

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tempe

Tempe adalah produk fermentasi yang amat dikenal oleh masyarakat Indonesia dan mulai di gemari pula oleh berbagai kelompok masyarakat Barat. Tempe dapat dibuat dari berbagai bahan. Namun demikian yang biasa dikenal sebagai tempe oleh masyarakat pada umumnya ialah tempe yang dibuat dari kedelai. Melalui proses fermentasi, kedelai menjadi lebih enak dan meningkatkan nilai nutrisinya. Rasa dan aroma kedelai memang berubah sama sekali setelah menjadi tempe. Tempe yang masih baru (baik) memiliki rasa dan bau yang spesifik. Bau dan rasa khas tempe ini tidak mudah didiskripsikan tetapi dapat dimengerti dan dihayati bagi masyarakat yang telah lama mengenal tempe.

2.1.1 Tempe Gembus

Tempe gembus terbuat dari ampas tahu. Tempe ini memiliki tekstur yang lembut dan berwarna putih. Tempe jenis ini masih cukup mudah ditemui di pasar tradisional di beberapa daerah. Bentuk tempe gembus bulat memanjang atau persegi empat dengan ukuran yang kecil (Ramayulis, 2013).

Tempe gembus merupakan pangan fermentasi yang sangat populer dikonsumsi masyarakat lapisan bawah secara luas, terutama di Jawa Tengah. Tempe gembus dibuat dari bahan dasar ampas tahu melalui proses fermentasi oleh mikroorganisme yang sama yang digunakan pada pembuatan tempe kedelai, yaitu *Rhizopus* sp. Komposisi zat gizi tempe gembus mirip dengan tempe kedele meskipun kadarnya lebih kecil. Seperti halnya tempe kedelai,

tempe gembus diketahui mengandung zat-zat yang dapat mempengaruhi kadar lipid darah (Sulchan & Endang 2007).



Gambar 1. Tempe Gembus
(Sumber: Valentina, 2016)

2.1.2 Kandungan Gizi

Tempe berpotensi untuk digunakan melawan radikal bebas, sehingga menghambat proses penuaan dan mencegah penyakit degenerative (aterosklerosis, jantung koroner, diabetes mellitus, kanker, dan lain-lain). Selain itu tempe juga mengandung zat antibakteri penyebab diare, penurun kolesterol darah, pencegah penyakit jantung, hipertensi, dan lain-lain.

Komposisi gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah banyak dibanding kedelai. Namun, 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. Oleh karena itu, tempe sangat baik untuk diberikan kepada segala kelompok umur (dari bayi hingga lansia), sehingga bisa dibuat sebagai makanan semua umur (Ramayulis, 2013).

Pada tahun 1991, Departemen Kesehatan Republik Indonesia (sekarang Kementerian Kesehatan) juga melakukan penelitian terhadap kandungan gizi tempe. Hasil penelitian tersebut dipublikasikan dengan perincian sebagai berikut:

Tabel 2. Kandungan zat gizi tempe

Zat gizi	Satuan	Komposisi zat gizi 100 gram BDD	
		Kedelai	Tempe
Energi	(kal)	381	201
Protein	(gram)	40,4	20,8
Lemak	(gram)	16,7	8,8
Hidrat arang	(gram)	24,9	13,5
Serat	(gram)	3,2	1,4
Abu	(gram)	5,5	1,6
Kalsium	(mg)	222	155
Fosfor	(mg)	682	326
Besi	(mg)	10	4
Karotin	(mkg)	31	34
Vitamin B1	(mg)	0,52	0,19
Air	(gram)	12,7	55,3
BDD*	(%)	100	100

(Sumber : Badan Standardisasi nasional, 2012)

*BDD = Berat yang dapat dimakan

2.1.3 Nilai Gizi Tempe

Tempe, sebagai makan dengan nilai kandungan gizi yang tinggi, sudah lama diakui. Sejumlah penelitian yang diterbitkan pada tahun 1940-an sampai dengan 1960-an menyimpulkan bahwa banyak tahanan Perang Dunia II pada zaman pendudukan Jepang di Indonesia berhasil terhindar dari disentri dan busung lapar karena tempe.

