

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Oncom

Oncom merupakan salah satu produk fermentasi makanan khas Jawa Barat yang menggunakan substrat bungkil kacang tanah atau ampas tahu yang diinokulasi dengan spora kapang oncom merah, yaitu spesies kapang yang berkembang biak secara generatif (Kenyamu dkk., 2014).

Oncom sendiri merupakan makanan olahan berasal dari kedelai, nilai gizinya hampir sama dengan tahu dan tempe, mengandung protein dan lemak yang baik bagi tubuh. Proses pembuatan oncom hampir sama dengan tempe yaitu dengan proses fermentasi yang dilakukan oleh beberapa jenis kapang. Yang membedakan tempe dan oncom adalah tempe sudah dikonsumsi ketika kapang belum menghasilkan spora sedangkan oncom dikonsumsi setelah kapang menghasilkan spora (Nuraini dkk., 2015).

Fermentasi adalah suatu proses metabolisme yang menghasilkan energi dengan cara menguraikan protein, karbohidrat, dan lemak tanpa kehadiran O_2 bebas. Cara ini telah digunakan manusia sejak jaman purba untuk menghasilkan makanan dan minuman (Sarwono, 2010).

Menurut Saosono et. al. (1986) dalam Indarto (2010), kapang yang berperan dalam proses fermentasi oncom merah (kapang oncom merah) adalah *Neurospora* sp. Kapang ini mudah tumbuh pada substrat, mempunyai waktu generasi yang pendek, dan miseliumnya terdiri dari hifa yang bercabang, menjulang ke udara, yang mudah dikenal dari kondisinya yang berwarna jingga.



Gambar 1 oncom merah(a), oncom hitam (b) (sumber : Athiya, 2014)

Oncom yang beredar dimasyarakat ada dua jenis yaitu oncom merah dan oncom hitam. Oncom merah pada umumnya dibuat dari bungkil tahu yang berasal dari kedelai yang telah diambil proteinnya dalam pembuatan tahu yang didegradasi oleh kapang *Neurospora sitophila*. Sedangkan oncom hitam merupakan oncom yang berbahan baku dari kacang tanah yang didegradasi oleh *Rhizopus oligosporus* (Saidah dkk., 2016).

Ampas tahu adalah kedelai yang telah diambil proteinnya dalam pembuatan tahu. Bungkil kacang tanah adalah ampas yang berasal dari kacang tanah yang telah diambil minyaknya dengan proses pemerasan mekanis atau proses ekstraksi. Biasanya, bungkil kacang tanah digunakan untuk pembuatan oncom hitam, sedangkan ampas tahu untuk oncom merah (Sarwono, 2010).

Oncom bisa menjadi salah satu sumber alternatif asupan gizi yang baik bagi tubuh. Proses fermentasi yang digunakan dalam pembuatan oncom ini, dapat mengurai struktur kimia dari bahan-bahan pembuatannya menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga akan lebih mudah dicerna dan dimanfaatkan oleh tubuh (Nuraini dkk., 2015).

Selain harga relatif murah, kandungan gizi dalam oncom juga banyak, seperti karbohidrat, protein, lemak, serat, air, zat besi, kalium, serta natrium. Namun kandungan gizi kedua jenis oncom ini sangat berbeda. Hal ini dilihat dari jenis bahan yang dipakai. Oncom hitam mengandung protein lebih besar, yaitu 8,6%. Sedangkan oncom merah mengandung protein sekitar 4,9% saja (Nuraini dkk., 2015).

Tabel 2 (dikutip : Nuraini dkk, 2015). Kandungan nutrisi dalam oncom, dengan sajian 100 gram oncom

Nutrisi	Kandungan
Air	87,46 %
Energi	187 kkal
Protein	13 gram
Lemak	6 gram
Karbohidrat	22,6 gram
Kalsium	96 mg
Fosfor	115 mg
Zat besi	27 mg
Vitamin A	0 IU
Vitamin B1	0,09 mg
Vitamin C	0 mg

Kandungan gizi dari oncom memberikan manfaat sebagai berikut :

a. Mencegah perut kembung

Proses fermentasi yang dilakukan oleh *neuro sporasitophila* dan kapang *rhizopus oligosporus* dapat mencegah efek fluktuasi. Hal ini dikarenakan selama proses fermentasi oncom, kapang menghasilkan enzim alpha-galaktosidase yang menguraikan rafinosa dan stakhiosa pada level yang lebih rendah. Proses inilah yang membuatnya tidak menimbulkan terjadinya gas dalam perut yang menyebabkan perut kembung.

