

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL DNA
POLIMERASE TAHAN PANAS DARI AIR KAWAH
DENGAN METODE PCR 16S rDNA**



**Diajukan Oleh :
Galih Bagus Pangestu
22164787A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA**

2020

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL DNA
POLIMERASE TAHAN PANAS DARI AIR KAWAH
DENGAN METODE PCR 16S rDNA**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

Galih Bagus Pangestu

22164787A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA**

2020

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul:

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL DNA POLIMERASE
TAHAN PANAS DARI AIR KAWAH
DENGAN METODE PCR 16S rDNA**

Oleh:

Galih Bagus Pangestu 22164787A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi Fakultas

Farmasi Universitas Setia Budi

Pada tanggal: 3 Agustus 2020

Mengetahui, Fakultas Farmasi
Universitas Setia budi



Prof. Dr. Apt. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc.,

Pembimbing,

Dr. Ana Indrayati, M.Si. Pembimbing

Pendamping,

D. Andang Arif Wibawa, S.P., M.Si.

Penguji :

1. Dr. Ismi Rahmawati, M., Si., Apt
2. apt. Lucia Vita Inandha Dewi, S.Si., M.Sc.
3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si

1.....
2.....
3.....
4.....

PERSEMBAHAN

“Orang-orang yang sukses telah belajar membuat diri mereka melakukan hal yang seharusnya dikerjakan ketika hal itu memang harus dikerjakan, entah mereka menyukai atau tidak.”

(Aldus Huxley)

“Wahai orang-orang yang beriman! Taatilah Allah dan taatilah Rasul (Muhammad), dan Ulil Amri (pemegang kekuasaan) diantara kamu. Kemudian, jika kamu berbeda pendapat tentang sesuatu, maka kembalikanlah kepada Allah (Al-Qur'an) dan Rasul (sunnahnya), jika kamu beriman kepada Allah dan hari kemudian. Yang demikian itu lebih utama (bagimu) dan lebih baik akibatnya.”

(QS. *An-Nisa* :59)

Ilmu itu tidaklah didapatkan dengan jasad yang santai (HR Muslim)

Dalam keridhoan Allah SWT skripsi ini kupersembahkan kepada:

ALLAH SWT dan Nabi Muhammad SAW

Kedua orangtua (Bapak dan Ibu) dan Keluarga terdekat (Adik-Adikku)

Teman-teman se-angkatan 2016 dan saudara seumat muslim

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 28 Juli 2020



Galih Bagus Pangestu

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kehadiran ALLAH SWT yang telah melimpahkan segala Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL DNA POLIMERASE TAHAN PANAS DARI AIR KAWAH DENGAN METODE PCR 16S rDNA ”**, dengan harapan dapat memberikan sumbangan terhadap kemajuan dunia pendidikan khususnya di bidang farmasi.

Skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari beberapa pihak, baik material maupun spiritual. Penulisan menyadari sepenuhnya bahwa proses penyusunan skripsi ini telah melalui banyak sekali hambatan dan rintangan, namun berkat dorongan dan bantuan dari berbagai pihak, maka akhirnya penulisan ini dapat diselesaikan.

1. Prof. Dr. apt. R.A. Oetari, S.U., M.M., M.Sc. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.
2. Dr. apt. Wiwin Herdwiani, M.Sc. selaku Kepala Progam Studi S-1 Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.
3. Apt. Reslely Harjanti, S. Farm, M.Sc. selaku pembimbing akademik atas segala bimbingan dan pengarahannya.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si. selaku pembimbing utama yang telah bersedia mendampingi, membimbing, memberi suntikan semangat serta bertukar pikiran sehingga membantu terselesaikannya skripsi ini.
5. D. Andang Arif Wibawa, S.P.,M.Si. selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan, memberikan semangat, dan tidak pernah lelah sehingga membantu terselesaikan skripsi ini.
6. Kedua orang tua saya Bapak Suyanto dan Ibu Nanik Utami tercinta atas doa, kasih sayang, semangat, dan dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
7. Adikku sayang Keisya Oktavia Wiyanti Putri terimakasih atas dukungan, semangat dan doanya.

8. Dyah Putri Utami terimakasih atas dukungan, nasihat, doa, dan semangatnya untuk membantu menyelesaikan skripsi ini.
9. Teman-teman S-1 Farmasi angkatan 2016 yang tidak bisa disebutkan satu persatu terima kasih atas dukungan dan doanya.
10. Lindya Aprila Agung Fistya Rini yang selalu mengajari dan membantu penulis serta memberikan motivasi selaku rekan penelitian.
11. Sahabat sejati Ifan, Madyo, Darwan, Amri, Dicky, Iyan, Waskito, Bagus, dan Rizky terimakasih dukungan, doa dan salam kangen untuk kalian, kalian yang terbaik.
12. Teman-teman penulis Widia, Lindya, Bagus, Silvy, Titis, Anfal, Windari dan yang tidak bisa disebutkan satu demi satu yang telah membantu penulisan skripsi ini.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	ii
PERSEMBAHAN	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTI SARI.....	xiii
BAB <u>I</u> PENDAHULUAN	15
A. Latar Belakang	15
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Kegunaan Penelitian.....	3
BAB <u>II</u> TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Bakteri Termofilik.....	4
1. Struktur membran sel	5
2. Chaperonin	5
3. Struktur DNA girase.....	6
B. Enzim Termostabil.....	6
C. DNA Polimerase Termostabil	7
D. Pentingnya DNA Polimerase Termostabil	7
E. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Cara Kerja Enzim	8
F. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri.....	8
G. Pengecatan Gram.....	10
H. Uji Identifikasi Bakteri	12
1. Uji oksidase	12
2. Uji katalase	12
3. Uji O/F.....	12

4. Uji <i>Motil Indol Ornithin</i> (MIO).....	12
5. Uji <i>Methyl Red</i> dan <i>Voges Proskauer</i>	12
6. Uji gula	13
7. Uji TSIA (<i>Tryptic Sugar Iron Agar</i>)	13
I. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	13
J. Komponen PCR	13
1. Templat DNA	14
2. Primer	14
3. Enzim DNA polimerase	15
4. <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i> (dNTP).....	15
5. Larutan buffer.....	15
K. Tahapan PCR.....	16
1. Denaturasi.....	16
2. Penempelan primer (Annealing)	16
3. Pemanjangan primer (Extension)	16
L. Gen 16S rRNA	17
M. LANDASAN TEORI	18
N. Hipotesis.....	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	20
A. Populasi dan Sampel	20
1. Populasi penelitian	20
2. Sampel penelitian	20
B. Variabel Penelitian.....	20
1. Identifikasi variabel utama	20
2. Klasifikasi variabel utama	20
3. Definisi operasional variabel utama	21
C. Jalannya Penelitian.....	21
1. Sterilisasi alat dan bahan	21
2. Pembuatan medium Luria Bertani Borth.....	22
3. Pembuatan medium Luria Bertani Agar.....	22
4. Pengambilan sampel.....	22

5. Isolasi mikroorganisme dari lumpur kawah Dieng	22
F. Skema Penelitian.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
A. Hasil Penelitian	27
1. Isolasi dan Karakterisasi Mikroorganisme	27
2. Aktivitas DNA polimerase termostabil	31
BAB V PENUTUPAN	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema Teknik Sampling Lumpur Kawah Dieng	25
Gambar 2. Skema Isolasi Mikroorganisme Termofilik.....	25
Gambar 3. Skema isolasi bakteri dari lumpur kawah Sikidang Dieng	25
Gambar 4. Skema Penelitian	26

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Pengamatan Makroskopik Isolat	27
Tabel 2. Hasil Pengamatan Mikroskopik Isolat	28
Tabel 3. Hasil Uji Biokimia Isolat (Verma Ambika 2014).....	29
Tabel 4. Hasil Uji Biokimia Isolat (Bish Satpal 2011)	29
Tabel 5. DNA polymerase termostabil.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Pengambilan sampel lumpur dari 3 titik	39
Lampiran 2. Hasil Pengambilan Sampel.....	40
Lampiran 3. Hasil media pertumbuhan mikroorganisme dengan media LB cair.	42
Lampiran 4. Foto isolat diinkubasi dengan Waterbatch pada suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$	43
Lampiran 5. Hasil pengamatan secara makroskopik.....	44
Lampiran 6. Hasil pengamatan secara mikroskopik dengan pewarnaan Gram	45

INTI SARI

PANGESTU, G. B., 2020, ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL DNA POLIMERASE TAHAN PANAS DARI AIR KAWAH DENGAN METODE PCR 16S rDNA, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang mampu hidup di suhu yang tinggi yaitu sekitar 50-80°C. Bakteri termofilik dapat menghasilkan enzim yang sangat penting salah satunya DNA polimerase termostabil. Enzim ini sangat penting dalam biologi molekuler mempunyai kegunaan yaitu sebagai analisis diversitas mikroba, diagnosis penyakit analisis kontaminan patogen, rekayasa genetika dan forensik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri termofilik yang berasal dari air kawah dan mengetahui aktivitas DNA polimerase dengan metode 16S rDNA.

Sampel berupa lumpur yang berasal dari kawah Dieng diambil dengan diambil pada kedalaman 20-30 cm pada 3 titik. Sampel diisolasi untuk memperoleh bakteri termofilik sehingga diperoleh koloni. Koloni diidentifikasi secara makroskopik, mikroskopis berupa pewarnaan Gram, uji biokimia yang berdasarkan literatur review dan metode 16S rDNA untuk memperoleh DNA polimerase termostabil yang berdasarkan *literatur review*. *Literatur review* berdasarkan nama jurnal, nomor ISSN jurnal, dan tahun terbit jurnal yang berasal dari Scholar dan NCBI sehingga diperoleh 9 jurnal.

Identifikasi secara makroskopik didapatkan hasil isolat dengan karakteristik bentuk bundar, elevasi (datar dan cembung), tepi (rata dan tak beraturan), dan berwarna putih. Pewarnaan Gram didapatkan hasil isolat dengan bentuk sel *Bacillus* dan bersifat Gram positif. Uji biokimia yang berdasarkan *literatur review* didapatkan hasil positif mengandung katalase dan terdapat isolat lainnya yang positif mengandung H₂S dan motilitas. Identifikasi dengan metode 16S rDNA yang berdasarkan literatur review yang memiliki aktivitas DNA polimerase terdapat pada bakteri yang berupa *Brevibacillus* sp yang memiliki ukuran ±2700 bp.

Kata kunci: DNA polimerase termostabil, 16s rDNA, Termofilik

ABSTRACT

PANGESTU, G. B., 2020, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA PRODUCING DNA POLYMERASE FROM LOW WATER WITH 16S rDNA PCR METHOD, SKRIPSI, FACULTY OF PHARMACY, UNIVERSITY OF SETIA BUDI, SURAKARTA.

Thermophilic bacteria is a bacteria that can live in a high temperature around 50-80⁰C. Bacterial thermophilic can produce an enzyme crucial one thermostable DNA polymerase. This enzyme is very important in molecular biology have utility named as the analysis of the diversity of microbes, diagnosis disease analisis contaminant pathogens, engineering genetics and forensics. This study aims to determine the characteristics of thermophilic bacterial isolates from crater water and to determine the activity of DNA polymerase using the 16S rDNA method .

Samples of mud from the crater Dieng taken in the download at a depth of 20-30 cm at 3 points. Samples were isolated to obtain a thermophilic bacterium thus obtained colony.Colony identification macroscopic, microscopic form of Gram staining , biochemical tests based on the literature review and 16S rDNA method for obtaining DNA polymerase thermostable based on literature review . Review literature based on journal names, journal ISSN numbers, and journal publication years originating from Scholar and NCBI in order to obtain 9 journals.

Identification macroscopic showed isolates with characteristic rounded shape, elevation (flat and convex) , edges (flat and irregular) , and the color white . Gram staining was obtained from the isolate with the form of *Bacillus* cells and Gram positive. Biochemical test that is based on literature review showed positive for catalase and there are more positive isolates containing H₂S and motility. Identification with the 16S rDNA method based on literatur reviews that have DNA polymerase activity found in bacteria in the form of *Brevibacillus* sp which has a size of ± 2700 bp .

Keywords: Thermostable DNA polymerase, 16s rDNA, Thermophilic

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia mempunyai keanekaragaman ekosistem yang luas sehingga potensial sebagai sumber eksplorasi berbagai jenis mikroba. Keragaman hayati mikroba ini perlu digali secara sistematis dan mendalam melalui eksplorasi sebanyak mungkin mikroba dari lingkungan yang sangat ekstrim. Salah satu lingkungan ekstrim yang berada di Indonesia adalah daerah vulkanik yang memiliki aneka ragam mikroba yang memiliki pertumbuhan yang berbeda dengan mikroba pada umumnya. Mikroba yang tumbuh di daerah vulkanik cenderung memiliki kondisi yang ekstrim seperti suhu, pH, dan konsentrasi garam yang tinggi (Suryani *et al* 2009).

Daerah vulkanik terdapat berbagai macam bakteri salah satunya bakteri yang tumbuh dalam kondisi ekstrim yaitu bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan berbagai macam enzim termostabil. Bakteri termofilik memiliki kemampuan untuk bertahan hidup dan berkembang biak pada suhu tinggi. Hal ini disebabkan karena kandungan enzim, ribosom, protein dan konstituen-konstituen lainnya lebih stabil dari pada bakteri mesofil. Selain kandungan yang terdapat pada bakteri termofilik yaitu adanya membran lipid pada bakteri termofilik yang kaya akan asam lemak jenuh sehingga membentuk ikatan hidrofobik yang jauh lebih kuat (Suryani *et al* 2009).

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang dapat menghasilkan suatu enzim termostabil yang dapat diisolasi dari lingkungan geothermal seperti sumber air panas dan bakteri termofilik mampu hidup di suhu yang tinggi yaitu sekitar 50-80°C (Brown 2005). Bakteri termofilik yang telah diidentifikasi dapat menghasilkan enzim yang potensial seperti amilase, DNA polimerase, xilanase, kitinase, lipase dan protease (Dominguez *et al* 2005).

Bakteri termofilik memiliki potensi yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi karena dapat menghasilkan suatu enzim termostabil yang mana enzim ini dapat perhatian yang sangat besar. Enzim ini sangat penting dalam proses industri karena stabil pada suhu tinggi (Rakshit 2003), Fungsi

enzim ini salah satunya untuk teknik biologi molekuler penelitian dan diagnostik (enzim yang memproses DNA dan RNA). Enzim ini mempunyai kemampuan dalam mengubah makanan, tepung, sintesis organik, pengelolaan sampah, pembuatan kertas dan industri kulit. Hingga saat ini terdapat lebih dari 70 genus dan 140 spesies bakteri termofil yang telah berhasil diisolasi dari berbagai lingkungan termis (George 2001). Enzim termostabil juga berperan penting dalam penggunaannya yang efektif dan menguntungkan serta mampu meningkatkan kecepatan reaksi, kelarutan reaktan, dan produk yang bersifat nonvolatil serta mampu memiliki kemampuan mengurangi kontaminan dari mikroba mesofilik (Martin *et al* 2007).

Enzim termostabil yaitu *Taq DNA polimerase* adalah suatu enzim yang dihasilkan oleh bakteri *Thermus aquaticus* yang tahan terhadap panas. Enzim tersebut akan membentuk reaksi amplifikasi pada suhu tinggi sehingga reaksi PCR dapat dilakukan secara otomatis hal ini disebabkan penambahan enzim. Untuk memperoleh suatu enzim maka perlu tahapan isolasi (Yuwono 2005). Isolasi DNA adalah suatu teknik dasar yang berada pada biologi molekuler sehingga dapat dikembangkan menjadi penelitian yang kompleks mengenai informasi genetik dari suatu organisme (Lister 2013). Teknik tersebut mempunyai berbagai macam metode salah satunya dengan *Polymerase Chain Reaction* (Wilson *et al* 2010).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu teknik amplifikasi potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua primer oligonukleotida (Giri 2004). PCR menggunakan sebuah alat yang disebut *Thermal Cycler* PCR yang mampu mengamplifikasi fragmen DNA secara *in vitro*. Hasil dari proses amplifikasi DNA dari pengamatan keberadaan DNA, PCR konvensional yang dilakukan pada akhir reaksi menggunakan gel agarosa yang berfungsi untuk membaca hasil PCR dengan elektroforesis (Rina 2012). Penelitian ini akan dilakukan tahapan isolasi dan identifikasi bakteri penghasil DNA polimerase tahan panas yang berasal dari air kawah dengan metode PCR 16S rDNA. Faktor penentuan menggunakan metode ini karena lebih spesifik, selain itu gen 16S rDNA memiliki daerah yang bersifat lestari (*conserved*) dan

daerah yang bersifat tidak tetap (*variable*), sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi kelompok organisme yang berbeda pada suatu habitat yang spesifik berdasarkan daerah yang mengalami perubahan urutan basa (Madigan *et al* 2012).

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas DNA Polimerase yang dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi dari sumber air kawah?
2. Bagaimana karakteristik isolat bakteri penghasil DNA Polimerase tahan panas yang diidentifikasi secara molekuler dengan metode PCR 16S rDNA?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas DNA polimerase yang dihasilkan oleh bakteri yang telah diisolasi dari sumber air kawah.
2. Untuk mengetahui karakteristik isolat bakteri yang menghasilkan DNA Polimerase tahan panas yang diidentifikasi secara molekuler dengan menggunakan metode PCR 16S rDNA.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan untuk menjadi dasar ilmiah tentang adanya DNA polimerase dengan metode PCR 16S rDNA dibidang farmasi dan memberikan informasi tentang eksplorasi DNA polimerase dari mikroorganisme termofilik yang berada di daerah sumber air kawah.