Penelitian terhadap nilai gizi tempe terus dilakukan dan dari penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa tempe mengandung elemen yang berguna bagi tubuh, yakni: asam lemak, vitamin, mineral, dan antioksidan (Sartika, 2009).

a. Asam lemak

Proses fermentasi pada tempe meningkatkan derajat ketidakjenuhan terhadap lemak. Akibat proses ini, asam lemak tidak jenuh majemuk pada tempe meningkat jumlahnya. Asam lemak tidak jenuh ini mempunyai efek penurunan

terhadap kandungan kolesterol serum, sehingga dapat menetralkan efek negatif sterol di dalam tubuh (Badan Standardisasi nasional, 2012).

b. Vitamin

Dua kelompok vitamin terdapat pada tempe, yaitu larut air (vitamin B kompleks) dan larut lemak (vitamin A, D, E, dan K). Tempe merupakan sumber vitamin B yang sangat potensial. Jenis vitamin yang terkandung dalam tempe antara lain vitamin B1, B2, asam pantotenat, asam nikotinat, vitamin B6, dan B12.

Vitamin B12 umumnya terdapat pada produk-produk hewani dan tidak dijumpai pada makanan nabati (sayuran, buah-buahan, dan bijibijian), namun tempe mengandung vitamin B12 sehingga tempe menjadi satu-satunya sumber vitamin yang potensial dari bahan pangan nabati. Kenaikan kadar vitamin B12 paling mencolok pada pembuatan tempe. Kadar vitamin B12 dalam tempe berkisar antara 1,5 sampai 6,3 mikrogram per 100 gram tempe kering. Jumlah ini telah dapat mencukupi kebutuhan vitamin B12 seseorang per hari. Dengan adanya vitamin B12 pada tempe, para vegetarian tidak perlu merasa khawatir akan kekurangan vitamin B12, sepanjang mereka melibatkan tempe dalam menu hariannya.

c. Mineral

Tempe mengandung mineral makro dan mikro dalam jumlah yang cukup. Jumlah mineral besi, tembaga, dan zink. Kapang tempe dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang mengikat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat, mineral-mineral

tertentu (seperti besi, kalsium, dan magnesium) menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh (Badan Standardisasi nasional, 2012).

d. Antioksidan

Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Dalam kedelai terdapat tiga jenis isoflavon, yaitu daidzein, glisitein, dan genistein. Pada tempe, di samping ketiga jenis isoflavon tersebut juga terdapat antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coryne bacterium* (Sulastri & Keswani, 2009).

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. Lebih lanjut, Universitas Carolina Utara, Amerika Serikat, meneliti tempe dan menemukan bahwa genestein dan fitoestrogen yang terdapat pada tempe ternyata dapat mencegah kanker prostat dan payudara (Badan Standardisasi nasional, 2012).

2.1.4 Manfaat Tempe

Tempe memiliki kandungan serat tidak larut yang tinggi dan protein, tempe juga mengandung zat antioksidan berupa karoten, vitamin E, dan isoflavon.

Itulah sebabnya tempe sering disebut-sebut sebagai bahan makanan yang dapat mencegah kanker.

Adanya kandungan vitamin B12 pada tempe, dipandang sebagai yang unik oleh para ahli. Sampai saat ini penyebab atau asal vitamin itu belum diketahui dengan pasti. Ada yang menduga vitamin B12 itu berasal dari kapang yang tumbuh pada tempe, tetapi ada pula yang mengatakan berasal dari unsur lain. Vitamin B12 sangat berguna untuk membentuk sel-sel darah merah dalam tubuh sehingga dapat mencegah terjadinya penyakit anemia. Selain itu, tempe juga banyak mengandung mineral, kalium, dan fosfor (Ramayulis, 2013).