b. Menekan produksi racun aflatoksin

Pada saat proses pembuatan oncom, masalah sanitasi menjadi bagian yang harus selalu diperhatikan. Hal ini bertujuan untuk mencegah berkembangnya jenis mikroba lain seperti *aspergillus flavus* yang menghasilkan racun aflatoksin yang terkenal sebagai pemicu resiko kanker. Biasanya kapang *aspergillus flavus* dapat ditemukan pada kacang – kacang, rempah – rempah, serta bahan sereal yang berkualitas jelek. Penggunaan kapang *sporasitophila* dan kapang *rhizopus oligosporus* mampu menekan produksi racun aflatoksin.

c. Sumber gizi dan energi bagi tubuh

Manfaat oncom memiliki kandungan gizi seperti karbohidrat dan protein dalam jumlah yang tinggi. Hal itu tentu saja sangat baik bagi tubuh, menjadikannya sebagai alternatif sumber asupan gizi dan juga sumber energi bagi tubuh. Selain itu kandungan gizi pada oncom juga baik untuk pertumbuhan jaringan tubuh pada janin.

d. Menjaga sistem pencernaan

Degradasi yang dilakukan oleh kapang saat proses fermentasi dapat menyebabkan beberapa oligosakarida sederhana seperti sukrosa, rafinosa, dan stakhiosa menurun pesat akibat aktivitas enzim α -galaktosidase yang dihasilkan kapang. Manfaat oncom ini, sangat baik untuk menjaga sistem pencernaan, karena rafinosa dan stakhiosa sangat berperan atas gejala flatulensi yang muncul bila seseorang mengonsumsi kedelai maupun kacang tanah.

e. Mengurangi kolestrol

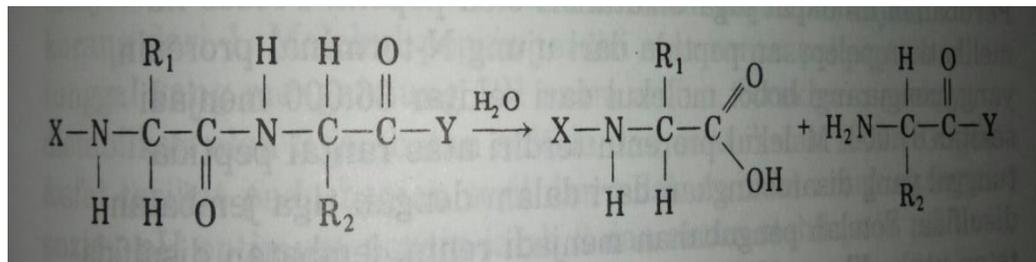
Peneliti sebelumnya memeriksa efisiensi oncom dalam efisiensinya untuk mengurangi kadar kolesterol pada tubuh. Mereka menggunakan tikus yang telah diberikan diet bebas kolesterol. Oncom terbukti dapat mengurangi kadar kolesterol dan meningkatkan ekskresi steroid tinja. Oncom sangat kaya akan protein. Kandungan serat makanan pada oncom dapat merangsang produksi rantai pendek asam lemak oleh mikroflora usus. Hal ini sangat berpengaruh pada pengurangan kolesterol yang disebabkan oleh efek kolaboratif pepsin, protein, isoflavon aglikon.

Oncom segar hanya mampu bertahan selama 1 hingga 2 hari saja pada suhu ruang, selanjutnya oncom akan mengalami kerusakan yang disebabkan oleh terdegradasinya protein dalam oncom oleh enzim proteolitik sehingga terbentuk ammonia yang menyebabkan oncom tidak layak konsumsi (Nuraini dkk., 2015).

2.2 Enzim Protease

Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Beberapa sumber yang dapat menghasilkan enzim ini, yaitu dari tumbuhan, hewan dan mikroba. Mikroba lebih sering digunakan karena kemampuannya untuk menghasilkan enzim yang bersifat termostabil (Pramitha, 2014).

Enzim protease sangat penting dalam banyak prosedur pemrosesan makanan industri. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim protease ialah hidrolisis ikatan peptida protein, dimana reaksi ini merupakan persyaratan yang khas untuk hidrolisis ikatan peptida oleh enzim protease (deMan, 1997).



Gambar 2 (deMAN, 1997). Reaksi yang dikatalisis oleh protease

Pentingnya protease dan tingginya daya jual enzim ini, mendorong para ilmuwan untuk mencari sumber – sumber protease baru yang bersifat produktif yakni yang memiliki aktivitas tinggi. Saat ini, para ilmuwan mulai memanfaatkan limbah sebagai sumber mikroorganisme penghasil protease (Fatoni dkk., 2012).

