri yang dapat ditemukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop yaitu bentuk basil (batang), kokus (bulat) dan spiral. Bentuk sel kokus terdapat sebagai sel bulat tunggal, berpasangan (diplokokus), berantai (streptkokus) atau berkelompok seperti buah anggur (stafilokokus). Bentuk sel berupa batang biasanya bervariasi, memiliki

panjang mulai dari batang pendek sampai batang panjang yang melebihi dari beberapa kali diameternya (Murwani, 2015).

Identifikasi morfologi bakteri penghasil protease dapat dilihat dengan cara mengisolasi bakteri menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA). SMA merupakan media yang terdiri dari PCA steril dan susu skim. Susu skim digunakan sebagai sumber substrat. Selain itu susu skim juga mengandung protein tinggi sekitar 3,7% dan lemak 0,1%. Susu skim mengandung kasein yang dapat dipecah oleh mikroorganisme proteolitik menjadi senyawa nitrogen terlarut sehingga pada koloni dikelilingi area bening. Timbulnya zona bening dengan diameter  $\geq 12$  mm menandakan adanya bakteri protease yang dapat menghidrolisis protein (Ethica, 2016).

### **2.3.1 Identifikasi Molekuler Menggunakan PCR 16S rRNA**

Identifikasi bakteri yang lebih spesifik dapat dilakukan dengan identifikasi molekuler menggunakan molekul 16S rRNA karena molekul ini bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Gen 16S rRNA dapat digunakan untuk mengklasifikasikan bakteri berdasarkan hubungan kekerabatan bakteri (Darmawati, S; dkk, 2014). Analisis sekuensing 16S rRNA sudah banyak digunakan dibidang mikrobiologi. Metode berbasis molekuler ini dinilai lebih cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri serta memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan metode mikrobiologi konvensional. Gen 16S ribosomal RNA (16S rRNA) memiliki daerah yang *conserved* (lestari) sehingga tepat digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis sekuensing

untuk menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies (Rinanda, 2011).

Gen 16S rRNA juga memiliki *hypervariable region* yang merupakan ciri khas dari mikroorganisme. Molekul 16S rRNA ini merupakan jenis RNA yang terlibat dalam produksi protein. Primer yang digunakan dalam identifikasi bakteri menggunakan PCR 16S rRNA ini yaitu primer 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') dan 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') . Kedua primer ini biasa digunakan untuk identifikasi gen 16S rRNA bakteri (Panajung, 2014; Ethica dkk, 2013).

#### **2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Prinsip kerja**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Handoyo dan Rudiretna, 2010). Pelipat gandaan ini membutuhkan enzim yang disebut sebagai enzim polimerase. Polimerase adalah enzim yang dapat menggabungkan DNA cetakan tunggal kemudian membentuk untaian molekul DNA yang panjang. Enzim ini membutuhkan primer serta DNA cetakan seperti nukleotida yang terdiri dari empat basa yaitu *Adenine* (A), *Tymine* (T), *Guanine* (G) dan *Cytosine* (C) (Gibbs, 1990).

Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA suatu skuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR

memungkinkan pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA templat (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik (Yusuf, 2010).