2.1.5 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 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)

2.1.6 Khasiat Tempe

Ada cukup banyak penelitian yang membuktikan bahwa tempe adalah makanan sehat. Dibanding dengan makanan lain yang terbuat dari kedelai, tempe dibuat dari sebuah susunan-susunan kedelai utuh. Berdasarkan kandungan-kandungan yang terdapat dalam tempe tersebut, tempe juga mempunyai khasiat-khasiat kesehatan sebagai berikut :

a. Untuk pertumbuhan anak

Tempe memiliki kandungan protein yang tinggi dengan nilai PER (*Protein Efficiency ratio*) yang sama dengan kasein dan susu skin, yaitu 2,45 dan 2,5 serta memiliki kandungan zink sebanyak 8,05 mg dalam 100 gram tempe, dimana kandungan gizi protein serta zink tersebut sangatlah penting untuk pertumbuhan anak di usia dini (seperti tubuh dan perkembangan otak) (Sulastri & Keswani, 2009).

b. Untuk kecerdasan otak

Zat gizi yang berperan untuk kecerdasan otak, yaitu karbohidrat (glukosa), lemak (asam lemak esensial), protein, zink, zat besi (Fe), dan vitamin B12. keistimewaan karbohidrat pada tempe adalah mudah dicerna dan diserap karena adanya enzim pencernaan amylase dan glukoamilase dengan ratio 66% dan 34%. Sedangkan untuk protein pada tempe adalah mudah diuraikan menjadi peptide dan asam amino bebas, yaitu lebih tinggi 8,5 kali dibandingkan dengan kacang kedelai. Sementara itu juga terdapat peningkatan asam lemak esensial yang

membentuk asam oleat dan linoleat yang sangat penting bagi kesehatan dan tidak dapat disintesis sendiri oleh tubuh. Kandungan *zink* pada tempe juga setara dengan sumber protein hewani dan mudah dicerna serta diserap oleh tubuh karena memiliki kandungan enzim fitase yang mengikat *zink*. Ditambah lagi juga dengan kandungan zat besi dan vitamin B12 pada tempe yang cukup tinggi dibandingkan protein hewani dan nabati terutama kacang-kacangan. Serta sudah memenuhi setengah dari kebutuhan zat besi dan vitamin B12 sehari (Tinarbuko, 2009).

c. Untuk mengatasi anemia

Tempe merupakan sumber protein dimana setiap 100 gram tempe mengandung 20,7 gram protein. Zat besi sebagian besar terdapat dalam darah sebagai bagian dari protein (hemoglobin dan mioglobin) yang berguna untuk mengatasi penyakit anemia.

d. Untuk mengatasi gangguan cerna

Untuk Mengatasi Gangguan Saluran Cerna Secara singkatnya tempe memiliki kandungan zat antimikroba aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif sehingga dapat memperbaiki gangguan pencernaan seperti kegagalan pencernaan dan absorpsi zat gizi. Masyarakat yang biasa mengonsumsi Tempe lebih jarang terkena penyakit saluran pencernaan (Tinarbuko, 2009).

e. Untuk mengatasi penyakit dislipidemia

Dislipidemia adalah kelainan metabolisme lemak yang ditandai dengan peningkatan atau penurunan fraksi lemak dalam plasma. Salah satu contoh kelainan fraksi lemak yang utama adalah kenaikan kadar kolesterol, serta meningkatnya resiko penyakit jantung akibat meningkatnya trigliserida dalam

darah. Trigliserida sendiri adalah bentuk simpanan lemak dalam tubuh yang merupakan hasil sintesa dari asam lemak dan gliserol yang dibantu dengan hormone insulin, proses ini dikenal sebagai Lipogenesis atau pembentukan lemak yang terjadi akibat masukan energi melebihi keluaran energi (Muji dkk., 2011).

Kandungan trigliserida dalam Tempe sendiri lebih rendah karena saat proses fermentasi pada tempe, terjadi penurunan Gliserida dari 22,3% menjadi 11,5%. Tempe juga mengandung Asam Linoleat, salah satu asam lemak bebas yang secara efektif mampu menurunkan trigliserida dalam darah. Asam Linoleat pada Tempe sendiri bukanlah asam lemak bebas utama sehingga lebih leluasa untuk dikonsumsi dalam jumlah banyak tanpa mengurangi manfaatnya (Tinarbuko, 2009).

f. Untuk mengatasi penuaan dini

Gizi mempunyai peran besar dalam mencegah penuaan dini. Kesimbangan asupan energi, protein dan karbohidrat dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan sebesar 40% terutama pada organ hati, otak, jantung, dan ginjal. Selanjutnya proses penuaan bisa diperlambat jika mengkonsumsi makanan yang cukup mengandung antioksidan untuk mengeliminir dan menetralkan efek radikal bebas yang terbentuk dalam jumlah yang cukup berlebihan ketika seseorang sakit.

Pada Tempe ditemukan zat anti oksidan dalam bentuk isoflavon yang mengandung senyawa bioaktif dan bertindak sebagai antioksidan yang sangat berguna bagi tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Keajaiban kandungan Isoflavon pada tempe adalah dalam bentuk bebas, yaitu

bentuk aglikon yang lebih mudah diserap oleh usus halus sebagai bagian dari misel yang dibentuk oleh empedu (Tinarbuko, 2009).

2.2 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.

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 pepaya.

2. Eksopeptidase

Eksopeptidase bekerja terhadap kedua ujung molekul protein. Karboksiptidase dapat melepaskan asam amino yang memiliki gugus -COOH bebas pada molekul protein, sedangkan aminopeptidase dapat melepaskan asam amino pada ujung lain yang memiliki gugus -NH_2 bebas. Dengan demikian eksopeptidase dimulai dari asam amino ujung pada molekul protein hingga seluruh molekul pecah menjadi asam amino (Fatoni dkk., 2008).

2.3 Bakteri

Bakteri merupakan organism uniseluler yang relatif sederhana, karena materi genetic tidak diselimuti oleh selaput membrane inti, sel bakteri disebut dengan sel prokariot. Secara umum, sel bakteri 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. Untuk nutrisi, 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).

2.3.1 Bakteri Proteolitik

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 fakultatiff, membentuk spora. Misalnya, *Bacillus*.

3. Bakteri anaerobik pembentuk spora. Misalnya sebagai spesies *Clostridium* (Yusmarini, 2009).

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. Dengan demikian setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens 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.