Protease dari mikroba merupakan enzim konstitutif atau inducibel parsial. Enzim konstitutif selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif disintesis bila ada induksi substrat dalam medium. Sintesis enzim induktif meningkat seiring peningkatan konsentrasi substrat terutama bila substratnya merupakan satu-satunya sumber karbon (Badriyah dkk., 2013).

Salah satu jenis limbah yang dihasilkan oleh industri pangan adalah limbah dari industri tahu, makanan yang telah lama dikenal masyarakat Indonesia dan merupakan sumber protein dengan harga yang terjangkau serta proses pembuatannya mudah. Limbah cair dari tahu mengandung 9% protein, 0.69% lemak, dan 0.05% karbohidrat (Fatoni dkk., 2012).

Menurut Sulistyanyingtyas (2006) dalam penelitian Fatoni dkk (2012), Komponen nutrisi yang lengkap dari limbah cair tahu yang masih mengandung protein dengan kadar tinggi yang memungkinkan mikroorganisme penghasil protease tumbuh di dalamnya.

Menurut deMAN (1997), enzim protease dibagi menjadi 4 golongan, sebagai berikut :

a. Protease asam

Protease asam merupakan kelompok enzim dengan pH optimum rendah. Termasuk dalam kelompok pepsin, renin (kimosin), dan sejumlah besar protease mikroba dan fungus. Renin, enzim murni yang terdapat dalam renet, adalah ekstrak lambung anak sapi yang telah dipakai selama beribu – ribu tahun sebagai pengkoagulasi dalam pembuatan keju.

Karena kelangkaan lambung anak sapi, pengganti renet sekarang dipakai secara luas, dan koagulan yang dipakai pada pembuatan keju biasanya mengandung campuran renin dan pepsin atau protease mikroba. Beberapa dari protease mikroba telah dipakai selama berabad – abad pada produksi makanan yang difermentasi, misalnya pembuatan kecap.

Pepsin dibentuk dalam mukosa lapis lambung berbentuk pepsinogen. Keasaman isi lambung yang tinggi membantu pada perubahan menjadi pepsin secara autokatalitik. Perubahan ini melibatkan pemutusan beberapa fragmen peptida dari ujung N-terminal pepsinogen.

Fragmen pepsin ini sendiri terdiri atas satu peptida besar dan beberapa yang kecil. Peptida besar tetap berasosiasi dengan pepsinogen melalui ikatan nonkovalen dan bertindak sebagai inhibitor. Inhibitor ini lepas dari pepsin pada pH 1 sampai 2.

Pada tahap awal perubahan pepsinogen menjadi pepsin, 6 ikatan peptida diputuskan, dan kerja selanjutnya terhadap peptida besar menyebabkan tiga ikatan lagi yang terhidrolisis.

Beberapa organisme protease asam yaitu organisme *Endothia parasitica*, *Mucor miehei*, dan *Mucor pasillus*. Dalam produksi kecap biasanya dipakai protease asam *Aspergillus oryzae*. Produk lain melibatkan pemakaian fungus *Rhizopus oligosporus*.

b. Protease serina

Golongan ini mencakup kimotripsin, tripsin, elastase, trombin dan substilisin. Nama golongan enzim ini mengacu ke bagian seril yang terlibat pada tapak aktif. Sebagai akibatnya, semua enzim ini dihambat oleh diisopropilfosforofluoridat, yang bereaksi dengan gugus hidroksil bagian seril.

Enzim ini mempunyai gugus imidazol sebagai bagian dari tapak aktifnya dan semuanya endopeptida. Kimotripsin, tripsin dan elastase adalah enzim pankreas yang melaksanakan fungsinya dalam saluran usus. Enzim ini diproduksi sebagai zimogen inaktif dan diubah menjadi bentuk aktif oleh proteolisis terbatas.

c. Protease sulfhidril

Enzim ini memperoleh namanya dari kenyataan bahwa gugus sulfhidril dalam molekul sangat penting untuk aktivitasnya. Kebanyakan enzim ini berasal dari tumbuhan dan dipakai secara luas dalam industri makanan. Protease sulfhidril yang berasal dari hewan hanya dua ktripsin, yang terdapat dalam jaringan sebagai enzim intra sel.

Enzim yang terpenting dalam golongan ini ialah papain, fisin, dan bromelain. Papain adalah enzim yang terdapat dalam buah, daun dan batang pohon pepaya. Enzim ini diperoleh dengan pemurnian eksudat dari buah pepaya tua tetapi belum masak.

