

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tempe

2.1.1 Definisi Tempe

Tempe adalah makanan tradisional yang dihasilkan dari fermentasi biji kedelai atau beberapa bahan lainnya. Fermentasi menggunakan beberapa jenis kapang *Rhizopus*, seperti *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, dan beberapa jenis kapang *Rhizopus* lainnya (PUSIDO, 2012). Dimana pada proses fermentasi akan terjadi hidrolisis senyawa-senyawa kompleks menjadi sederhana, sehingga baik untuk dicerna. Tempe merupakan makanan yang kaya akan serat pangan, kalsium, vitamin B, dan zat besi (Cahyadi, 2007). Tempe selain sebagai alternatif untuk mencukupi kebutuhan protein, juga memiliki nilai obat seperti antibiotika untuk menyembuhkan infeksi, antioksidan untuk menangkap radikal bebas.

Menurut Haryoko (2009) dalam (Dewi & Aziz, 2011), secara umum tempe berwarna putih, dikarenakan pertumbuhan miselia kapang yang merekatkan biji-biji kedelai sehingga terbentuk tekstur yang memadat.

2.1.2 Tempe Gembus

Tempe gembus terbuat dari ampas tahu, dan memiliki tekstur yang lembut dan berwarna putih. Tempe gembus merupakan pangan fermentasi pada pembuatan tempe kedelai, yaitu *Rhizopus* sp. Komposisi zat gizi tempe gembus mirip dengan tempe kedele meskipun kadarnya lebih kecil, dan memiliki

kandungan serat yang dapat mempengaruhi kadar lipid dalam darah (Sulchan & Endang 2007).



Gambar 1. Tempe Gembus
(Sumber: Endang, 2017)

2.1.3 Kandungan Gizi Tempe Gembus

Kandungan gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah dibanding kedelai. Karena adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe, maka protein, lemak, dan karbohidrat pada tempe menjadi lebih mudah dicerna di dalam tubuh dibandingkan yang terdapat dalam kedelai (Yudana, 2003). Kandungan gizi tempe dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Gizi Tempe Per 100 Gram

Kandungan Gizi	Jumlah	Satuan
Kalori	149	Kalori
Protein	18,3	Gram
Lemak	4	Gram
Karbohidrat	12,7	Gram
Kalsium	129	Miligram
Besi	10	Miligram
Vitamin A	50	Miligram
Vitamin B	0,17	Milligram

Sumber : Sutomo (2008)

Tempe juga memiliki kandungan lain, diantaranya ialah :

a. Asam Lemak

Selama dalam proses fermentasi tempe, terdapat tendensi peningkatan derajat ketidak-jenuhan terhadap lemak. Sehingga asam lemak tidak jenuh majemuk *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFA) pada tempe jumlahnya meningkat. Akan tetapi dalam proses ini asam linoleat dan asam palmitat mengalami degradasi, dan peningkatan juga terjadi pada asam oleat dan linolenat (linolenat tidak terdapat pada kedelai, hanya pada tempe). Asam lemak tidak jenuh ini memiliki efek hipokolesterolemik, sehingga mampu menetralkan efek negatif sterol di dalam tubuh (Astawan, 2008).

b. Vitamin

Menurut Dwinaningsih (2010) dalam (Dewi & Aziz, 2011), kelompok vitamin yang terdapat di dalam tempe terdiri atas dua jenis. Yaitu yang larut di dalam air (Vitamin B kompleks) dan larut lemak (Vitamin A, D, E, dan K). Tempe memiliki sumber vitamin B yang potensial. Jenis vitamin tersebut ialah, Vitamin B1 (Tiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), asam pantotenat, asam nikotinat (Niasin), Vitamin B6 (Piridoksin), dan Vitamin B12 (Sianokobalamin). Tempe merupakan satu-satunya sumber nabati yang memiliki kandungan B12. Selama proses fermentasi dalam pembuatan tempe, terjadi peningkatan Vitamin B12 yaitu 33 kali lebih banyak dibandingkan kedelai, Riboflavin (Vitamin B2) meningkat 8-47 kali, piridoksin (Vitamin B6) meningkat 4-14 kali lebih banyak dibanding kedelai. Niasin meningkat 2-5 kali, biotin mengalami peningkatan sebesar 2-3,

asam folat 4-5 kali, dan asam pantotenat hanya meningkat 2 kali lipat dibanding dari kandungan kedelai sebelum difermentasi.

c. Mineral

Menurut penelitian LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia), tempe memiliki kandungan mineral yang baik. Berupa mineral makro dan mikro dalam jumlah cukup. Jumlah mineral besi, zink, dan tembaga berturut-turut adalah 9,39, 8,05, dan 2,87 mg setiap 100 gram tempe yang dikonsumsi. Kapang yang ada dalam tempe mengandung enzim fitase yang mampu menguraikan asam fitat (pengikat mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat menjadikan mineral-mineral seperti zink, besi, maupun tembaga menjadi lebih siap untuk dimanfaatkan oleh tubuh (Muji et al, 2011).

d. Antioksidan

Di dalam tempe ditemukan suatu zat anti oksidan berupa Isoflavon. Seperti antioksidan lain, isoflavon diperlukan sebagai penghenti pembentukan radikal bebas. Isoflavon yang terkandung adalah daidzein, glisitein, dan genistein. Selain itu, tempe memiliki isoflavon terkuat dibanding isoflavon kedelai, yaitu antioksidan faktor II (6,7,4 trihidroksi isoflavon). Antioksidan tercipta selama proses fermentasi. Yang dihasilkan dari fermentasi bakteri *Micrococcus luteus*, dan *Coreyne bacterium* (Muji et al, 2011).

2.1.4 Manfaat Tempe

Manfaat dari tempe gembus ialah sebagai berikut :

- a. Kandungan zat besi, flavonoid yang bersifat antioksidan sehingga mampu untuk menurunkan tekanan darah (Amani et al, 2014).

- b. Kandungan kalsium yang tinggi, sehingga mampu untuk mencegah terjadinya osteoporosis (Yoo et al, 2014).
- c. Menanggulangi anemia. Anemia ditandai dengan penurunan kadar haemoglobin darah dikarenakan kurangnya zat besi (Fe), Tembaga (Cu), Seng (Zn), protein, asam folat dan vitamin B12. Dimana kandungan ini terdapat pada tempe (Sulastri & Keswani, 2009).
- d. Antioksidan tinggi, sehingga bisa mencegah terjadinya kanker dan juga proses penuaan dini (Muji et al, 2011).
- e. Bersifat hipokolesterolemik, kandungan asam lemak jenuh ganda pada tempe mampu untuk menurunkan kadar kolesterol tubuh (Hassan et al, 2014).
- f. Kandungan superoksida dismutase yang dapat mengendalikan radikal bebas, sehingga baik bagi penderita kelainan jantung (D'Adamo et al, 2015).
- g. Mencukupi kebutuhan gizi seimbang sehari-hari (Liputo et al, 2013).
- h. Kapang tempe *Rhizopus sp* bersifat sebagai antibacterial atau antibiotika, sehingga mampu untuk mengurangi terjadinya infeksi (Sartika, 2009).

2.1.5 Khasiat Tempe Untuk Kesehatan

Salah satu penyebab berkhasiatnya tempe untuk kesehatan adalah karena kapang *Rhizopus sp* yang digunakan dalam proses pembuatannya dapat memproduksi enzim. Enzim yang diproduksi berupa lipase, protease, dan amilase, yang masing-masing berguna untuk pencernaan lemak, protein, dan karbohidrat. Enzim-enzim tersebut sangat membantu proses pencernaan makanan di dalam tubuh. Pengamatan pada penderita yang mengalami kekurangan enzim pencernaan di dalam tubuhnya dan harus mengonsumsi enzim sebagai obat, ternyata

ketergantungan terhadap enzim dapat dihilangkan setelah secara rutin mengonsumsi makanan formula tempe.

2.1.7 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.

Menurut SNI 3144:2009 menetapkan mengenai syarat mutu tempe, dengan perincian tertera pada tabel 3.