#### 2.4.1 Komponen-Komponen PCR

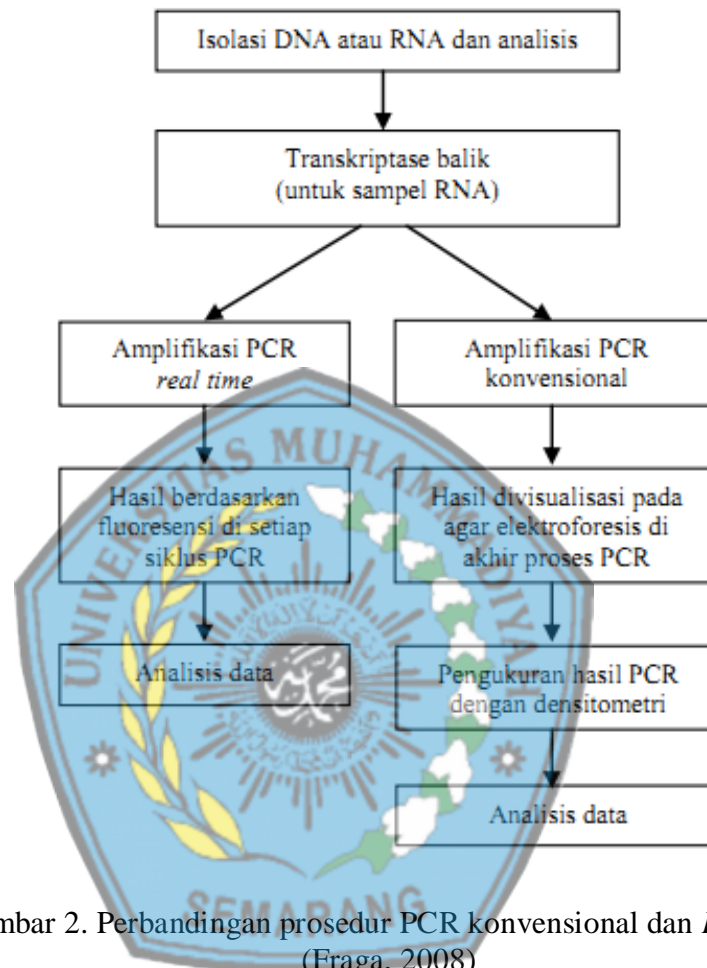
Secara teknis, perbanyakan DNA menggunakan PCR membutuhkan beberapa komponen utama diantaranya (Budiarto, 2015):

1. Template atau cetakan DNA yang akan diperbanyak.
2. Enzim DNA polimerase tahan panas.
3. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18-28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA.
4. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Cara kerjanya, dNTP akan mengikat ion  $Mg^{2+}$  sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion yang diperlukan untuk reaksi polimerisasi.
5. Kovaktor  $MgCl_2$ .
6. Larutan buffer (penyangga) yang mengandung 10-50 mM Tris-HCl pH 8,8 suhu 20 °C, 50 mM KCl, 0,1% gelatin atau *Bovine Saline Albumin* (BSA) dan Tween 20 sebanyak 0,01 %.

Pada umumnya metode PCR dibedakan menjadi 2 yaitu PCR konvensional dan PCR *real time*. Analisis hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi di agar elektroforesis. Sedangkan pada PCR *real time*, jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur



disetiap siklus proses PCR. Perbandingan PCR *real time* dan PCR konvensional dapat dilihat pada bagan dibawah ini:



Gambar 2. Perbandingan prosedur PCR konvensional dan *Real time* (Fraga, 2008)

#### 2.4.2 Tahapan-tahap proses PCR

Terdapat 3 tahapan penting pada PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat:

- a) Dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan kedalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Proses ini biasanya berlangsung selama 3 menit pada suhu 94-95 °C.

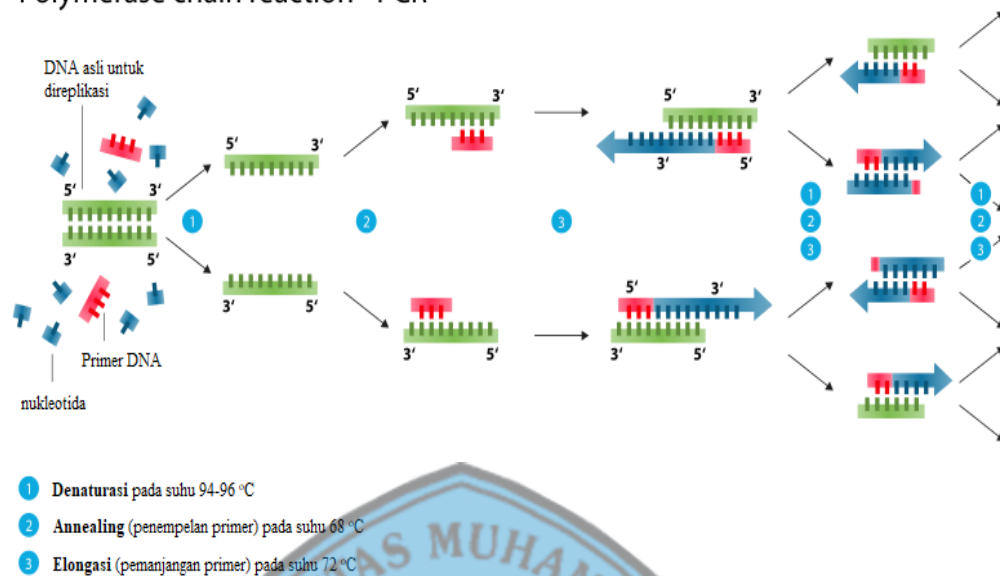
b) *Annealing*/Penempelan primer

Tahap kedua yaitu penempelan oligonukleotida ke DNA cetakan berantai tunggal biasanya pada suhu 50-60 °C sehingga primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu dimana primer anealing biasanya disebut dengan  $T_m$ . Waktu yang dibutuhkan untuk annealing biasanya berkisar antara 30-45 detik. Semakin panjang ukuran primer, maka semakin tinggi temperaturnya.

c) *Extension*/ Pemanjangan primer

Tahap ketiga yaitu perpanjangan atau ekstensi fragmen DNA dengan enzim polimerase dan primer untuk menghasilkan kopi DNA yang dapat berfungsi sebagai DNA cetakan untuk siklus selanjutnya yang berlangsung pada suhu 70-78 °C. Selama tahap ini taq polimerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72 °C diperkirakan 35-100 nukleotida/detik bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan DNA target. (Yusuf, 2010; Hewajuli dan Dharmayanti, 2014).

## Polymerase chain reaction - PCR



Gambar 3. Tahapan PCR

(Sumber: <https://www.thebalance.com/how-the-polymerase-chain-reaction-pcr-works-375670>, 2018)

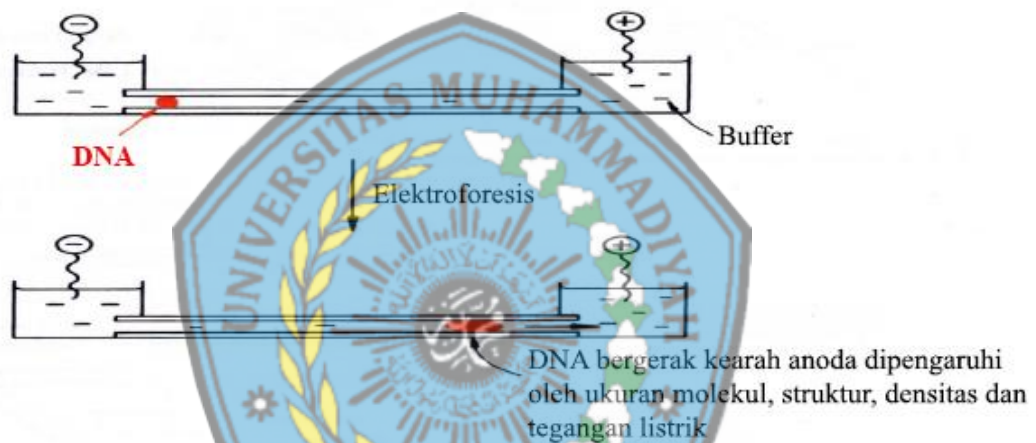
## 2.5 Prinsip Kerja Gel Elektrophoresis

Elektrophoresis adalah sebuah teknik untuk memisahkan dan memurnikan suatu makromolekul khususnya protein dan asam nukleat berdasarkan perbedaan ukuran, konfirmasi dan muatan. Prinsip kerja gel elektroforesis memanfaatkan muatan arus listrik yang ada pada DNA yang bermuatan negatif. Molekul DNA atau protein akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono, 2009). Hasil uji DNA yang baik dengan elektroforesis ditunjukkan dengan pita DNA yang tampak tebal dan tampak sedikit atau tidak ada *smear* jika divisualisasikan di *UV transilluminator*.

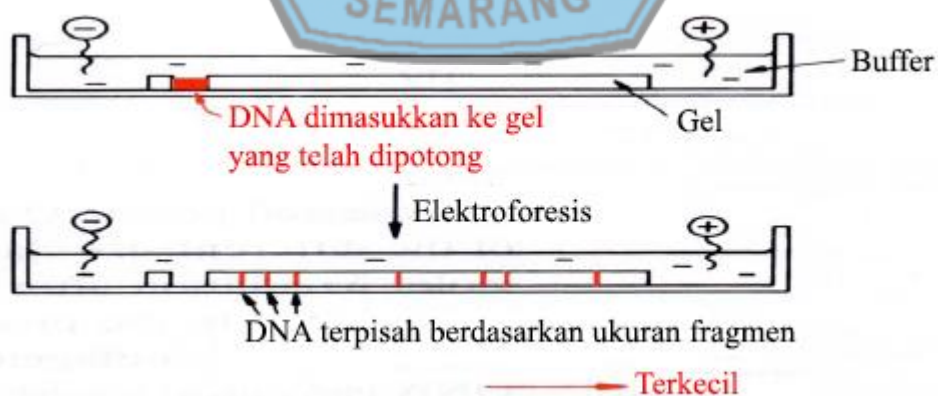
Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Metode ini dilakukan dengan cara menginjeksi DNA kedalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya

untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif. Jumlah amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional divisualisasikan dengan menggunakan agar elektroforesis serta kualitas DNA genomnya dapat diketahui melalui elektroforesis. Penandaan fragmen DNA dengan *fluroscent dye* dan intensitas pita DNA dapat diukur dengan menggunakan mesin digital densitometri (Fraga, 2008).

(a) Elektroforesis standar



(b) Gel Elektroforesis



Gambar 4. Prinsip kerja gel elektroforesis (Yusuf, 2010)

## 2.6 Prinsip Metode Sekuensing DNA

Analisis sekuensing DNA telah banyak digunakan terutama dalam bidang penelitian. Kualitas analisis sekuensing sangat bergantung pada faktor kecepatan prosedur kerja dan teknologi yang digunakan. Langkah analisis sekuensing dimulai dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri. DNA yang diperoleh akan dijadikan sebagai cetakan dalam tahap amplifikasi PCR. Primer yang digunakan dalam PCR primer 16S rRNA yang bersifat universal berukuran 1500 bp, sehingga dapat mengamplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri (Rinanda, 2011).

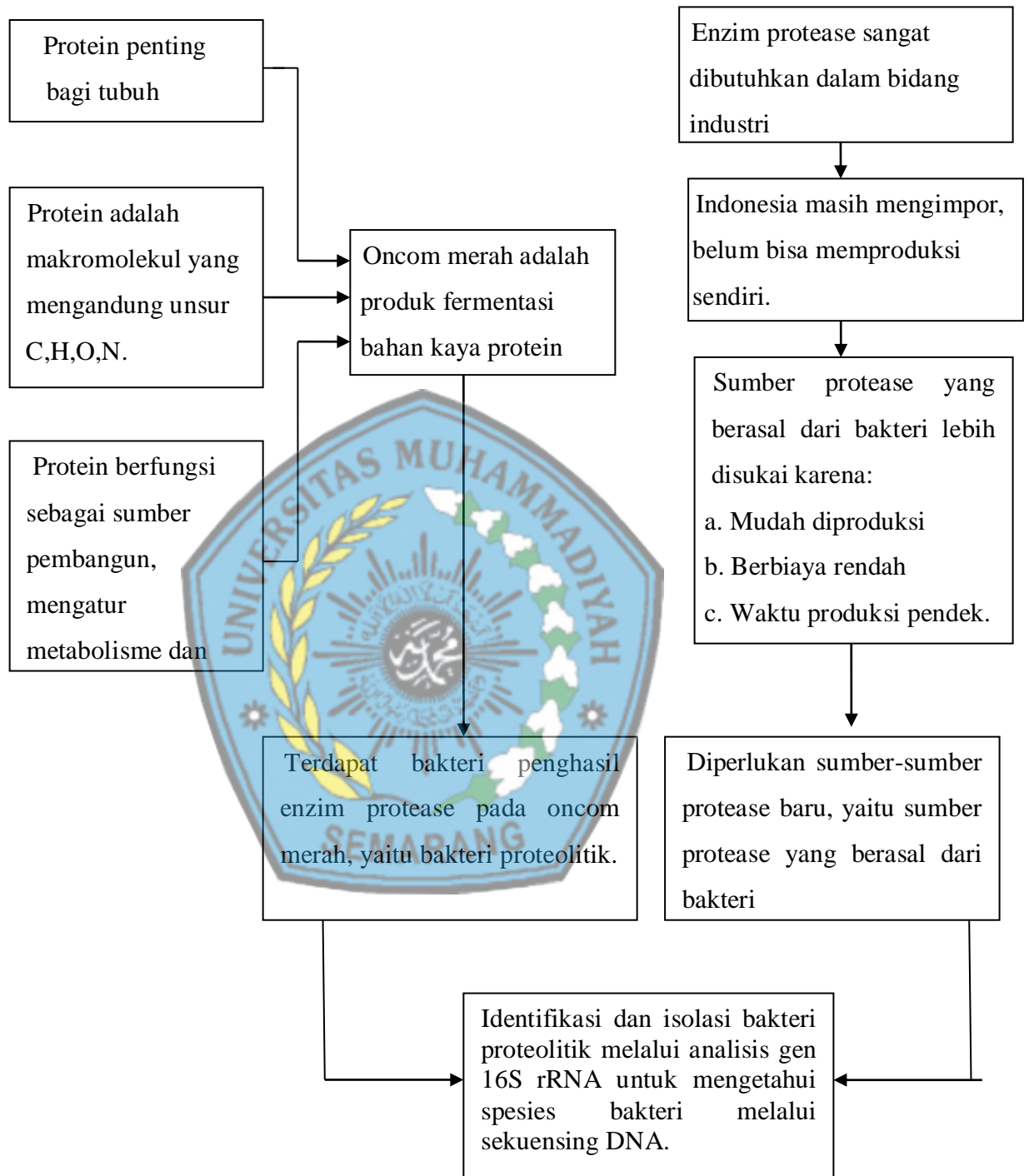
Produk PCR yang telah dimurnikan, ditentukan nukleotidanya melalui sekuensing. Pada tahap sekuensing ini produk PCR dengan ukuran tertentu digunakan sebagai cetakan. Primer pada tahap PCR juga digunakan dalam sekuensing, hanya masing-masing primer yang digunakan terpisah dalam satu siklus sekuensing (*forward* saja atau *reverse* saja). Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer reverse dan forward serta pada umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (*consensus sequence*). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database menggunakan software MEGA 7.0 (Clarridge, 2004). Penelusuran ini dilakukan dengan menggunakan internet melalui program pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *National Institute for Health*, USA ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

Beberapa sistem dapat menentukan urutan nukleotida melalui pembacaan satu primer, namun pembacaan melalui dua primer memberikan hasil yang lebih akurat. Beberapa database lain yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens 16S rRNA antara lain: (Rinanda, 2011)

1. Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
2. Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://ebi.ac.uk/embl/>)
3. Smart Gene IDNS (<http://.smartgene.ch>)
4. Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>).



## 2.7 Kerangka Teori



Gambar 5. Kerangka teori identifikasi bakteri penghasil protease.