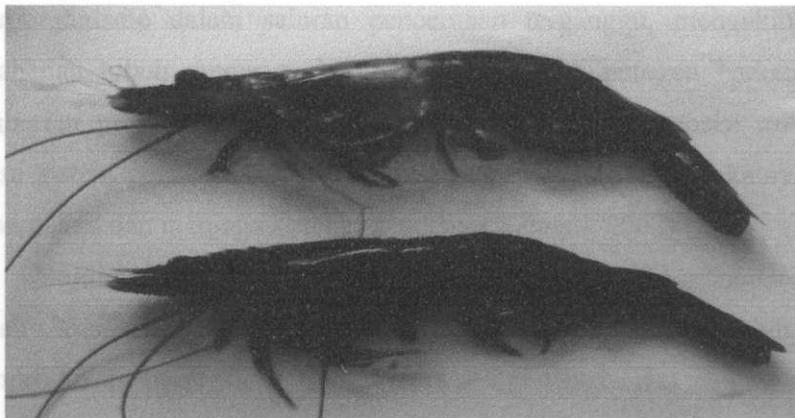


## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Klasifikasi dan Morfologi Udang Windu

Soetomo (1990) menyatakan bahwa udang windu diklasifikasikan kedalam Filum Arthropoda, Sub filum Mandibula, Kelas Crustacea, Sub kelas Malacostraca, Ordo Decapoda, Sub ordo Natantia, Famili Penaeida, Genus *Penaeus*, dan Spesies *Penaeus monodon*.



Gambar 1. udang windu (*Penaeus monodon*)

Menurut Suyanto dan Mujiman (1999) Ciri – ciri udang windu (*Penaeus monodon*) adalah warna tubuhnya merah cerah kekuning – kuningan dengan sabuk melintang di badan, ujung kaki berwarna merah, biasanya hidup di perairan pantai yang berlumpur dan berpasir, udang windu mempunyai rostrum yang kuat dan melengkung ke atas berbentuk huruf S, gigi atasnya 7 buah dan gigi bawahnya 3 buah.

Menerut Ramses (1996) udang windu mempunyai rostrum yang memanjang melewati ujung dari antenula peducele dengan rumus gigi rostrum 6-8 pada sisi atas (biasanya 7) dan sisi bawah 2-4 (biasanya 3), serta membentuk sigmoid. Kaki jalan yang kelima tidak mempunyai eksopoda. Tubuh bagian punggung berlekuk mulai dari sepertiga bagian depan ruas keempat sampai keenam, teslonnya tidak berduri, pada waktu masih hidup warna karapaks dan bagian tubuh bergaris – garis tebal melintang berwarna merah putih, antenanya berwarna coklat dan cetae pinggirnya berwarna merah.

## 2.2. Karakteristik Bakteri Probiotik

Probiotik berasal dari kata *probios*, yang dalam ilmu biologi berarti untuk kehidupan. Probiotik adalah pangan yang mengandung mikroorganisme hidup yang secara aktif meningkatkan kesehatan dengan cara memperbaiki keseimbangan flora usus jika dikonsumsi dalam keadaan hidup dalam jumlah yang memadai. Istilah bakteri probiotik pertama kali diperkenalkan oleh Perker pada tahun 1974, menggambarkan tentang keseimbangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan. Pada saat ikan mengalami stress, keseimbangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan terganggu, mengakibatkan sistem pertahanan tubuh menurun dan bakteri – bakteri patogen berkembang cepat. Pemberian probiotik dapat menjaga keseimbangan komposisi mikroorganisme dalam sistem pencernaan udang yang mengakibatkan meningkatnya daya cerna bahan pakan dan menjaga kesehatan udang ( Samadi, 2002).

Studi probiotik lainnya yang umumnya mempunyai spora dari jenis bakteri adalah *Bacillus spp.* Hal ini telah ditunjukkan memiliki kemampuan adhesi, memproduksi bacteriocin (antimicrobial peptide) dan dapat memberikan imunostimulasi ( Cherief et al., 2004).

Effendi (2002) menyatakan pemberian probiotik akan dapat memberikan keuntungan ( perlindungan, proteksi penyakit, perbaikan daya cerna) dari satu makhluk hidup kepada makhluk hidup yang lain.

Fuller dalam Prangdimurti (2002) menambahkan bahwa bakteri probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplemen makanan yang mempunyai pengaruh yang menguntungkan pada kesehatan baik pada manusia maupun hewan, dengan memperbaiki keseimbangan mikroflora intestinal. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik adalah yang memproduksi asam laktat terutama misalnya *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* walaupun ada jenis yang lain.

Prinsip dasar kerja probiotik adalah pemanfaatan kemampuan mikroorganisme dalam mencegah atau menguraikan rantai panjang protein karbohidrat dan lemak yang menyusun pakan yang diberikan. Kemampuan ini diperoleh karena adanya enzim – enzim khusus yang dimiliki mikroba untuk memecah ikatan tersebut. Pemecahan molekul kompleks ini menjadi molekul sederhana akan mempermudah pencernaan lanjutan dan penyerapan oleh saluran



pencernaan udang. Disisi lain mikroorganisme pelaku pemecah ini mendapatkan keuntungan berupa energi yang diperoleh dari hasil perombakan molekul kompleks tersebut (Effendi, 2002). Selanjutnya Samadi (2002) menyatakan probiotik bekerja secara anerop menghasilkan asam laktat mengakibatkan turunnya pH saluran pencernaan yang mengalami perkembangan dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Samadi (2002) mengatakan sebagian besar probiotik yang digunakan sebagai aditif adalah tergolong bakteri yang termasuk dalam spesies *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. plantarum* dan *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. thermofilum*) disamping itu terdapat juga bakteri *Streptococcus lactis* dan jenis fungi seperti *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*. Manfaat probiotik sebagai bahan aditif ditunjukkan dengan meningkatnya ketersediaan lemak dan protein bagi ternak, disamping itu probiotik juga meningkatkan kandungan vitamin B kompleks melalui fermentasi makanan. Probiotik juga meningkatkan kekebalan (*immunity*), mencegah alergi makanan dan kanker (*colon cancer*).

Waspodo (2001) menambahkan sifat probiotik sangat strain spesifik dan target spesifik, artinya tidak semua *L. casei* atau *L. acidophilus* maupun *B. lactis* bersifat probiotik, dan strain tertentu hanya spesifik terhadap manfaat kesehatan tertentu saja setelah dibuktikan secara klinis.

Menurut Pangdimurti (2001) pangan probiotik merupakan pangan (makanan dan minuman) yang mengandung sejumlah bakteri hidup yang memberi efek yang mengandung kesehatan. Selain memiliki nilai nutrisi yang baik, Manfaat ini diperoleh akibat terbawanya bakteri – bakteri hidup ke dalam saluran pencernaan yang mampu memperbaiki komposisi mikroflora usus sehingga mengarah pada dominasi bakteri – bakteri yang menguntungkan kesehatan.

Sudarmo *et al.*, (2003) menyatakan bahwa bakteri probiotik yang berdomisili di usus terutama di usus besar dan mengadakan kolonisasi yang membentuk mikroekosistem yang bermanfaat untuk kesehatan dalam aspek ketahanan infeksi, aspek metabolik dan aspek imunologis.

Bentuk koloni bakteri secara umum adalah bundar, keriput, konsentris, tak beraturan dan menyebar, berbenang – benang, bentuk L, filliform, rizoid dan kompleks. Sedangkan tipe pengandengan sel bakteri adalah tunggal, berpasangan,



rantai, bergerombol, membentuk tetrad, membentuk koma dan kumparan longgar, pendek dan kaku ( Hadioetomo, 1993).

Pada saat memilih mikroorganisme yang akan dijadikan probiotik, persyaratan yang harus dimiliki oleh mikroba probiotik antara lain adalah (Feliatra 2002); 1) tidak bersifat patogen atau mengganggu inang, tidak bersifat patogen bagi konsumen (manusia dan hewan lainnya), 2) tidak mengganggu keseimbangan ekosistem setempat, 3) mikroba tersebut hendaklah dapat dan mudah dipelihara dan diperbanyak, 4) dapat hidup dan bertahan serta berkembang biak di dalam usus ikan, 5) dapat dipelihara dalam media yang memungkinkan untuk diintroduksi ke dalam usus ikan, dan 6) dapat hidup dan berkembang di dalam air wadah pemeliharaan ikan atau udang.

### 2.3. Identifikasi Molekuler Bakteri

Studi keanekaragaman genetik pada prinsipnya bertujuan untuk mengkaji komposisi genetik individu di dalam atau antar populasi dan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya modulasi atau dinamika keanekaragaman genetik dari populasi tersebut. Secara umum keanekaragaman genetik pada suatu populasi dapat terjadi karena gen mengalami mutasi, rekombinasi, dan perpindahan sekelompok populasi dari suatu tempat ke tempat yang lain (Griffins *et al.*, 1996).

Gen 16S rDNA merupakan komponen penting dalam sel dan sangat menguntungkan di dalam analisis filogenik, karena terdiri daerah – daerah yang dikonversi sehingga mutasi akan terbatas, studi sistematika bakteri pada tingkat bakteri, genus, spesies, ataupun subspecies (Chen *et al.*, 2000).

Brock dan Madigan (1991) menyatakan bahwa 16S rDNA sangat mudah penanganannya dari pada 23S rDNA, maka 16S rDNA lebih sering digunakan untuk melihat perkembangan filogenetik prokariota dan memiliki bagian atau sekuen konservatif dan sekuen lainnya sangat bervariasi. Sabdono (2001) menambahkan bahwa sekuen nukleotida 16S rDNA tidak hanya memudahkan identifikasi bakteri dari sampel lingkungan.

Penerapan filogenetik molekuler pada ekologi mikroba menunjukkan adanya diversitas prokariotik yang terjadi secara alami. Lebih dari 16.000 sekuen gen 16S rDNA dari berbagai spesies bakteri telah disimpan dalam *Gen Bank*. Gen

rDNA mempunyai daerah sekuen yang dikonversi, sehingga dapat digunakan untuk menduga kekerabatan secara alami antar spesies yang mempunyai kekerabatan jauh serta dapat digunakan untuk membedakan spesies yang mempunyai kekerabatan dekat dari berbagai daerah (Rhodest *et al.*, 1998).

Sekuen gen 16S rDNA dari mikroorganisme yang baru ditemukan dapat dibandingkan dengan pustaka sekuen 16S rDNA dari mikroorganisme lain melalui program pelacakan *Database Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altuschul *et al.*, 1997).

Penggunaan gen 16S rDNA untuk mengetahui hubungan filogenetik banyak diterapkan pada berbagai lingkungan yang berbeda. Beberapa *database* yang lain, yang dikenal yaitu Gen Bank (USA), yang dikenal antara lain The Genom Sequen Data Base (GSDB), dan The European Molecular Biology Laboratory Data Library (EMBL), serta DNA Data Bank of Japan (DDBJ) bersama-sama memberikan informasi terhadap koleksi terbaru dari sekuen DNA (Sabdon, 2001).

#### 2.4. DNA dan RNA

DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan secara seluler. DNA terdapat pada nukleus, mitokondria dan kloroplas. Perbedaan di antara ketiganya adalah: DNA nukleus berbentuk linear dan berasosiasi sangat erat dengan protein histon, sedangkan DNA mitokondria dan kloroplas berbentuk sirkular dan tidak berasosiasi dengan protein histon. Selain itu, DNA mitokondria dan kloroplas memiliki ciri khas, yaitu hanya mewariskan sifat-sifat yang berasal dari garis ibu. Hal ini sangat berbeda dengan DNA nukleus yang memiliki pola pewarisan sifat dari kedua orangtua. Dilihat dari organismenya, struktur DNA prokariot berbeda dengan struktur DNA eukariot. DNA prokariot tidak memiliki protein histon dan berbentuk sirkular, sedangkan DNA eukariot berbentuk linear dan memiliki protein histon (Klug dan Cummings 1994).

Kesulitan para pakar genetika menerima DNA sebagai bahan baku gen dapat dimengerti, yaitu bila kita melihat struktur kimianya yang sederhana. Rantai DNA adalah sebuah polimer panjang, tak bercabang, yang hanya tersusun dari empat macam subunit. Subunit – subunit ini adalah deoksiribonukleotid yang

mengandung basa – basa adenine (A), sitonin (C), guanin (G), dan timin (T). Nukleotid – nukleotid itu saling dirangkaikan dengan ikatan ikatan fosfodiester kovalen yang menghubungkan karbon 5' pada sebuah gugus deoksiribosa dengan karbon 3' pada gugus berikutnya. Keempat macam basa tadi tersambung ke rantai gula –fosfat yang hampir seperti empat macam manik- manik yang menjadi sebuah kalung (Alberts *et al.* ,1994).

Secara umum struktur DNA mempunyai bagian yang disebut gen struktural yaitu rangkaian nukleotida yang menyusun spesifikasi urutan asam amino pada polipeptida. Pada prokariot, DNA merupakan molekul tunggal berukuran besar, berbentuk sirkular dengan rantai ganda dan tertutup secara kovalen, sehingga semua DNA kromosomal merupakan satu untaian panjang DNA. Pada eukariot, DNA dalam suatu kromosom merupakan suatu molekul linier yang berlipat-lipat, dan spesies yang berbeda mempunyai jumlah kromosom yang berbeda (Muslim, 2003).

RNA adalah rantai tunggal polimer polinukleotida. Fungsi utamanya adalah sebagai pembawa informasi genetik yang disalin dari informasi genetik DNA melalui proses transkripsi dalam proses sintesis protein. RNA mempertahankan semua informasi tentang urutan DNA yang telah diterimanya, termasuk sifat –sifat berpasangan basa dari DNA tersebut. Molekul - molekul RNA disintesis melalui suatu proses yang dikenal sebagai transkripsi DNA, yang sama dengan replikasi DNA dalam salah satu dari untaian DNA yang bertindak sebagai cetakan. Dengan inilah kemampuan berpasangan basa nukleotid yang baru datang diuji. Apabila kesesuaian dengan template DNA terpenuhi, sebuah ribonukleotid diterima sebagai unit yang membentuk ikatan kovalen. Dengan cara inilah stiap kali rantai RNA diperpanjang dengan sebuah nukleotid. (Alberts *et al.* ,1994). RNA terdiri dari tiga jenis:

1. mRNA (*messenger RNA*), berfungsi untuk membawa pesan dengan struktur rantai lurus.
2. tRNA (*transfer RNA*), berfungsi sebagai pembawa dan memindahkan gugus aminoasil dengan struktur berupa rantai tunggal yang memilin secara teratur.
3. rRNA (*ribosomal RNA*), berfungsi sebagai penerjemah sintesis protein

bersama ribosom (karena terdapat pada ribosom) dengan struktur berupa rantai tunggal yang memilin membentuk struktur tersier (Martoharsono, 1998).

Terdapat tiga hal penting pada struktur DNA dari hasil analisa kimia (Winarno dan Fardiaz, 1993):

1. DNA mengandung sejumlah basa purin dan pirimidin yang sama dalam heliks ganda.
2. Terdapat kesetimbangan antara jumlah adenin dengan timin, dan guanin dengan sitosin ( $A=T$  dan  $G=C$ ).
3. Perbandingan antara  $(A+T)$  dengan  $(G+C)$  dapat bervariasi, tetapi mempunyai nilai yang tetap pada masing-masing spesies.

## 2.5. Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan teknik dasar yang harus dikuasai dalam teknologi DNA rekombinan. Tujuan isolasi adalah mendapatkan DNA tanpa debris sel. Organisme tingkat rendah, seperti bakteri (sel prokariot), dan organisme tingkat tinggi seperti manusia (sel eukariot) (Toha, 2001).

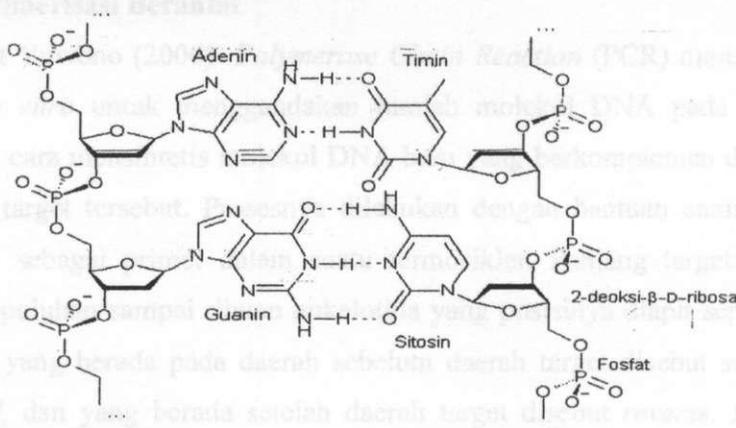
Prinsip teknik isolasi DNA mencakup berbagai tahap reaksi dengan tujuan yang berbeda-beda pada setiap tahapnya. Secara umum, tahap-tahap tersebut adalah (Toha, 2001):

1. Penghancuran dinding sel yang dilakukan secara mekanis dan enzimatis,
2. Lisis sel karena degradasi membran sel, yang dilakukan dalam berbagai cara tergantung jenis selnya. Pada sel eukariot, proses ini sering digabung dengan tujuan dapat merusak membran inti tempat asam nukleat,
3. Membersihkan debris sel, yang dilakukan dengan cara sentrifugasi dan presipitasi.

## 2.6. Karakterisasi DNA

Pada awal tahun 1950-an, analisis difraksi sinar-x terhadap spesimen – spesimen DNA yang direntang menjadi serat –serat mengungkapkan bahwa molekul DNA adalah sebuah polimer heliks yang tersusun dari 2 untaian. Jika

larutan DNA dipanaskan, maka ikatan non kovalen yang menahan dua rantai polinukleotida DNA akan melemah dan akhirnya putus. Ketika proses ini terjadi, kedua rantai menjadi terbuka sebagian dan disebut denaturasi DNA (DNA *melting*). Temperatur yang menyebabkan untai ganda terdenaturasi 50% disebut *melting temperature* ( $T_m$ ) atau temperatur leleh. Persentase (G+C) pada DNA memberikan pengaruh yang kuat pada  $T_m$ , yaitu semakin tinggi % (G+C) maka nilai  $T_m$  semakin tinggi. Hal ini disebabkan ikatan hidrogen antara pasangan basa G-C yang berjumlah tiga, sedangkan ikatan hidrogen pasangan basa A-T hanya dua. Jumlah dari untai yang terpisah atau meleleh dapat ditentukan melalui pengukuran absorbans larutan DNA pada panjang gelombang 260 nm. Larutan DNA akan menyerap sinar pada panjang gelombang ini karena struktur elektronik pada basa DNA. Basa nitrogen akan menyerap lebih kuat pada kondisi terpisah dari pada saat kondisi bergabung, sehingga perlakuan menyebabkan terganggunya ikatan hidrogen pada pasangan basa, seperti panas dan alkali akan menambah absorbans DNA (Holme dan Peck, 1993).



Gambar 2. Struktur DNA

Secara fisik, sifat-sifat nukleotida adalah (Mathews dan Van Holde, 1996):

1. Nukleotida merupakan asam kuat, ionisasi yang utama dari fosfat terjadi pada pKa mendekati 1,0.
2. Sebagai akibat sistem ikatan rangkap pada purin dan primidin, basa dan turunannya menyerap sinar sangat kuat pada daerah spektrum ultraviolet.

3. Absorbans yang kuat dapat ditentukan dalam penentuan kuantitatif DNA, yaitu penentuan konsentrasi DNA pada level  $\mu\text{g/ml}$  melalui spektrofotometri.

Penentuan kemurnian DNA dapat diperoleh dengan membandingkan absorbans sampel pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Panjang gelombang 260 nm merupakan panjang gelombang optimum untuk mengukur absorbans akibat resonansi ikatan rangkap pada basa purin dan primidin, sedangkan panjang gelombang 280 nm merupakan panjang gelombang yang biasa digunakan untuk mengukur absorbans protein (tirosin). Absorbans ini dinyatakan sebagai perbandingan rapat optis (*opticaly density*, O.D). Sampel DNA yang murni harus memiliki O D 260/280 nm di atas 1,8. Jika nilainya kecil dari itu, kemungkinan adanya kontaminasi protein. Kemungkinan kontaminasi protein karena RNA kecil, karena sampel umumnya telah diperlakukan dengan RNAase yang akan menghancurkan RNA (Holme dan Peck, 1993).

## 2.7. Reaksi Polimerisasi Berantai

Menurut Yuwono (2006) *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut. Prosesnya dilakukan dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu termosikler. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukelotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada pada daerah sebelum daerah target disebut sebagai primer *forward*, dan yang berada setelah daerah target disebut *reverse*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal dengan enzim polymerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (*nukleotida berbasis adenine*), dCTP (sitosin), guanine, dGTP (guanin), dan dTTP (timin).

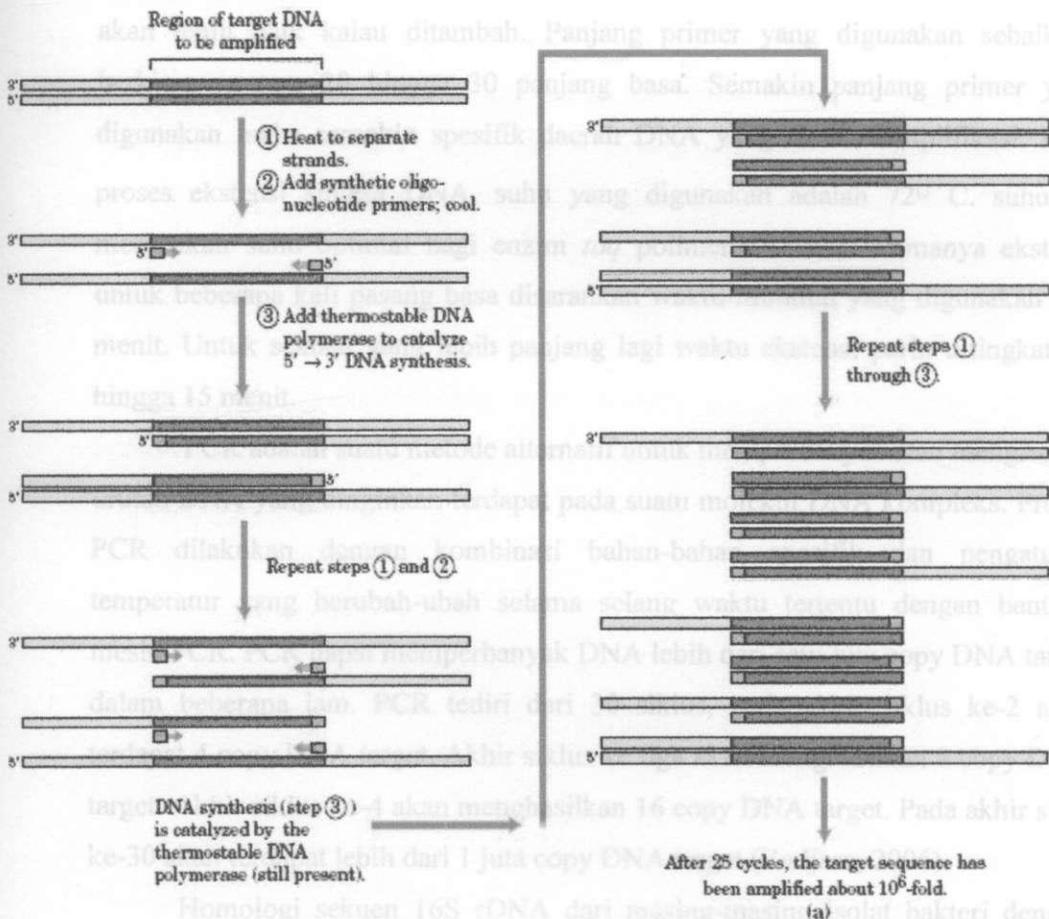
Menurut Toha (2001) PCR atau reaksi polimerase berantai adalah teknik amplifikasi fragmen gen tertentu yang terletak di antara pasangan oligonukleotida primer spesifik. Pada prinsipnya, PCR terdiri atas tiga tahap reaksi berbeda dalam satu siklus, yaitu:

1. Tahap denaturasi, bertujuan untuk memutuskan ikatan hidrogen DNA

rantai ganda yang akan diamplifikasi. Hasil yang diperoleh merupakan DNA cetakan untai tunggal untuk penempelan oligonukleotida primer.

2. Tahap *annealing*, yaitu membentuk ikatan hidrogen baru antara untai tunggal DNA cetakan dengan oligonukleotida primer.
3. Tahap polimerisasi, yaitu tahap pemanjangan rantai tunggal oligonukleotida primer dengan katalis enzim DNA polimerase.

Selanjutnya, Taylor (1991) menyatakan bahwa ketiga tahap PCR dipengaruhi temperatur dengan temperatur masing-masing tahap adalah denaturasi  $\pm 95^{\circ}\text{C}$ , *annealing*  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ , dan polimerisasi  $\pm 72^{\circ}\text{C}$ , bergantung kepada sekuens yang didenaturasi dan di*annealing*, sehingga akan berbeda antar sampel DNA.



Gambar 3. Amplifikasi Fragmen DNA dengan PCR.



Keterangan:Langkah-langkah prosedur PCR :

1. Untai DNA dipisahkan dengan pemanasan (*denaturasi*),
  2. *Annelaing*, untuk memperbanyak primer DNA sintetis yang mengapit daerah yang diamplifikasi;
  3. DNA baru diperbanyak dengan polimerisasi.
- (Sumber : *Lehninger, Nelson dan Cox, 1993*).

Menurut Gelfand (*dalam* Yuwono, 2006) setiap tahap pada siklus PCR memerlukan periode waktu tertentu untuk dapat efektif. Pada tahap denaturasi yaitu saat untai ganda DNA dipisahkan menjadi untai tunggal, diperlukan waktu standar 90 detik pada suhu 94<sup>0</sup> C, tahap aneling, ketika tahap primer berkomplemen dengan salah satu untai. Suhu dan waktu yang digunakan bergantung pada komposisi GC. Pada komposisi GC primer maka suhu annealing akan lebih baik kalau ditambah. Panjang primer yang digunakan sebaiknya berkisar antara 20 hingga 30 panjang basa. Semakin panjang primer yang digunakan maka semakin spesifik daerah DNA yang akan diamplifikasi. Pada proses ekstensi sintesa DNA, suhu yang digunakan adalah 72<sup>0</sup> C. suhu ini merupakan suhu optimal bagi enzim *taq* polimerase DNA. Lamanya ekstensi untuk beberapa kali pasang basa disarankan waktu minimal yang digunakan tiga menit. Untuk sekuen yang lebih panjang lagi waktu ekstensi perlu ditingkatkan hingga 15 menit.

PCR adalah suatu metode alternatif untuk memperbanyak atau mengisolasi urutan DNA yang diinginkan terdapat pada suatu molekul DNA kompleks. Proses PCR dilakukan dengan kombinasi bahan-bahan spesifik dan pengaturan temperatur yang berubah-ubah selama selang waktu tertentu dengan bantuan mesin PCR. PCR dapat memperbanyak DNA lebih dari satu juta copy DNA target dalam beberapa jam. PCR terdiri dari 30 siklus, pada akhir siklus ke-2 akan terdapat 4 copy DNA target. Akhir siklus ke tiga akan menghasilkan 8 copy DNA target. Akhir siklus ke-4 akan menghasilkan 16 copy DNA target. Pada akhir siklus ke-30 akan terdapat lebih dari 1 juta copy DNA target (Radjasa, 2006).

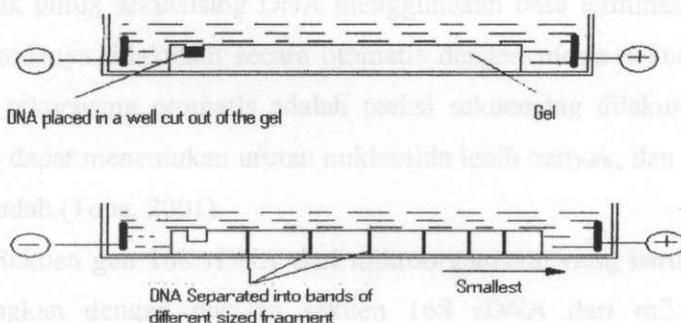
Homologi sekuen 16S rDNA dari masing-masing isolat bakteri dengan sekuen 16S rDNA dari database bank diketahui bahwa tidak ada sekuen 16S rDNA isolat bakteri yang identik (Andrito, 2007). Kemudian Hagstrom *et al* (2000) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16S rDNA

lebih dari 97 % dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuen antara 93-97 % dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

## 2.8. Gel Elektroforesis

Elektroforesis pada prinsipnya merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan melalui pori-pori gel dibawah pengaruh medan listrik dengan kekuatan tertentu. Pada pH mendekati netral DNA bermuatan negatif, sehingga molekul ini dapat bermigrasi dari katoda ke anoda dengan mobilitas yang dipengaruhi oleh ukuran dan konformasi fragmen DNA, kekuatan arus listrik, konsentrasi etidium bromida (EtBr), kekuatan ion buffer, dan konsentrasi gel yang digunakan (Toha,2001).

Elektroforesis dengan gel agarose merupakan metode yang sederhana dan sangat efektif untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA dengan panjang 0,5 sampai 25 kilo pasang basa (kpb). Metode elektroforesis ini dapat dikelompokkan menjadi tiga langkah. *Pertama*, persiapan gel agarose dengan konsentrasi agarose yang disesuaikan dengan ukuran DNA fragmen yang akan dipisahkan. *Kedua*, DNA sampel dimasukkan ke dalam lubang gel dan gel diletakkan di bak elektroforesis yang dialiri listrik dalam waktu tertentu sehingga menghasilkan pemisahan yang baik. *Ketiga*, gel direndam dalam *ethidium bromide*, atau *etidium bromida* yang telah digunakan pada gel dan penyangga elektroforesis. Hasil elektroforesis ini dapat dilihat langsung pada penyinaran dengan UV (Yuwono, 2005



Gambar 4. Pemisahan DNA melalui elektroforesis gel agarosa  
(Sumber: Holme dan Peck,1993)

Menurut Radjasa (2006), pada prinsipnya DNA dapat berintegrasi di dalam gel dalam bentuk padat yang diletakkan dalam urutan penyangga yang dialiri arus listrik. Larutan yang masih cair (dengan temperatur sekitar 60 °C) dituangkan ke dalam pencetak gel. Setelah itu sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan biarkan gel mengeras. Jika gel diletakkan dalam bak elektroforesis yang mengandung larutan penyangga dan bak tersebut dialiri arus listrik, molekul DNA yang bermuatan negatif pada pH netral bergerak (bermigrasi) ke arah positif (anoda). Kecepatan migrasi molekul DNA ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah ukuran molekulnya. Migrasi molekul DNA berukuran besar lebih lambat dari pada migrasi molekul berukuran kecil.

## 2.9. Sekuensing DNA

Bahan yang sekuensing dilakukan untuk mencari tahu susunan basa DNA pada bakteri yang dapat digunakan, antara lain untuk mengidentifikasi spesies bakteri tersebut, mengkaji komposisi genetik individu, populasi dan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya modulasi atau dinamika keanekaragaman genetik dari populasi tersebut (Griffins *et al.*, 1996).

Sekuensing DNA adalah metode penentuan urutan basa nukleotida suatu fragmen DNA. Metode ini penting untuk menentukan urutan basa nukleotida suatu gen atau fragmen DNA lainnya. Metode sekuensing yang umum dilakukan adalah metode Sanger yang dapat dilakukan melalui metode radioaktif dan metode fluoresens (Toha, 2001).

Metoda sekuensing fluorescens merupakan metode perpanjangan enzimatik untuk sekuensing DNA menggunakan basa terminasi *dye fluorescens*, dan metodanya dilakukan secara otomatis dengan mesin sekuensing. Kelebihan metode sekuensing otomatis adalah reaksi sekuensing dilakukan dalam tabung tunggal, dapat menentukan urutan nukleotida lebih banyak, dan penyiapan tempat lebih mudah (Toha, 2001).

Sekuen gen 16S rDNA dari mikroorganisme yang baru ditemukan dapat dibandingkan dengan pustaka sekuen 16S rDNA dari mikroorganisme lain melalui program pelacakan *Database Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altsuchul *et al.*, 1997).