Tabel 3. Syarat Mutu Tempa

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</i> sp.	-	Negatif

(Sumber : Badan Standardisasi nasional, 2012)

2.2 Bakteri

Bakteri merupakan organisme uniseluler yang relative sederhana, karena materi genetic tidak diselubungi oleh selaput membrane terdiri atas dua bentuk yaitu batang dan bulat. Dinding sel bakteri mengandung kompleks karbohidrat dan protein yang disebut peptidoglikan. Bakteri umumnya bereproduksi dengan cara membelah diri menjadi dua sel yang berukuran sama, ini disebut dengan pembelahan biner. Bakteri umumnya menggunakan bahan kimia organik yang dapat diperoleh secara alami dari organisme hidup atau organism yang sudah mati. Beberapa bakteri dapat membuat makanan sendiri dengan proses biosintesis, sedangkan bakteri lain memperoleh nutrisi dari substansi organik (Arta, 2012).

Bakteri proteolitik adalah bakteri yang memproduksi enzim protease ekstraseluler, yaitu enzim pemecah protein yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel. Semua bakteri mempunyai enzim protease di dalam sel, tetapi tidak semua mempunyai enzim protease ekstraseluler.

Bakteri proteolitik dapat digolongkan menjadi beberapa kelompok :

1. Bakteri aerobik atau anaerobic fakultatif, tidak membentuk spora. Misalnya, *Pseudomonas* dan *proteus*.
2. Bakteri aerobik atau anaerobik fakultatif, membentuk spora. Misalnya, *Bacillus*.
3. Bakteri anaerobik pembentuk spora. Misalnya sebagai spesies *Clostridium* (Yusmarini, 2009).

2.3 Enzim protease

Enzim protease disebut juga peptidase atau proteinase, yang merupakan enzim golongan hidrolase yang akan memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Perannya dalam tubuh antara lain, membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intra seluler, dan koagulasi sel darah.

Berdasarkan dari lingkungan daya kerjanya, protease dapat dikelompokkan menjadi protease netral, asam, dan alkali. Enzim protease netral merupakan enzim yang aktif pada pH netral. Enzim protease merupakan salah satu enzim komersial yang mempunyai nilai ekonomis tinggi karena mampu menguasai 59% dari total penjualan enzim dengan nilai mencapai 200 juta US\$ pertahun, dan memiliki peranan penting dalam industri pangan maupun non pangan. Contohnya dalam industri pangan seperti industri bir, daging, dan keju sedangkan dalam industri non pangan seperti detergen, kulit, farmasi, dan lain-lain. Beberapa enzim protease komersial yang banyak dikenal adalah papain dari pepaya dan bromelin dari nanas yang biasanya digunakan untuk pengempuk daging (Rahayu, 2007).

Enzim protease diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu :

1. Enopeptidase

Enzim ini dapat memecah protein pada tempat-tempat tertentu dalam molekul protein dan biasanya tidak mempengaruhi gugus yang terletak di ujung

molekul. Sebagai contoh endopeptidase ialah enzim pepsin yang terdapat dalam usus halus dan enzim papain yang terdapat dalam papaya.

2. Eksopeptidase

Eksopeptidase bekerja terhadap kedua ujung molekul protein. Karboksipeptidase dapat melepaskan asam amino yang memiliki gugus –COOH bebas pada molekul protein, sedangkan aminopeptidase dapat melepaskan asam amino pada ujung lain yang memiliki gugus –NH₂ bebas. Dengan demikian eksopeptidase dimulai dari asam amino ujung pada molekul protein hingga seluruh molekul pecah menjadi asam amino (Fatoni dkk, 2008).

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 Identifikasi 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.

2.4.3 Identifikasi Molekuler

Saat ini dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen rRNA. Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (*conserved*). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan, sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas organisme tersebut. Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Perbandingan sekuens rDNA dapat menunjukkan hubungan evolusi antar organisme.

Sebagian besar prokariot memiliki 3 jenis rRNA, yaitu 5S, 16S, dan 23S. Penggunaan 5S rRNA juga sudah dipelajari namun gen ini terlalu kecil untuk digunakan dalam penentuan filogenetik. Gen 16S dan 23S rRNA memiliki ukuran yang cukup untuk dianalisis. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa, di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan *hypervariable region*. Daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuens akan mengenali daerah yang lestari dan mengamplifikasi *hypervariable region*, dengan demikian akan diperoleh sekuens yang khas pada organisme tersebut (Rinanda, 2016).