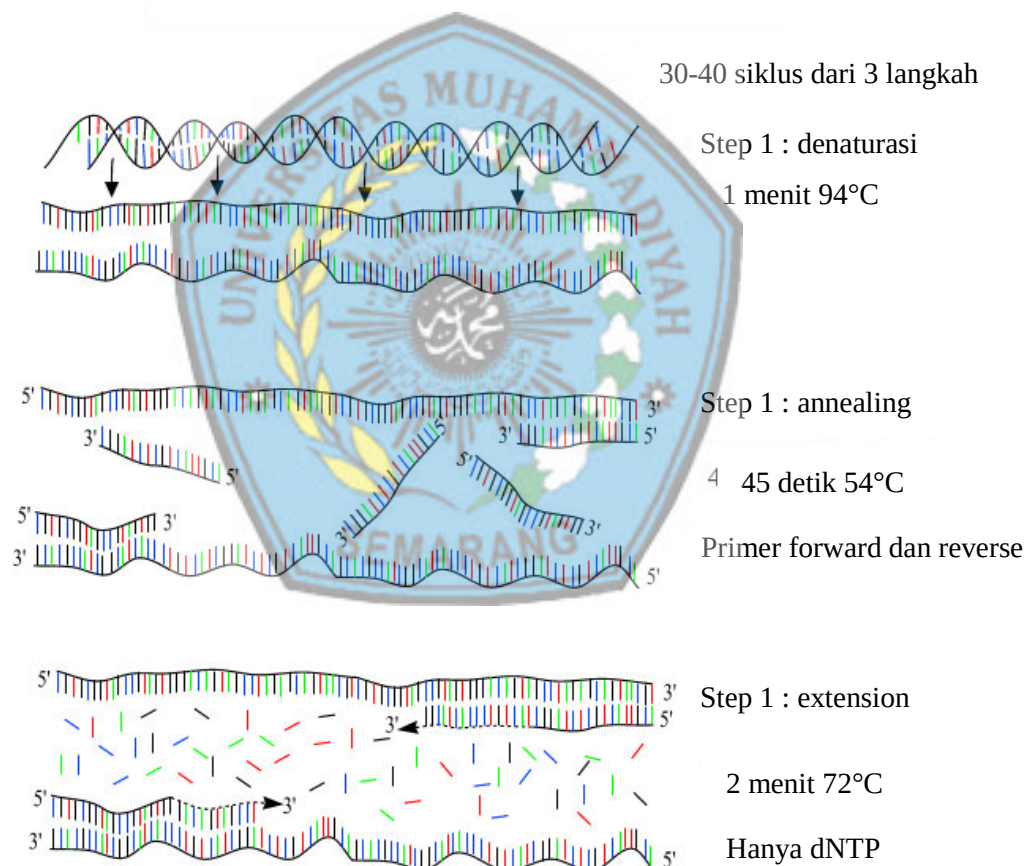
Sebagian besar prokariot memiliki 3 jenis rRNA, yaitu 5S, 16S, dan 23S. Penggunaan 5S rRNA juga sudah dipelajari namun gen ini terlalu kecil untuk digunakan dalam penentuan filogenetik. Gen 16S dan 23S rRNA memiliki ukuran yang cukup untuk dianalisis. Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1550 pasang basa dan 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)

Polymerase *chain* reaction adalah suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya. Proses tersebut mirip dengan proses replikasi DNA secara *in vivo* yang bersifat semi konservatif.

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo, 2001).

Polymerase Chain Reaction



Gambar 2. Bagan proses *polymerase chain reaction*
(Sumber : Handoyo, 2001)

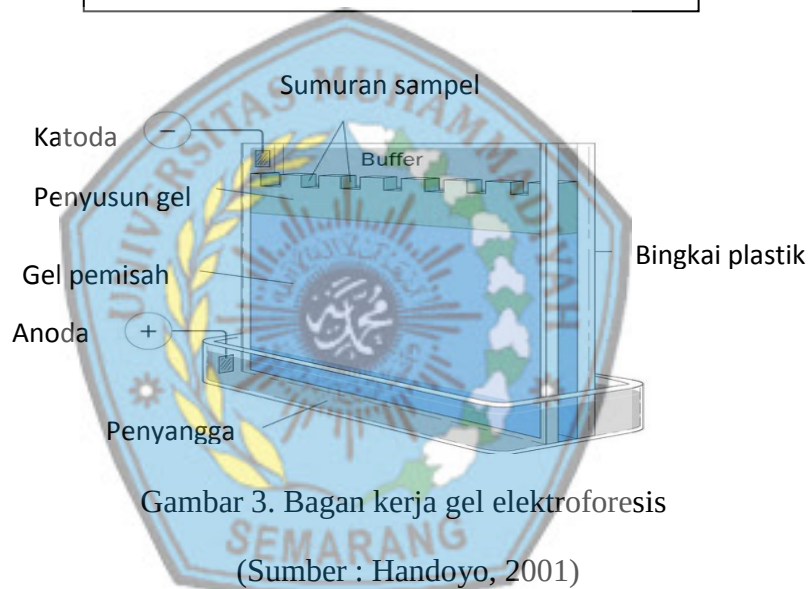
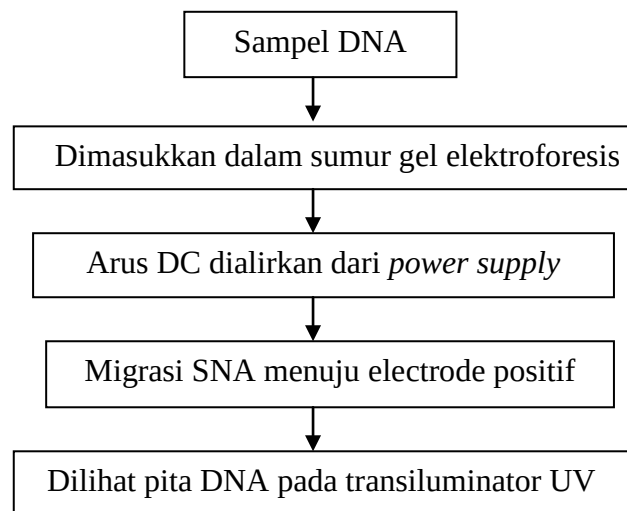
2.6 Gel Elektroforesis

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 ke arah sisi elektrode positif. Kecepatan pergerakan ini berbeda-beda, tergantung dari muatan dan berat molekul DNA.

Ada tiga jenis gel yang dapat digunakan dalam elektroforesis DNA, yaitu :

1. Gel poliakrilamida denaturasi, berfungsi untuk memurnikan penanda oligonukleotida dan menganalisis hasil ekstensi primer.
2. Gel alkalin agarose, berfungsi untuk memisahkan rantai DNA yang berukuran besar.
3. Gel agarose formaldehid denaturasi, berfungsi untuk menyediakan sistem elektroforesis yang digunakan untuk fraksi RNA pada ukuran standar (Handoyo, 2001).



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.

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-deoxyribonucleose 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 (Rinanda, 2011).

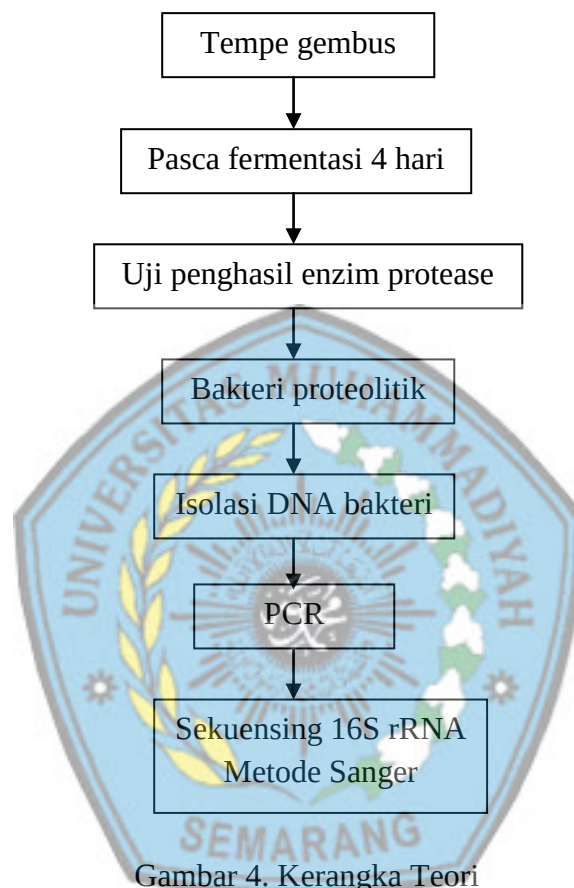
2.8 Sekuensing 16S rRNA

Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (conserved). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens 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.

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. 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. 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) (Rinanda, 2011).

2.9 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori