

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):

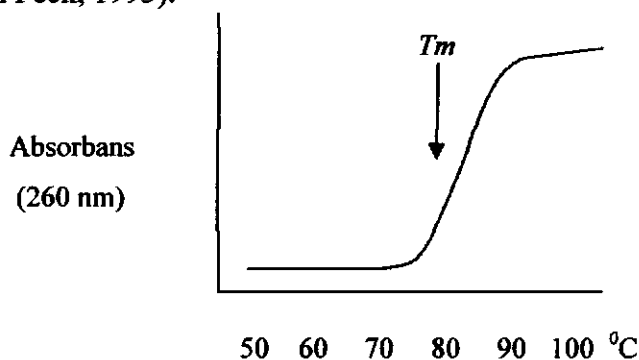
1. Penghancuran dinding sel yang dilakukan secara mekanis dan enzimatik,
2. Lisis sel karena degradasi membran sel, yang dilakukan dalam berbagai cara tergantung jenis selnya. Pada sel eukariot, proses ini sering digabung dengan tujuan dapat merusak membran inti tempat asam nukleat,
3. Membersihkan debris 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 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 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 (*optical 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).

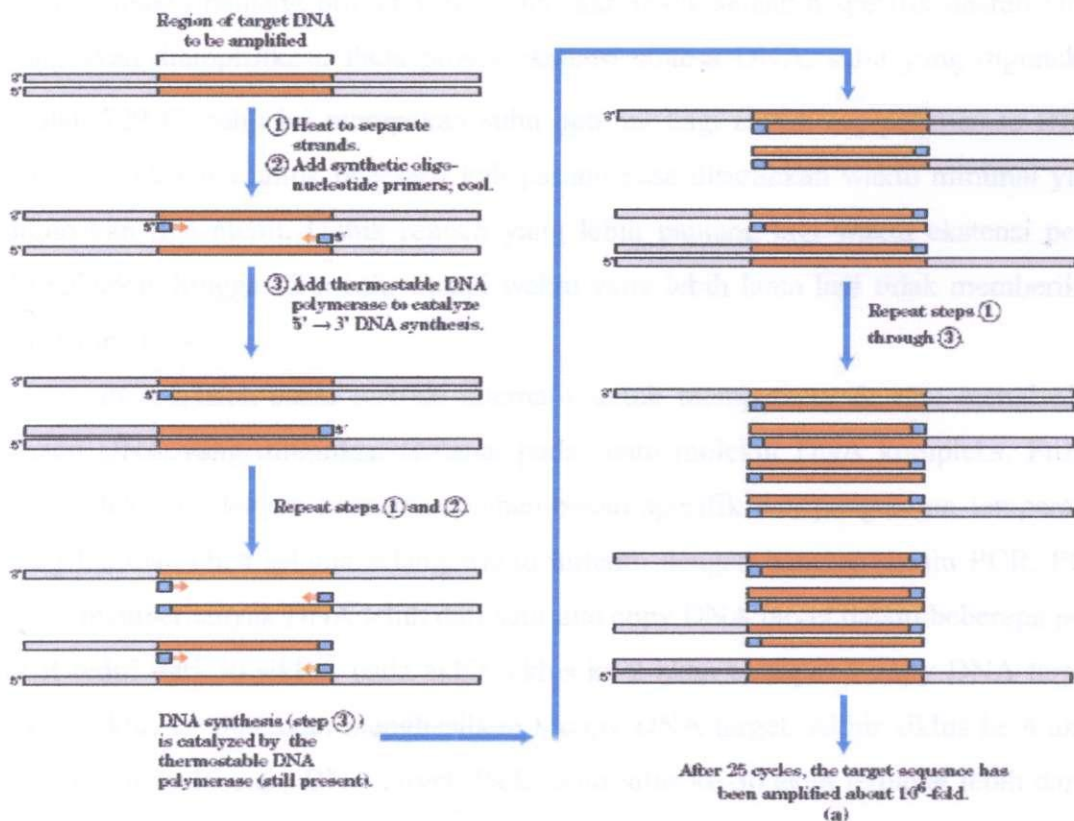
2.6. Reaksi Polimerisasi Berantai

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 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 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.

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 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 diampifikasi;
- 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 94⁰ C, tahap annealing, 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 72⁰ 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.

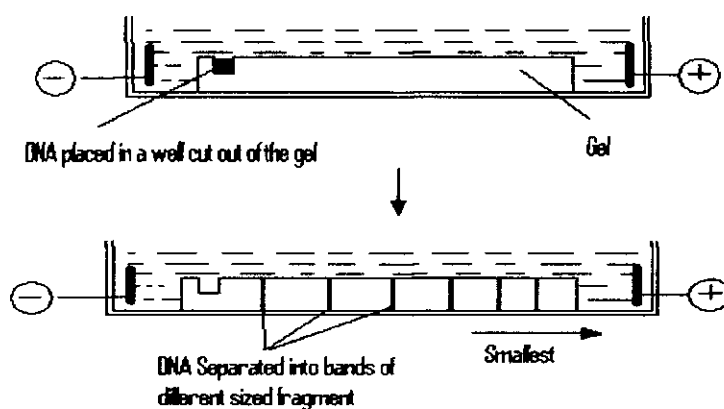
PCR adalah suatu metode alternatif untuk memperbanyak atau mengisolasi urutan DNA yang diinginkan terdapat pada suatu molekul DNA kompleks. Proses PCR dilakukan dengan kombinasi bahan-bahan spesifik dan pengaturan temperatur yang berubah-ubah selama selang waktu tertentu dengan bantuan mesin PCR. PCR 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 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 persamaan sekuen antara 93-97 % dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies.

2.7. Gel Elektroforesis

Elektroforesis dengan gel agaros 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 (Yowono, 2006).



Gambar 3. 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. 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 °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 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.

2.8. 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).