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR), merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Metode ini dikembangkan pertama kali oleh Kary B. Mulis pada tahun 1985. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetic. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitas molekul mRNA (Handoyo & Rudiretna, 2009).

Dengan menggunakan metode PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10⁶-10⁷ kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh 2ⁿ kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target. Metode PCR dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah yang sangat sedikit, misalnya DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 µg, oligonuklotida yang digunakan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 µl. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipat gandakan suatu sekuens DNA dalam genom bakteri. PCR adalah reaksi polimerase berantai, yaitu reaksi yang melibatkan enzim polimerase yang dilakukan secara berulang-ulang.

Yang diulang-ulang adalah proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, hibridisasi primer untuk mengawali replikasi DNA dilanjutkan dengan proses penambahan basa pada cetakan DNA oleh enzim polimerase, untuk melakukan kegiatan ini dibutuhkan tabung PCR yang bersifat reponsif dengan perubahan suhu dan mesin thermal cycler, suatu mesin yang mampu menaikkan dan menurunkan suhu dengan cepat, dan bahan-bahan untuk membuat reaksi PCR.

2.5.1 Tahapan-tahapan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Proses PCR terdiri dari tiga tahapan, yaitu denaturasi DNA templat, penempelan (*annealing*) primer, dan polimerisasi (*extension*) rantai DNA. Denaturasi merupakan proses pemisahan utas ganda DNA menjadi dua utas tunggal DNA yang menjadi cetakan (templat) sebagai tempat penempelan primer dan tempat kerja DNA polimerase, dengan pemanasan singkat pada suhu 90-95°C selama beberapa menit.

Penjelasan ringkas tentang setiap siklus reaksi PCR adalah sebagai berikut:

1. Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusannya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90 °C – 95 °C.

2. Penempelan Primer.

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini,

ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu $50^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya, DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya misalnya pada 72°C .

3. Reaksi Polimerisasi (*Extension*)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72°C . Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polimerase. Jika siklus dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan di amplifikasi secara eksponensial (disebut ampikon yang berupa untai ganda), sehingga mencapai jumlah copy yang dapat dirumuskan dengan $(2n)^x$. Dimana n adalah jumlah siklus dan x adalah jumlah awal molekul DNA. Jadi, seandainya ada 1 copy DNA sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial. PCR dengan menggunakan enzim Taq DNA polimerase pada akhir dari setiap siklus akan menyebabkan penambahan satu nukleotida A pada ujung 3' dari potongan DNA yang dihasilkan. Sehingga nantinya produk PCR ini dapat di kloning dengan menggunakan vektor yang ditambahkan nukleotida T pada ujung-ujung 5'-nya. Proses PCR dilakukan menggunakan suatu alat yang disebut thermocycler.

Selain ketiga proses tersebut, secara umum PCR didahului dan diakhiri oleh tahapan berikut:

1. Pradenaturasi

Pradenaturasi selama 1-9 menit di awal reaksi dilakukan untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA Polymerase (jenis hot-start alias baru aktif kalau dipanaskan terlebih dahulu).

2. Final Elongasi

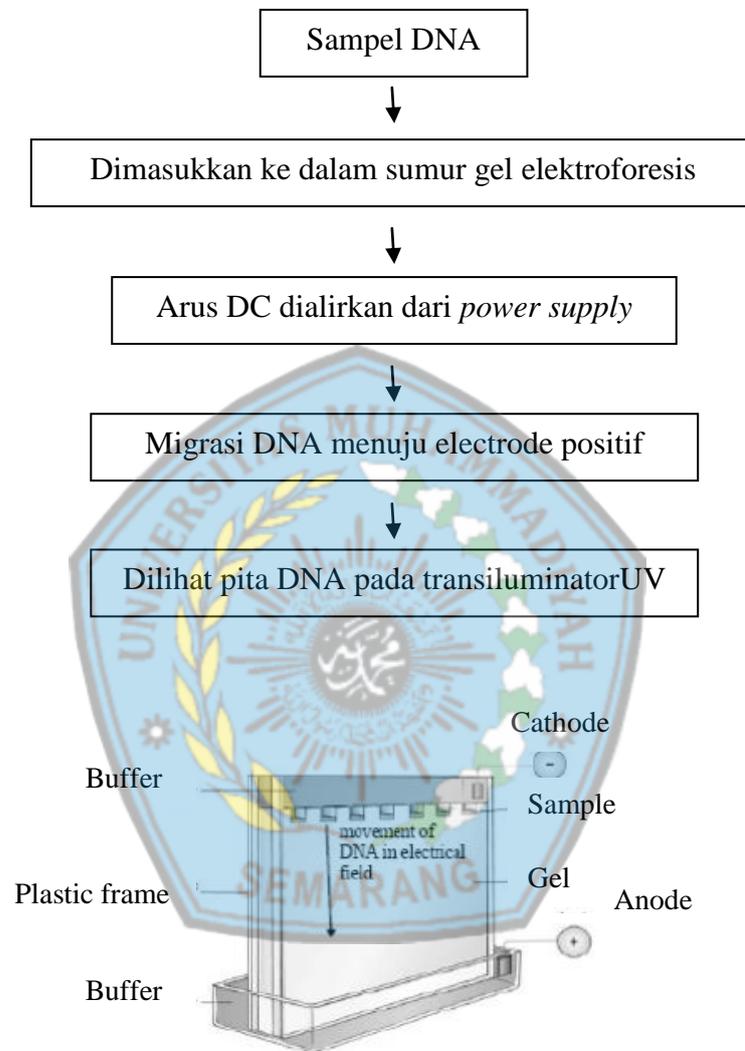
Final Elongasi dilakukan pada suhu optimum enzim ($70-72^{\circ}\text{C}$) selama 5-15 menit untuk memastikan bahwa setiap utas tunggal yang tersisa sudah diperpanjang secara sempurna. Proses ini dilakukan setelah siklus PCR terakhir.

2.6 Gel Elektroforesis

Gel elektroforesis merupakan suatu teknik analisis penting dan sangat sering dipakai dalam bidang biokimia dan biologi molekuler. Secara prinsip, teknik ini mirip dengan kromatografi yaitu memisahkan campuran bahan-bahan berdasarkan sifatnya. Dalam gel elektroforesis, pemisahan dilakukan terhadap campuran bahan dengan muatan listrik yang berbeda-beda.

Dalam gel elektroforesis terdapat dua material dasar yang disebut fase diam dan fase bergerak (eluen). Fase diam berfungsi menyaring onjek yang akan dipisah, sementara fase bergerak berfungsi membawa objek yang akan dipisah. Pada fase bergerak ditambahkan larutan penyangga untuk menjaga kestabilan objek gel elektroforesis. Zat yang akan dielektroforesis dimuat pada kolom-kolom (well atau sumur). Apabila aliran listrik diberikan, terjadi aliran electron dan zat

objek akan bergerak dari elektrode negative kearah sisi elektrode positif. Kecepatan pergerakan ini berbeda-beda, tergantung dari muatan dan berat molekul DNA (Handoyo, 2009).



Gambar 2. Bagan kerja gel elektroforesis
(Sumber : Handoyo, 2009)

2.7 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling mendasar suatu

gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuensnya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui.

Langkah analisis sekuensing dimulai dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri, baik kultur padat maupun cair. DNA yang diperoleh akan dijadikan sebagai cetakan dalam tahap amplifikasi dengan PCR. Primer yang digunakan dalam PCR adalah primer 16S rRNA yang bersifat universal berukuran sekitar 1500 pb, sehingga dapat mengamplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri. Produk PCR dimurnikan terlebih dahulu dengan menggunakan kit komersial untuk menghilangkan sisa-sisa primer serta fragmen nukleotida (Darmawati dkk., 2014).

Produk PCR yang telah dimurnikan ditentukan urutan nukleotidanya dengan metode sekuensing. Pada tahap sekuensing produk PCR dengan ukuran tertentu digunakan sebagai cetakan. Primer pada tahap PCR juga digunakan dalam sekuensing, hanya saja masing-masing primer digunakan secara terpisah dalam satu siklus sekuensing (*forward* saja atau *reverse* saja). Berbeda dengan PCR, produk yang dihasilkan dari sekuensing memiliki ukuran yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan karena pada sekuensing ditambahkan ddNTP (*di-deoxyribonuclease Triphosphat*) atau dNTP terminator yang dilabel dengan zat warna. Terminator ini pada satu siklus akan berikatan secara acak dan menghentikan proses pembacaan. Pada tiap basa terminator (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau ddTTP), terdapat zat warna fluoresen yang dapat menyerap panjang

gelombang yang berbeda sehingga basa terminator akan dapat dibaca dengan fluorometri.

Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer *reverse* dan *forward* dan umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (*consensus sequence*). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database menggunakan software tertentu. Beberapa sistem dapat menentukan urutan nukleotida melalui pembacaan satu primer, namun pembacaan dengan dua primer memberikan hasil yang lebih akurat.

2.7.1 Sekuensing 16S rRNA

Identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi secara konvensional dilakukan melalui metode pembiakan dan dilanjutkan dengan pemeriksaan karakteristik fisiologis dan biokimia. Metode ini membutuhkan waktu yang lebih lama. Terlebih lagi pada beberapa mikroorganisme yang sulit untuk dibiakkan seperti *mycobacterium* dan virus tertentu. Saat ini 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*/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan Svedberg, yaitu satuan ukuran ribosom). Gen 16S rRNA juga sering disebut sebagai 16S rDNA (16S *ribosomal deoxyribose nucleatic acid*) namun menurut konsensus dari *American Society for Microbiology* (ASM), istilah 16S rRNA dinilai lebih tepat (Rinanda, 2016).

Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (conserved). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik

berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuen yang menjadi ciri khas organisme tersebut. Daerah yang lestari ini juga yang menyebabkan gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing. Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Perbandingan sekuens rDNA dapat menunjukkan hubungan evolusi antar organisme. Penggunaan sekuens 16S rRNA dipelopori oleh Carl Woese, yang juga menemukan klasifikasi 3 domain terbesar makhluk hidup, yaitu bakteri, archaea dan eukaria.

Gen 16S rRNA memiliki ukuran yang cukup untuk dianalisis. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan *hypervariable region*. Daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme. Gen 16S rRNA adalah salah satu gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme. Ribuan sekuens dari berbagai isolat klinis dan dari lingkungan telah terkumpul di satu database yaitu *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

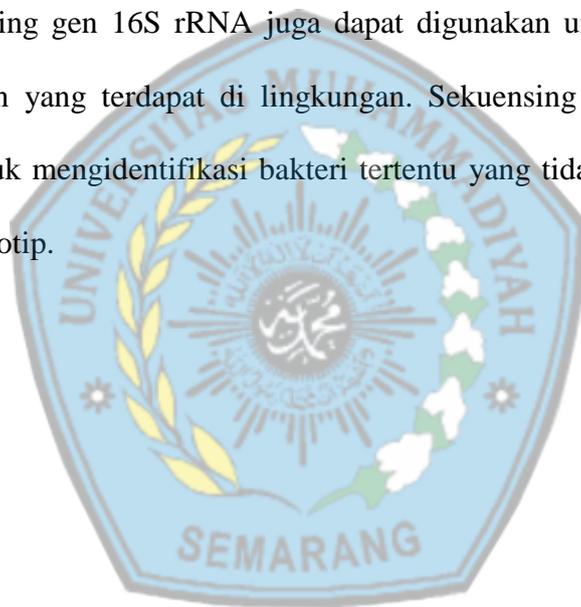
Perkembangan identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi dengan metode berbasis molekuler memberikan kontribusi yang sangat penting di bidang mikrobiologi. Identifikasi dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA dinilai

memberikan hasil yang sangat akurat dan dapat dijadikan sebagai metode diagnosis dalam aplikasi klinis. Analisis sekuensing dinilai dapat menjawab berbagai permasalahan yang berkaitan dengan identifikasi berbasis mikrobiologi konvensional. Dalam mikrobiologi konvensional, identifikasi dilakukan dengan mengisolasi mikroorganisme tersebut dari spesimen klinis, lalu mengamati karakteristik fenotipiknya. Metode ini memiliki beberapa kelemahan, yaitu tidak dapat digunakan pada mikroorganisme yang tidak dapat dikultur serta menunjukkan hasil uji biokimia yang tidak dapat digolongkan pada genus atau spesies tertentu (secara fenotipik membingungkan atau belum pernah ditemukan sebelumnya).

