II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri *Vibrio*

Bakteri adalah organisme prokariot yang tidak mempunyai inti sel. Organisme prokariot terdiri atas sel tunggal, meskipun sering berkembang dalam kelompok bakteri yang saling melekat satu sama lain. Kelompok bakteri ini disebut koloni. Genom bakteri terdiri atas suatu molekul DNA untaian ganda yang berbentuk lingkaran, terdapat dalam sitoplasma sel. Molekul DNA yang besar atau kromosom bakteri, mengandung sebagian besar gen bakteri. Molekul DNA berbentuk lingkaran yang lebih kecil yang disebut plasmid (Sabdono, 2001).

Feliatra (2001) menyatakan bahwa secara umum, *Vibrio* berbentuk poros kurva atau bengkok, motil dengan satu flagella pada kutub sel, gram negatif, tidak *acid-fast*, tidak menghasilkan endospora, tidak mempunyai kapsul, metabolisme respirasi dan fermentatif, fermentasi karbohidrat menghasilkan produk campuran, tetapi bukan CO_2 dan H_2, okidasi positif, fakultatif anaerob, G +C 40-59 moles%.

Penyakit *Vibrio*sis disebabkan oleh bakteri gram negatif *Vibrio,* yaitu *V. alginolyticus*, *V. anguillarum,* dan *V. Parahaemolyticus.* Penyakit tersebut dapat dideteksi dengan mengisolasi bakteri dari tubuh udang sakit dan menanamnya pada media agar selektif *Vibrio,* yaitu TCBS agar. Pada media ini koloni bakteri yang tumbuh tampak berwarna kuning dan hijau (Effendi, 1998).

V. parahaemolyticus pertama kali diteliti ketika terjadi kasus keracunan makanan di Jepang (Thayib, 1997). Bakteri *V. parahaemolyticus* yang menyebabkan keracunan makanan khususnya ikan, dapat hidup pada suhu di atas 8 ^{0}C, tetapi pertumbuhan optimumnya pada suhu 37 ^{0}C, dapat berlipat ganda dengan cepat di bawah kondisi suhu tropik dan cukup sensitif pada suhu 0-8 ^{0}C.

Menurut Hartono (1998), karakteristik utama bakteri *V. alginolyticus* yaitu flagela bercabang pada ujung sel monotorik, tumbuh pada media padat, dan termasuk penghasil asam. Karakteristik penyakit yang disebabkannya tergolong septisemik, dapat menginfeksi ikan/udang yang lemah, berkulit gelap atau pada saat bertukar kulit.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

V. alginolyticus berwarna kuning muda transparan atau kuning keruh pada medium TSA maupun TCBS, ada beberapa yang tumbuh *swarming* (tumbuh menutupi seluruh permukaan agar) dan menghasilkan asam, tidak bercahaya, bentuk permukaan koloni datar (flat). Diameter koloni lebih besar bila dibandingkan dengan koloni bakteri lain, tumbuh bagus pada medium TCBS pada suhu 30^{o} C (Prajitno, 1995).

2.2. *Vibrio* merupakan Patogen bagi Udang

Vibrio merupakan patogen oportunistik, yaitu organisme yang ada dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan, kemudian berkembang dari sifat saprofitik menjadi patogenik jika kondisi lingkungannya memungkinkan (Suryanto *et al* dalam Tjahyadi, 1994).

Yusminah *et al* (2003) mengemukakan bahwa bakteri *Vibrio* sp pada tempat pemeliharaan udang tidak selalu menyebabkan kematian udang. Tingkat kepadatan tertentu larva serta kondisi hidup larva yang kurang baik mungkin menyebabkan *Vibrio* berubah menjadi patogen (patogen oportunistik). Walaupun pada larva mati sering ditemukan *Vibrio* sp, tetapi isolat ini belum tentu pasti patogen. Patogenitas suatu baketri ditentukan oleh pelekatan sel tersebut pada sel inang serta kemampuannya dalam melakukan kolonisasi dan mengeksresikan faktor virulensi. *Vibrio* sp yang telah melekat pada larva udang akan tetap melekat walaupun telah dilakukan proses pencucian.

Reed *et al* (2002) mengemukakan bahwa bakteri *Vibrio* sering terjadi pada ikan/udang yang berasal dari laut dan estuaria bahkan terkadang juga terjadi ikan/udang air tawar. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* dapat mengakibatkan tingkat kematian yang tinggi pada budidaya udang. Bakteri genus *Vibrio* adalah bakteri patogen yang berasal dari laut, estuaria dan kadang ditemukan pada air tawar yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia akibat mengkonsumsi udang/ikan yang telah terkontaminasi oleh bakteri tersebut.

Beberapa spesies *Vibrio* yang sering dijumpai menimbulkan penyakit pada udang antara lain: *V. alginolyticus, V. anguillarum, dan V. parahaemolyticus.*

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Selanjutnya sifat serangan bakteri *Vibrio* adalah inveksi sekunder yaitu infeksi yang terjadi setelah adanya luka dan stres berat. Ciri-ciri udang yang terserang ditandai dengan gejala klinis di mana udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna merah (Marhadi, 2002).

V. vulnificus adalah bakteri patogen yang menyebabkan penyakit pada *hepatopancreas* pada udang yang sakit. Akan tetapi, ada juga yang dikenal dengan opurtunis patogen ketika mereka tumbuh subur pada kondisi yang optimal untuk pertumbuhan mereka. Mereka juga menyerang udang yang sehat pada kondisi lingkungan yang memungkinkan (Gomez *et al.*, 1998).

2.3. Toksin pada Bakteri Patogen

Patogenitas adalah potensi suatu oganisme (bakteri) dalam menimbulkan penyakit atau menginfeksi. Sedangkan virulensi adalah derajat patogenitas. Virulensi tidak hanya bergantung dari bakteri itu sendiri, tetapi juga dipengaruhi oleh inang untuk melawan masuknya patogen. Virulensi bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti produksi toksin, baik eksotoksin maupun endotoksin, enzim, ketahanan inang, kecepatan berkembang biak (Pelczar *et al.*, 1986).

Patogenitas bakteri dapat dipengaruhi oleh toksin serta enzim-enzim yang diproduksi. Menurut Pelczar *et al.*, (dalam Murdjani, 2002) enzim-enzim tersebut adalah sebagai berikut:

a. *Hyaluronidase*, enzim ini mempengaruhi masuknya patogen dalam jaringan dengan cara menghidrolisis asam hyalurat. Asam ini merupakan bahan pelekat utama jaringan. Hyalunidase merupakan enzim adaptif dan hanya dibentuk oleh organisme tertentu.
b. *Lesitinase*, enzim ini mempunyai kemampuan merusak sel-sel jaringan terutama menyebabkan lisis pada sel darah merah.
c. *Kolagenase*, mempunyai kemampuan merusak kolagen yaitu serabut jaringan yang terdapat dalam otot, tulang, serta tulang rawan dan membentuk semacam jala di tempat jaringan sel terbentuk.
d. *Leokusidin,* enzim ini dapat membunuh leukosit (sel –sel darah putih)

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

e. *Hemolisin,* adalah substansi yang melisis sel-sel darah merah, membebaskan *haemoglobin.*

Menurut Wren (1992), toksin dibagi menjadi beberapa kelompok sesuai dengan aktifitasnya. Toksin yang dihasilkan oleh bakteri patogen dapat dikelompok dalam tiga *type*:

- *Type* I : toksin yang melakukan penempelan pada permukan sel kemudian masuk ke dalam molekul *transmembrane signal*
- *Type* II : toksin langsung berada pada membran sel atau dengan formasi saluran atau *lipid bilayer.*
- *Type* III : toksin langsung berada pada sitosol melalui translokasi komponen enzim yang dimodifikasi sebagai target molekul intraseluler dengan tempat transkripsi.

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).

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 berbagais spesies bakteri telah disimpan dalam *Gen Bank.* Gen rDNA mempunyai daerah sekuen yang dikonversi, sehingga dapat digunakan untuk

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

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 Aligment 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), 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 (Sabdono, 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).

DNA memiliki struktur pilinan utas ganda yang antiparalel dengan komponen-komponennya, yaitu gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Pasangan basa pada DNA terdiri atas dua macam, yaitu basa purin

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

dan pirimidin. Basa purin terdiri atas adenin (A) dan guanin (G) yang memiliki struktur cincin-ganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan timin (T) yang memiliki struktur cincin-tunggal. Ketika Guanin berikatan dengan Sitosin, maka akan terbentuk tiga ikatan hidrogen, sedangkan ketika Adenin berikatan dengan Timin maka hanya akan terbentuk dua ikatan hidrogen. Satu komponen pembangun (building block) DNA terdiri atas satu gula pentosa, satu gugus fosfat dan satu pasang basa yang disebut nukleotida (Lewis, 2003).

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 sintetis protein. 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 tungal yang memilin secara teratur.
3. rRNA (*ribosomal RNA*), berfungsi sebagai penerjemah sintetis 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.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

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

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.

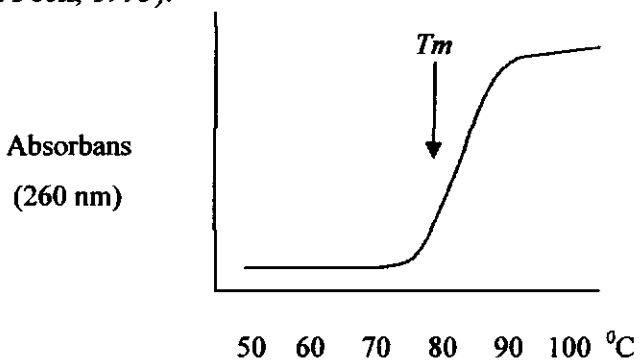
Dalam penelitian identifikasi mikroba menggunakan teknik 16S rDNA, tahap isolasi DNA menggunakan FastPrep® DNA Kit, terdiri dari : *lysing matrix, CLS TC, binding matrix, SEWS-M, DES.*

2.5. Karakterisasi DNA

Jika larutan DNA dipanaskan, maka ikatan non kovalen yang menahan dua rantau 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 untaian ganda terdenaturasi 50% disebut *melting temperature* (Tm) atau temperatur leleh. Persentase (G+C) pada DNA memberikan pengaruh yang kuat pada *Tm,* yaitu semakin tinggi % (G+C) maka nilai Tm 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 untaian yang terpisah atau meleleh dapat ditentukan melalui pengukuran

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

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 1. Kurva titik leleh DNA
(Sumber : Holme dan Peck, 1993)

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 µg/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

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

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).

2.6. Reaksi Polimerisasi Berantai

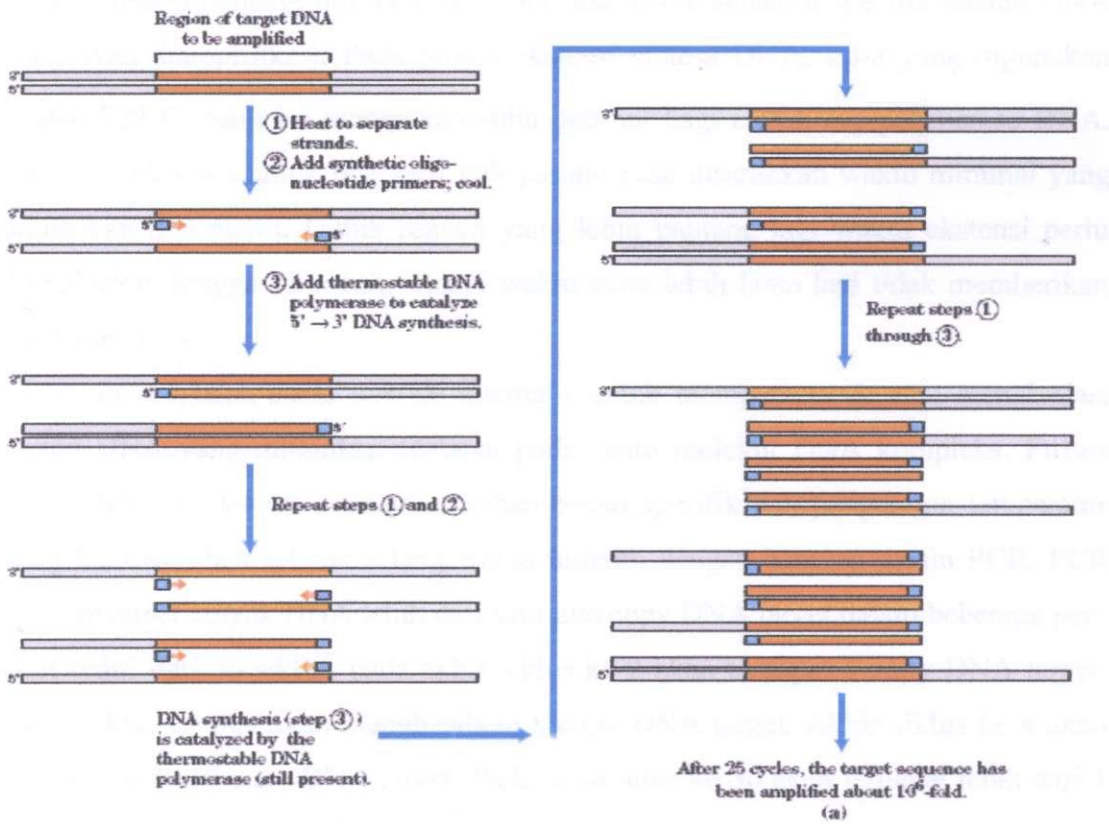
Menurut Yowono (2006), *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintetis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut. Prosesnya dilakukan dengan bantuan enzim dan oligonukleotida 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 berbasa 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 dalam tahap *annealing*.
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.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Selanjutnya, Taylor (1991) menyatakan bahwa ketiga tahap PCR dipengaruhi temperatur dengan temperatur masing-masing tahap adalah denaturasi $\pm$ 95^{0}C, *annealing* $\pm$ 45^{0}C, dan polimerisasi $\pm$ 72 ^{0}C, bergantung kepada sekuens yang didenaturasi dan diannealing, sehingga akan berbeda antar sampel DNA.



Gambar 2. Ampilifikasi 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

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

90 detik pada suhu 94^0 C, tahap anneling, 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^o 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. Tetapi waktu yang lebih lama lagi tidak memberikan hasil yang baik.

PCR adalah suatu metode alternatif untuk memperbanyak atau mengisolasi urutan DNA yang dinginkan 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 tediri 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 silus ke-30 akan terdapat lebih dari 1 juta copy DNA target (Radjasa, 2006).

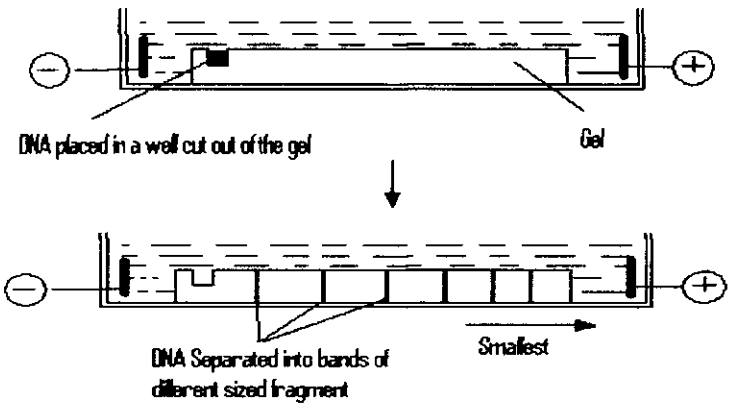
Homologi sekuen 16S rDNA dari masing-masing isolat bakteri dengan sekuen 16S rDNA dari database bank diketahui bahwa tidak ada sekuen 16S rDNA isolate bakteri yang identik (Andrito, 2007). Kemudian Hagstrom *et al* (2000) menyatakan bahwa isolat yang mempunyai persamaan sekuen 16S rDNA lebih dari 97 % dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persaman sekuen antara 93-97 % dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

2.7. Gel Elektroforesis

Elekteroforesis dengan gel agaros merupakan metode yang sederhana dan sangat efektif untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

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 diseusaikan 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 eletroforesis. Hasil elektroforesis ini dapat dilihat langsung pada penyinaran dengan UV (Yowono, 2006).



Gambar 3. Pemisahan DNA melalui elektrofroresis 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. Salah satu gel yang sering digunakan adalah gel agarose. Gel agarose dapat dicetak dengan memanaskan agarose yang dilarutkan dalam larutan penyangga sampai larutan jernih. Larutan yang masih cair (dengan temperatur sekitar 60 ^{0}C) dituangkan ke dalam pencetak gel. Setelah itu sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan biarkan gel mengeras. Apabila gel telah mengeras, sisir dicabut sehingga membentuk lubang-lubang yang digunakan untuk menempatkan larutan DNA. Jika gel diletakkan dalam bak elektroforesis yang mengandung larutan penyangga dan bak tersebut dialiri arus listrik, molekul DNA yang bermuatan negatif pda pH netral bergerak (bermigrasi) ke arah positif (anoda). Kecepatan migrasi molekul DNA

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah ukuran molekulnya. Migrasi molekul DNA berukuran besar lebih lambat dari pada migrasi molekul berukuran kecil.

2.8. Sekuensing DNA

Bahan yang sekuensing dilakukan untuk mencari tahu susunan basa DNA pada bakteri yang dapat digunakan untuk berbagai macam hal, antara lain untuk mengidentifikasi spesies bakteri tersebut, 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 (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 baa terminasi *dye fluorescens,* dan metodanya dilakukan secara otomatis dengan mesin sekuensing. Hasil sekuensing otomatis adalah urutan nukleotida DNA pada puncak grafik dari kanan ke kiri. Sumbu X grafik adalah sinyal fluorescens dan sumbu Y adalah waktu sekuensing. Kelebihan metode sekuensing otomatis adalah reaksi sekuensing dilakukan dalam tabung tunggal, dapat menentukan urutan nukleotida lebih banyak, dan penyiapan templat 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 Aligment Search Tool* (BLAST) (Altsuchul *et al.*, 1997).

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/