Pemurnian melibatkan penggunaan kromatografi afinitas pada kolom yang mengandung inhibitor. Proses ini mengakibatkan pengaktifan penuh enzim, yang kemudian mengandung 1 mol sulfhidril per mol protein. Papain kasar tidak aktif secara penuh dan hanya mengandung 0,5 mol sulfhidril per mol protein.

Bromelain diperoleh dari buah atau batang tumbuhan nenas (*Ananas comosus*). Batang dikempa dan enzim diendapkan dari sari dengan aseton. Fisin diperoleh dari lateks pohon ara tropika (*Ficus glabrata*). Enzim tidak homogen dan mengandung sekurang – kurangnya tiga komponen proteolitik yang berbeda.

d. Protease yang mengandung logam

Enzim ini memerlukan logam untuk aktivitasnya dan dihambat oleh senyawa yang mengkelat logam. Enzim ini merupakan eksopeptidase dan termasuk karboksipeptidase A (peptidil – L – asam amino hidrolase) dan B (peptidil – L – lisina hidrolase), yang menghilangkan asam amino dari ujung rantai peptida yang mengandung gugus α -karboksil bebas.

Amino peptidase menghilangkan asam amino dari ujung α -amino bebas pada rantai peptida. Metaloeksopeptidase memerlukan logam divalen sebagai kofaktor, karboksipeptidase mengandung seng. Enzim – enzim ini sangat khas dalam kerjanya, misalnya karboksipeptidase B memerlukan asam amino terminal-C

berupa argina atau lisina, persyaratan untuk karboksipeptidase A berupa fenilalanina, triptofan, atau isoleusina.

Pengujian secara kualitatif bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler dilakukan dengan cara mengamati zona bening yang berada disekitar koloni bakteri, kemudian membagi diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri. Hasil bagi diameter tersebut dinyatakan sebagai aktifitas protease secara relatif (Sastono, 2008).

2.3 Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme prokariot bersel tunggal yang hanya dapat dilihat morfologinya dengan bantuan mikroskop. Keragaman bakteri dilihat dari berbagai sudut pandang seperti: morfologi, fisiologi, dan genetik. Tiap-tiap habitat yang berbeda memberikan keragaman yang berbeda pula (Utami dkk, 2015).

Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan dengan tanaman dan hewan. Dalam peranan mikroorganisme sebagai sumber enzim dikatakan lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat, tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetik, serta mampu menghasilkan enzim yang ekstrim (Akhdiya, 2003).

2.3.1 Bakteri Proteolitik

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu mendegradasi protein, karena memproduksi enzim protease ekstraseluler. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Untuk

menentukan kemampuan mikroorganisme dalam mensekresikan protease yang dapat mendegradasikan protein (Wikandar, 2012).

2.4 Identifikasi Bakteri

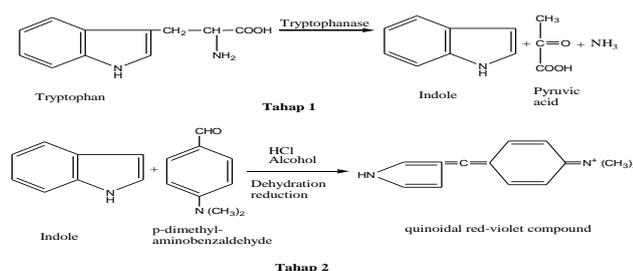
2.4.1 Identifikasi Morfologi

Pada umumnya bakteri proteolitik adalah bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Morfologi dari bakteri proteolitik adalah sel berbentuk basil, gram positif atau negatif dan membentuk endospora, aerob obligat, motil, oksidasi fermentatif negatif (Wikandar, 2012).

2.4.2 Identifikasi Biokimia

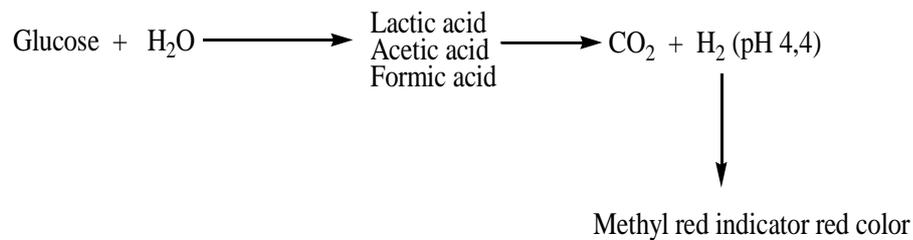
Identifikasi biokimia merupakan suatu uji yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas metabolisme mikroorganisme (Wicaksono, 2014). Identifikasi biokimia yang sering dilakukan terdiri dari uji indol, uji merah metil, uji *Voges-Proskauer*, dan uji sitrat (Kusuma dkk., 2010).

Uji Indol positif ditandai dengan terbentuknya cincin yang berwarna merah cerry di permukaan biakan apabila ditambahkan beberapa tetes pereaksi Kovac's yang terdiri dari p-dimetilaminobenzaldehid, butanol, dan asam. Uji ini menggunakan media *Tryptone Broth* yang mengandung substrat triptofan. Reaksi positif terjadi karena triptofan dikonversi menjadi indol (Kusuma dkk., 2010).



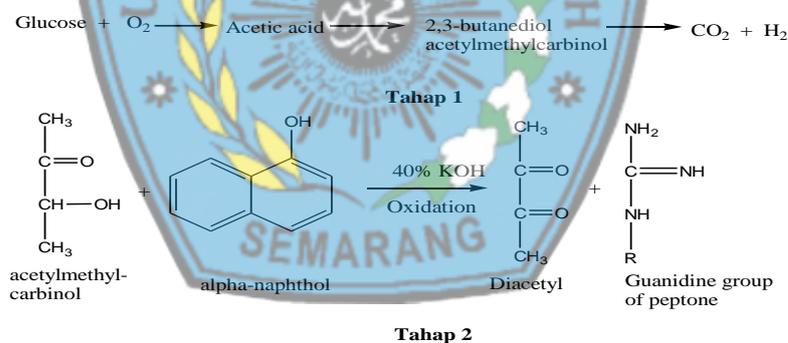
Gambar 3 (Kusuma dkk, 2010). Reaksi Uji Indol

Uji metil merah positif ditandai biakan yang berwarna merah apabila ditambahkan 5 tetes larutan metil merah dan dikocok. Warna merah terjadi karena fermentasi glukosa menghasilkan asam (Kusuma dkk., 2010).



Gambar 4 (Kusuma dkk, 2010). Reaksi Uji Methyl Red

Uji *Voges-Proskauer* positif ditandai dengan warna biakan menjadi merah muda sampai merah menyala setelah ditetesi larutan alfa naftol dan KOH 40 % (3:1). Pada uji ini terjadi pembentukan asetimetilkarbinol dari dekstrosa (Kusuma dkk., 2010)



Gambar 5 (Kusuma dkk, 2010) . Uji *Voges-Proskauer*

Uji sitrat positif ditunjukkan oleh perubahan warna biakan dari hijau menjadi biru karena terbentuknya natrium karbonat hasil reaksi enzimatis yang mengubah indikator bromtimol biru pada media (Kusuma dkk., 2010).

2.4.3 Identifikasi Molekuler gen 16S rRNA

Seiring perkembangan zaman telah dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas

yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (*16S ribosomal Ribonucleic acid*) yaitu Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan *Svedberg*, yaitu satuan ukuran ribosom (Rinanda, 2011).

Pemanfaatan gen 16S rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekular yang universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat jenis atau spesies. Hal ini disebabkan karena keberadaan gen tersebut tidak tergantung pada kondisi pertumbuhan dan media yang digunakan (Joko dkk., 2011).

Gen 16S rRNA memiliki daerah yang *conserved* (lestari) sehingga jadi pilihan yang tepat jika digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan analisis sekuensing untuk menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies. (Rinanda, 2011).

Gen ini juga memiliki *hypervariable region* yang merupakan ciri khas tiap mikroorganisme. Analisis sekuensing gen 16S rRNA sudah banyak digunakan di bidang mikrobiologi. Metode berbasis molekuler ini dinilai cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri patogen serta memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan metode mikrobiologi konvensional (Rinanda, 2011).

Identifikasi dengan 16S rRNA dilakukan berdasarkan perbandingan urutan basa yang konservatif. Jika urutan basa memiliki persamaan yang tinggi maka strain dapat dimasukkan dalam satu spesies yang sama. Sebaliknya jika derajat keasaman urutan basa gen penyandi 16S rRNA 97% dianggap sebagai spesies baru (Wulandari, 2012).

Menurut Weisburg *et,al* (1991) dan Triana (2005) dalam Zulaika dkk (2012) mengatakan karakterisasi molekuler gen 16S rRNA terdiri dari beberapa tahap yaitu isolasi DNA kromosomal, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan *parsial universal primer forward* dan *universal primer reserve* untuk memperoleh sekuen gen 16S rRNA , elektroforesis DNA hasil PCR dengan TE agarose, *sequencing* gen 16S rRNA.

Sekuensing gen 16S rRNA diperlukan dalam menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR. Selain itu, sekuensing gen 16S rRNA mampu mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies bakteri resisten (Fatimawali, 2011).

2.5 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR adalah suatu metode *in vitro* untuk menghasilkan sejumlah besar fragmen DNA spesifik dengan panjang dan sekuens yang telah ditentukan dari sejumlah kecil template kompleks. PCR merupakan suatu tehnik sangat kuat dan sensitive yang dapat diaplikasi dalam berbagai bidang seperti biologi molekuler, diagnostic, genetika populasi dan analisis forensic (Anggereini, 2012).

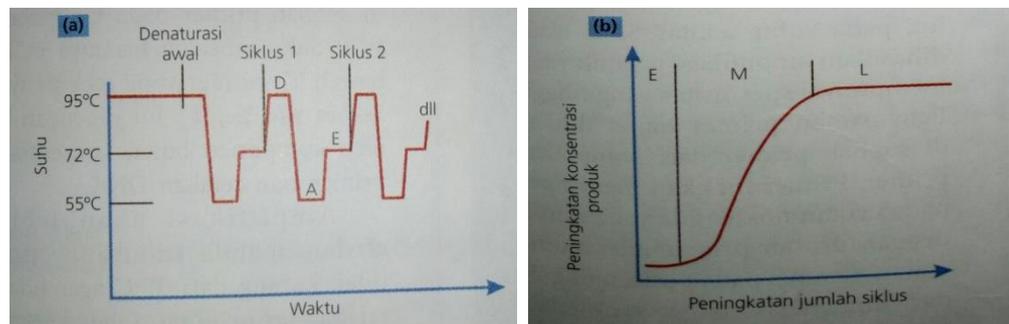
2.5.1 Prinsip kerja PCR

Dasar Siklus PCR ada 30 – 35 siklus, meliputi :

a. Denaturasi untai ganda DNA

Denaturasi untai ganda DNA merupakan langkah yang kritis selama proses PCR. Suhu yang tinggi pada awal proses menyebabkan pemisahan untai ganda

DNA. Suhu pada tahap denaturasi adalah pada kisaran 92 - 95°C, dengan suhu 94°C merupakan pilihan standar (Fatchiyah dkk., 2011)



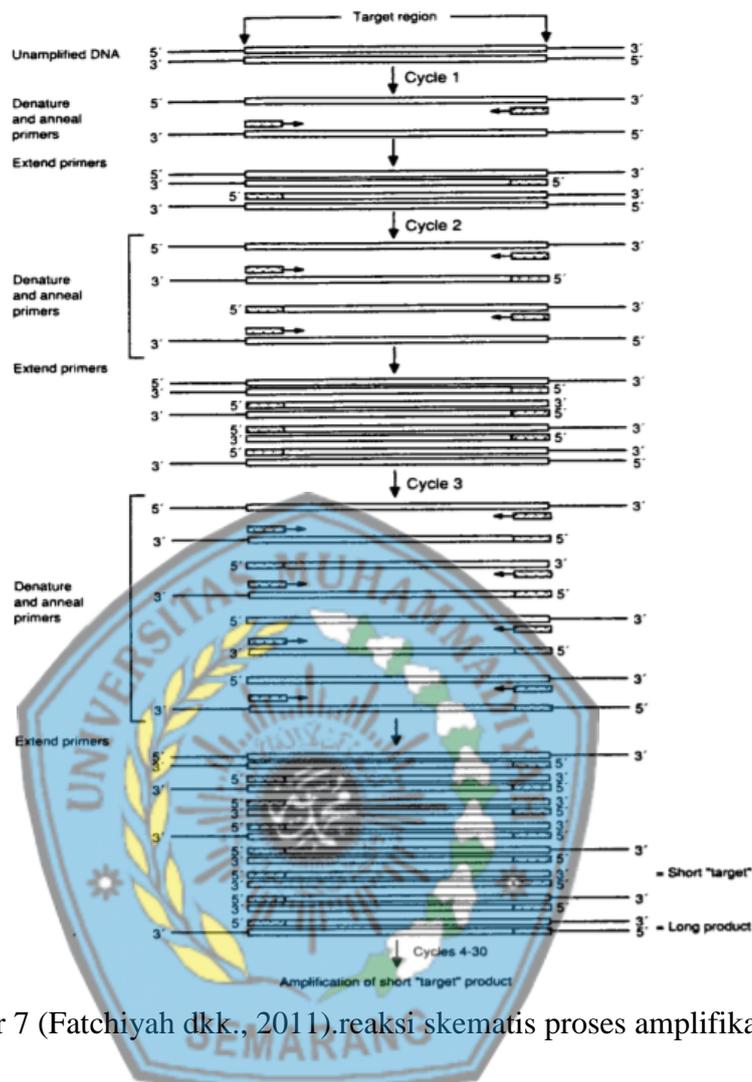
Gambar 6 (Fatchiyah dkk., 2011). (a) siklus dasar PCR. (b) kenaikan hasil amplifikasi

Suhu denaturasi yang tinggi membutuhkan kandungan yang GC yang tinggi dari cetakan DNA, tetapi waktu paruh dari Taq DNA polimerase menekan secara tajam pada suhu sekitar 37°C (Fatchiyah dkk., 2011).

b. Primer Annealing

Primer annealing merupakan pengenalan suatu primer terhadap DNA target tergantung pada panjang untai, banyaknya kandungan GC, dan konsentrasi primer itu sendiri. Optimalisasi suhu annealing dimulai dengan menghitung *melting temperature* dari ikatan primer dan setakan DNA (Fatchiyah dkk., 2011).

Amplifikasi akan lebih efisien apabila suhu annealing tidak kurang dari 37°C agar tidak terjadi *mispriming*. Oleh karena itu, pada suhu sekitar 55°C akan dihasilkan amplifikasi produk yang mempunyai spesifisitas yang tinggi. Primer akan menempel pada urutan nukleotida yang sesuai dengan urutan primer itu sendiri, dan menempel pada posisi ujung -5' dari untai DNA target yang telah terurai pada proses sebelumnya (Fatchiyah dkk., 2011).



Gambar 7 (Fatchiyah dkk., 2011).reaksi skematis proses amplifikasi.

c. Ekstensi pita DNA dengan DNA polimerase

Pada tahap ekstensi ini terjadi proses pemanjangan untai baru DNA, dimulai dari posisi primer yang telah menempel di urutan basa nukleotida DNA target yang akan bergerak dari ujung-5' menuju ujung-3' dari untai tunggal DNA. Proses pemanjangan ini atau pembacaan informasi DNA yang diinginkan sesuai dengan panjang urutan basa nukleotidayang ditargetkan (Fatchiyah dkk., 2011).

2.5.2 Komponen PCR

Komponen PCR yang diperlukan dalam reaksi PCR, meliputi :

a. Cetakana DNA

Ukuran target amplifikasi biasanya kurang dari 1000 pasangan basa (bp). Hasil amplifikasi yang efisien adalah antara 100 – 400 bp atau 1 kB. Walaupun kemungkinan hasil amplifikasi lebih dari 1 kB, tetapi prosesnya kurang efisien, karena produk yang panjang rentan terhadap inhibitor yang mempengaruhi kerja enzim DNA polimerase, dan waktu yang diperlukan lebih lama. Hal ini dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak diinginkan (Fatchiyah dkk., 2011).

b. Primer

Primer disusun dari urutan nukleotida yang dapat didownload dari pusat GenaBank dan dapat disintesis berdasarkan susunan nukleotida yang sudah tersusun dan kita tentukan. Ketentuan penyusunan primer adalah primer disusun dari urutan oligonukleotida sepanjang 15 – 32 bp pada ujung-5' pita DNA cetakan maupun komplementnya (Fatchiyah dkk., 2011).

c. *Taq* DNA polimerase

Enzim ini bersifat termostabil dan diisolat dari *Thermus aquaticus*. Aktivitas polimerasi DNA dari ujung-5' ke ujung-3', dan aktivitas enzimatik ini mempunyai waktu paruh sekitar 40 menit pada suhu 95°C. Biasanya untuk setiap 100 µL volume reaksi ditambahkan 2,0 – 2,5 unit *Taq* polimerase (Fatchiyah dkk., 2011).

Penggunaan enzim ini harus memperhatikan proses penyimpanan (selalu di freezer pada suhu -20°C, dan saat pengambilan jangan terlalu lama di suhu ruang, usahakan selalu dalam kotak berisi *water – ice* (potongan es diberi air sedikit agar

suhu tetap 4°C). Hal ini dilakukan untuk meminimalkan kerusakan enzim yang mungkin terjadi akibat pengaruh perubahan suhu (Fatchiyah dkk., 2011).

d. Bufer PCR dan konsentrasi Mg^{2+}

Bufer standar untuk PCR tersusun atas 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8,3) , dan 1,5 mM $MgCl_2$. Bufer standar ini akan bekerja dengan baik untuk cetakan DNA dan primer dengan kondisi tertentu, tetapi mungkin tidak optimal dengan kombinasi yang lain (Fatchiyah dkk., 2011).

e. Nukleotida (dNTP)

Konsentrasi yang biasanya digunakan untuk setiap dNTP adalah 200 μ M. Pada konsentrasi ini, penting untuk mengatur konsentrasi keempat dNTP pada titik estimasi K_m yaitu untuk setiap dNTP 50 μ M, harus selalu diatur pH 7,0. Konsentrasi yang tinggi akan menimbulkan ketidakseimbangan dengan enzim polimerase, sedangkan pada konsentrasi rendah akan memberikan ketepatan dan spesifitas yang tinggi tanpa mereduksi hasil akhir. Total konsentrasi dNTP dan ion saling terkait dan tidak akan mengubah secara bebas.

2.6 Gel Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu cara untuk memisahkan fraksi – fraksi campuran berdasarkan atas pergerakan partikel – partikel koloid yang bermuatan, dibawah pengaruh medan listrik. Cara elektroforesis banyak digunakan untuk analisa asam nukleat, virus, enzim dan protein (Bintang, 2010).

Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang

digunakan. Gel poliakrilamid merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk memisahkan protein (Fatchiyah, 2011).

Alberts *et al* (2002) dalam Hidayat (2015) menyatakan bahwa *Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan elektroforesis gel untuk memisahkan molekul protein dengan metode *two-dimensional gel electrophoresis* yaitu menggunakan 2 macam gel dengan masing – masing buffer yang berbeda. Gel yang digunakan pada SDS – PAGE adalah *running gel* dan *stacking gel*.

Protein dalam larutan membawa muatan elektrik tertentu pada semua nilai pH kecuali pada titik isoelektriknya sehingga protein dapat bermigrasi dalam suatu daerah elektrik. Elektroforesis gel memisahkan protein dengan lebih baik dibandingkan dengan elektroforesis didalam larutan bebas. Gel tersebut memisahkan protein dengan matriks yang mirip jala dengan variasi ukuran pori. Pemisahan dapat dioptimasi dengan mengubah derajat *cross – linking* gel. Pada sebagian besar aplikasi, gel dijalankan dengan nilai pH netral atau sedikit basa, dimana sebagian besar protein bermigrasi ke arah anoda. Sistem gel dapat meminimalisasi konveksi dan difusi protein sehingga pada gel akan terpisah dan terlihat jelas (Rybicki dan Purves, 2008).

2.7 Sekuensing DNA

Metode sekuensing telah mengalami perkembangan yang cukup pesat. Perkembangan teknologi saat ini telah memungkinkan dilakukannya analisis terhadap jutaan sekuens DNA per tahun. Kualitas analisis sekuensing sangat

tergantung pada faktor kecepatan prosedur kerja dan teknologi yang digunakan (Rinanda, 2011).

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan nukleotida pada suatu fragmen DNA atau RNA. Pada dasarnya ada dua metode yang digunakan yaitu metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger yang keduanya diperkenalkan pada tahun 1977 (Muliani, 2016).

Muladno (2002) dalam Muliani (2016) menyatakan Metode *Maxam-Gilbert* ini melibatkan proses degradasi kimiawi terhadap fragmen DNA yang akan disekuens. Fragmen DNA yang telah dilabel radioaktif, pada salah satu ujungnya dipotong tak sempurna dalam empat reaksi kimia yang terpisah. Keberhasilan mensekuens DNA dengan metode ini ditentukan kespesifikan reaksi pemotongan yang dilakukan dua tahap yaitu basa tertentu mengalami modifikasi kimiawi dan basa yang telah termodifikasi tersebut dihilangkan dari gugusan gula dan ikatan fosfodiester 5' dan 3' tersebut dipotong.

Metode *Sanger* berbeda dengan metode *Maxam-Gilbert*, metode ini menggunakan pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentiannya sintesis tersebut pada basa tertentu. Metode yang sering digunakan yaitu metode *Sanger* (Muliani, 2016).

Suryanto(2008) dalam Muliani (2016) mengatakan teknik ini berkembang setelah orang menciptakan mesin *DNA sequencer*. Pada prinsipnya keanekaragaman dapat dilihat dari urutan atau sekuen DNA dari fragmen tertentu dari suatu genom organisme. Sekuensing DNA akan menghasilkan sekuen DNA yang digambarkan sebagai untaian abjad lambang nukleotida penyusun DNA.

2.8 Kerangka Teori