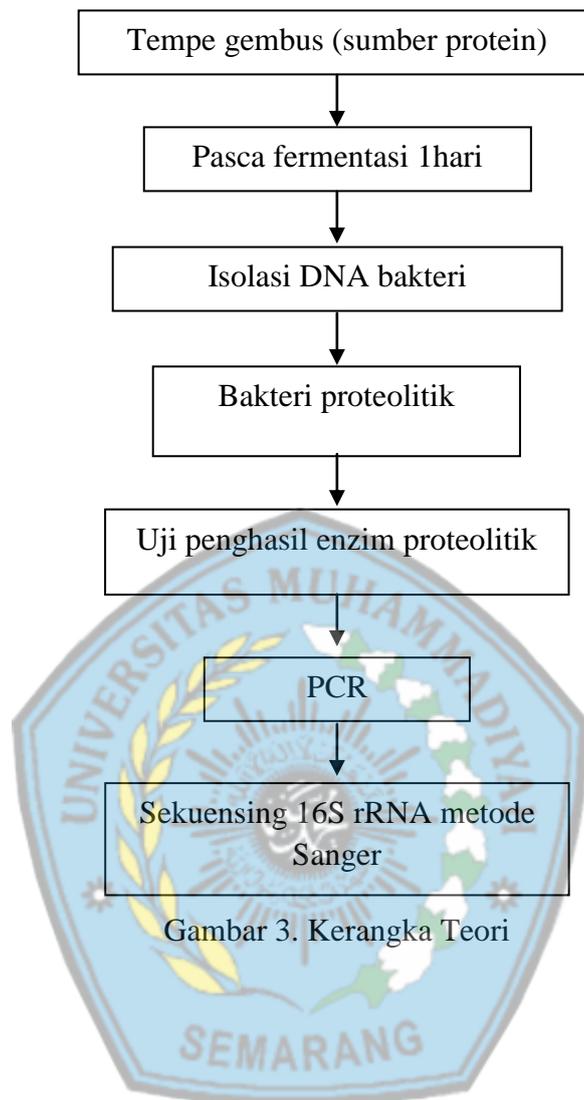
Pada isolat berasal dari saluran nafas, mikrobiologi konvensional membutuhkan waktu lama, tidak dapat membedakan infeksi dan kolonisasi serta dapat dipengaruhi oleh pemberian antibiotik. Dari segi waktu, analisis sekuensing memiliki keunggulan karena dapat dilakukan dalam waktu singkat. Analisis sekuensing gen 16S rRNA saat ini sudah banyak digunakan, terutama di bidang penelitian. Pemakaian di bidang klinis sebagai prosedur diagnostik memang belum banyak digunakan terkait dengan biaya pemeriksaan yang mahal. Namun tidak dapat dipungkiri bahwa tuntutan akan suatu metode diagnostik dengan tingkat spesifisitas dan sensitivitas tinggi, cepat dan akurat mengharuskan adanya aplikasi berbasis molekuler ini dalam identifikasi berbagai sampel klinis.

Nolte (2008) menyatakan bahwa untuk mengidentifikasi bakteri yang berasal dari saluran pernafasan, metode mikrobiologi konvensional dinilai kurang akurat sehingga tidak lagi dimasukkan dalam pedoman penatalaksanaan. Metode

identifikasi berbasis molekuler dengan amplifikasi asam nukleat dan sekuensing menunjukkan keunggulan dari segi waktu, sensitivitas dan akurasi yang lebih baik. Lau et al (2004) juga menggunakan analisis sekuensing gen 16S rRNA untuk mengidentifikasi *Arcobacter* dari penderita apendisitis akut gangrenosa. *Arcobacter* adalah bakteri Gram negatif yang sulit untuk diidentifikasi melalui karakteristik fenotip. Kuppeveld et al (1992) menggunakan sekuensing 16S rRNA untuk menentukan spesies *Mycoplasma* yang secara klinis sulit serta membutuhkan waktu lama untuk ditumbuhkan/dikultivasi. Selain dari isolat klinis, sekuensing gen 16S rRNA juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri patogen yang terdapat di lingkungan. Sekuensing gen 16S rRNA juga digunakan untuk mengidentifikasi bakteri tertentu yang tidak dapat diidentifikasi lagi secara fenotip.



2.8 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori