

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Streptomyces*

2.1.1 Klasifikasi *Streptomyces*

Streptomyces dapat diklasifikasikan sebagai berikut.

- Filum : Firmicutes
- Klas : Actinobacteri
- Ordo : Actinomycetales
- Sub Ordo : Streptomycineae
- Famili : Streptomycetaceae
- Genus : *Streptomyces*
- Spesies : *Streptomyces* sp.

(Madigan *et al.*, 2002)

2.1.2 Morfologi *Streptomyces*

Streptomyces merupakan bakteri tanah yang hidup pada hutan tropis, hutan gambut, dataran tinggi, daerah vulkano, kompos, tanah perkebunan, tanah pertanian, dan daerah kawasan *mangrove* (Madigan *et al.*, 2002; Korn and Jurgen, 2002).

Keberadaan *Streptomyces* di dalam tanah sangat melimpah, terutama pada tanah yang bersifat alkali dan netral dibandingkan pada jenis tanah yang asam. Beberapa jenis *Streptomyces* juga dapat ditemukan pada perairan (Madigan *et al.*, 2002).

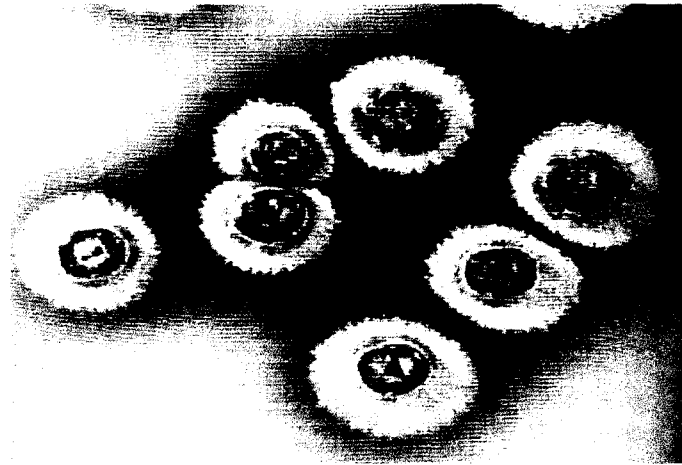
Streptomyces digolongkan dalam *Actinomycetes*, organisme tanah dengan sifat-sifat umum yang dimiliki oleh bakteri dan jamur yaitu *thread bacteria* (bakteri berhifa). *Streptomyces* digolongkan sebagai jenis bakteri berfilamen, dengan diameter hifa 0,5 -1,0 μm , bersifat Gram positif, berbentuk batang, bersifat aerob, dan mempunyai dinding sel *diaminopimelic* (DAP). Tidak seperti pada koloni bakteri yang dapat tumbuh dengan cepat, koloni *Streptomyces* muncul perlahan dan melekat erat pada Agar, menunjukkan suatu gumpalan atau butiran yang jelas pada kultur cair dan koloni tidak tembus cahaya (Korn and Jurgen, 2002).

Gambar 2.1 memperlihatkan bentuk-bentuk koloni *Streptomyces*. Pada koloni yang masih muda menunjukkan permukaan koloni yang halus atau berkerut, sedangkan pada koloni yang tua telah menunjukkan pertumbuhan hifa dan aerial miselium yang bercabang. Pertumbuhan miselium tersebut yang menyebabkan perubahan pada koloni muda dari bentuk permukaan halus atau berkerut menjadi suatu koloni yang kering dan berbentuk butiran serbuk, granula, atau beludru, dan membentuk berbagai macam pigmen (Madigan *et al.*, 2002; Horinouchi, 1996).

Beberapa bentuk sporofor dan tipe konidia pada *Streptomyces* dapat terlihat pada Gambar 2.2 dan Gambar 2.3. Tipe-tipe konidia tersebut merupakan salah satu karakteristik yang dapat digunakan dalam penggolongan jenis-jenis *Streptomyces* (Madigan *et al.*, 2002).

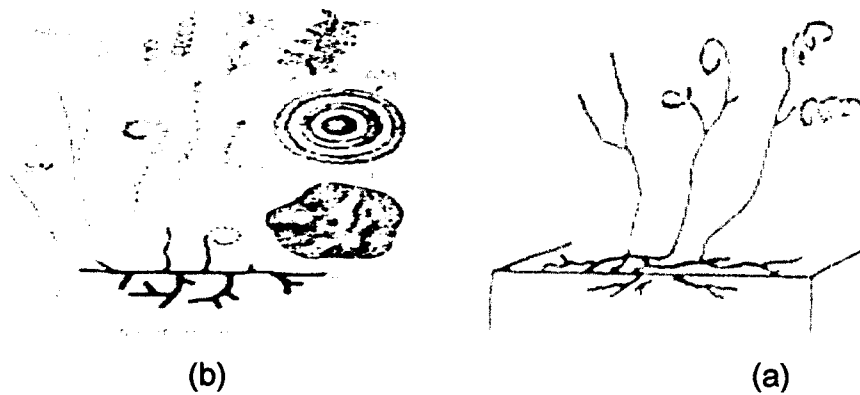


(a)



(b)

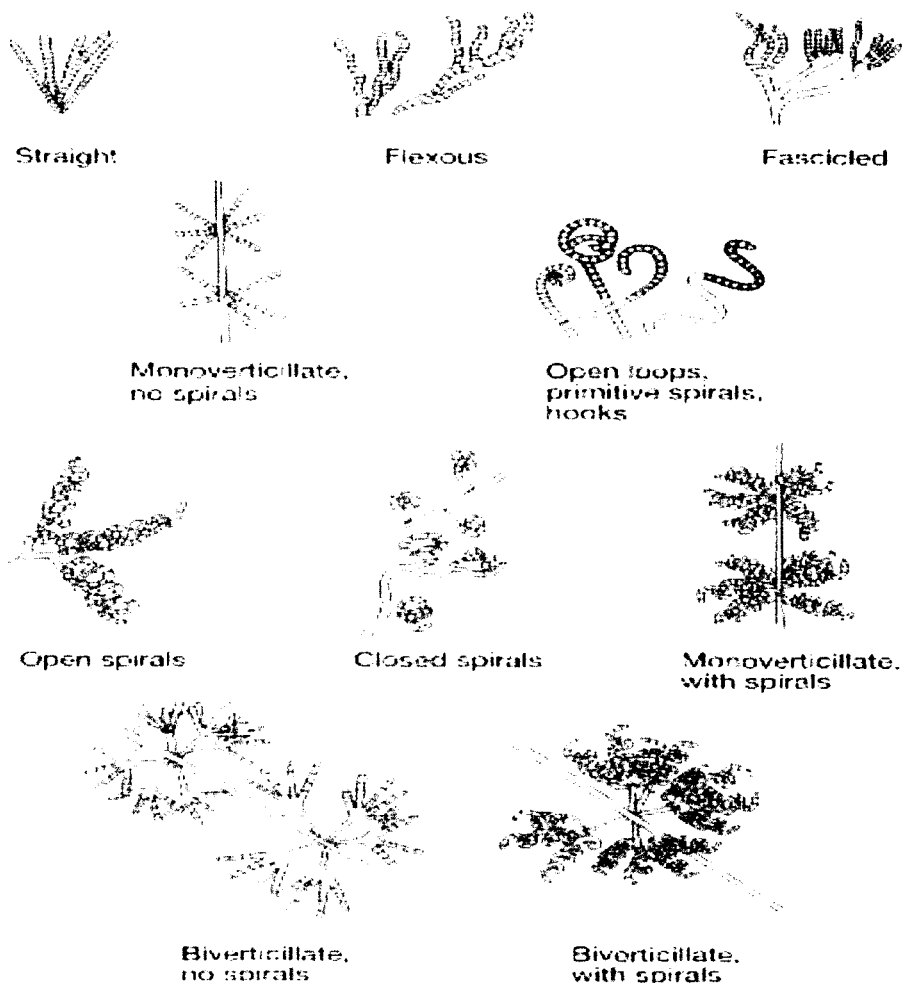
Gambar 2.1 Bentuk koloni *Streptomyces* (Madigan, *et al.*, 2002)
 a. Beberapa bentuk koloni *Streptomyces* dengan berbagai warna yang ditumbuhkan pada *casein-starch* Agar
 b. Koloni *Streptomyces coelicolor*



(b)

(a)

Gambar 2.2 Bentuk koloni yang representatif (Schlegel, 1994; Holt *et al.*, 1994)
 a. Penampang melintang pertumbuhan pada permukaan Agar
 b. Bentuk-bentuk pertumbuhan miselium substrat (SM), miselium udara (AM), dan sporofor yang khas



Gambar 2.3 Macam-macam tipe konidia pada *Streptomyces* (Madigan *et al.*, 2002)

2.1.3 Fisiologi *Streptomyces*

Streptomyces tumbuh optimum pada suhu 25⁰-35⁰C dengan pH 6,5-8,0, membentuk miselium yang mirip fungi dan membentuk spora yang disebut konidia. Tipe pembentukan spora *Streptomyces* dapat digunakan dalam penggolongan spesies (Holt *et al.*, 1994; Madigan *et al.*, 2002; Korn and Jugen, 2002).

Streptomyces mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit serta mendegradasi kasein, adenin, L-tirosin dan gelatin. *Streptomyces* merupakan

kemo organotrof, menggunakan reaksi redoks pada senyawa organik untuk mendapatkan energi. *Streptomyces* menghasilkan suatu aroma khas tanah sebagai hasil metabolisme, yaitu geosmin dengan struktur kimia trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol (Madigan *et al.*, 2002).

2.1.4 Tinjauan *Streptomyces* sebagai Penghasil Antibiotik

Keberadaan *Streptomyces* sebagai penghasil antibiotik terbesar sangat menarik perhatian. Jenis antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* antara lain aminoglikosida (streptomisin, neomisin, kanamisin, dan lain-lain), makrolida (eritromisin, oleandomisin, spiramisin, tetrasenomisin, aktinohordin, daunorubisin, tilosin, dan lain-lain), tetrasiklin, antrasiklin, aromatik (kloramfenikol), heterosiklik (polioksin), alisiklik (sikloheksimid), polipeptida (viomisin, aktinomisin) dan beberapa jenis lainnya (Richard, *et al.*, 1993). Beberapa jenis antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Beberapa jenis antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* (Korn and Jurgen, 2002)

No.	Jenis antibiotic	Spesies penghasil antibiotik
1.	Streptomisin	<i>S. griseus</i>
2.	Kanamisin A, B	<i>S. kanamyceticus</i>
3.	Higromisin B	<i>S. Hygroscopicus</i>
4.	Sepamisin A, B	<i>S. chartreusius</i>
5.	Thienamisin	<i>S. cattleya</i>
6.	Asam klavulanik	<i>S. clavuligerus</i>
8.	Oleandomisin	<i>S. antibioticus</i>
9.	Lankasidin	<i>S. violaceoniger</i>
10.	Pristinamisin	<i>S. pristinaespiralis</i>
11.	Oksitetrasiklin	<i>S. rimosus</i>
12.	Linkomisin	<i>S. lincolnensis</i>
13.	Kloramfenikol	<i>S. venezuelae</i>
14.	Nistatin	<i>S. noursei</i>

Tabel 2.1 Beberapa jenis antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* (Korn and Jurgen, 2002) (Lanjutan)

No.	Jenis antibiotik	Spesies penghasil antibiotik
15.	Amphoterasin B	<i>S. nodosus</i>
16.	Kandisin	<i>S. griseus, S. canescens</i>
17.	Tunikamisin	<i>S. chartreusius</i>
18.	Daunorubisin	<i>S. coeruleus</i>
19.	Doksorubisin	<i>S. peuceticus var. caesius</i>
20.	Ditrisarubisin	<i>S. S. cyaneus</i>
21.	Mitomisin C	<i>S. caespitosus</i>
22.	Aktinomisin	<i>S. antibioticus</i>
23.	Sarkomisin	<i>S. erythrochromogenes</i>
24.	Higromisin B	<i>S. hygrosopicus</i>
25.	Avermektin	<i>S. avermitilis</i>
26.	Milbemisin	<i>S. hygrosopis ssp. ureolacrimosus</i>
27.	Monensin	<i>S. cinnamomensis</i>
28.	Salinomisin	<i>S. albus</i>
29.	Fosfopinotrisin	<i>S. viridochromogenes</i>

2.2 Mangrove

Hutan *mangrove* adalah hutan yang terdiri dari pohon-pohon dan semak-semak yang tumbuh antara garis pasang rendah minimum dan daerah yang dicapai oleh pasang tinggi-pasang rendah. Hutan *mangrove* tumbuh baik di daerah pantai yang terlindung dari serangan ombak dan arus laut, dan di daerah yang dipengaruhi oleh air sungai, misalnya laguna, teluk, dan muara sungai. Air sungai membawa zat hara dalam lumpur yang sangat diperlukan oleh tumbuhan *mangrove*, karena air pasang tinggi menyebabkan persediaan zat hara menurun (Soeswati dan Sudomo, 1994).

Menurut Arief (2001), hutan *mangrove* merupakan formasi hutan khas daerah tropika. Hutan *mangrove* terdapat di seluruh daerah lautan tropika dari Pantai Timur Afrika tropika sampai Indonesia, bagian sub tropika Australia, dan Selandia Baru. Pertumbuhan hutan *mangrove* yang baik dan subur

terdapat di Asia Tenggara terutama Malaysia, Sumatera, Kalimantan, dan Irian. Luas hutan *mangrove* yang tersebar di sepanjang pantai seluruh kepulauan Indonesia dari Sumatera sampai Irian adalah 3.627.119 ha dan merupakan 2,5-3% dari luas seluruh hutan di Indonesia. Lebih dari 2/3 terdapat di Irian, sedangkan daerah lain yang mempunyai hutan *mangrove* sangat luas adalah Sumatera Selatan dan Riau (Anonim, 1988). Menurut Arief (2001), 877.000 ha (20%) ditetapkan sebagai hutan konservasi dengan jumlah rata-rata tegakan sebesar 40,7 m³/ha untuk *Rhizophora* sp.; 13,6 m³/ha untuk *Bruguiera* sp.; 11,6 m³/ha untuk *Avicenia* sp.; dan 7,6 m³/ha untuk *Sonneratia* sp. Luas hutan *mangrove* di Jawa Timur adalah 40.722,84 ha, dan dari luas tersebut 21.529,25 ha terdapat dalam kawasan hutan dan 20.872,35 ha berada di luar kawasan hutan (Anonim, 2003).

Dari segi ekologi, ekosistem *mangrove* digolongkan sebagai ekosistem yang berada antara ekosistem darat dan air yang disebut ekoton dan membentuk perpaduan antara makhluk-makhluk laut dan daratan (Maltby dalam Khiatuddin, 2003).

Ciri-ciri ekosistem *mangrove* adalah: (1) tanah yang mendukung tumbuhan hidrofit, (2) wilayah didominasi oleh lahan basah yang tidak terdrainase atau berada dalam keadaan cukup basah untuk periode agak panjang, sehingga menimbulkan kondisi anareob, (3) wilayah yang terdiri dari substrat (bukan tanah seperti pasir, kerikil, dan batu yang jenuh dengan air), atau ditutupi oleh genangan air dangkal dalam beberapa waktu tertentu atau permanen (Hammer dan Bastian, 1989).

Hutan *mangrove* terbuka terhadap arus sungai dan pasang tinggi-pasang rendah. Jika air pasang tinggi mulai surut, maka zat hara dan tanah

terbawa ke laut sekaligus. Tanah hutan *mangrove* adalah campuran antara endapan lumpur, pasir, lempung, dan zat-zat organik. Gerakan pasang tinggi-pasang rendah yang terus-menerus dan aliran sungai mengakibatkan keadaan tanah kurang stabil dan terendam, kandungan udara berkurang, kadar garam dan keasaman (pH) tinggi. Lokasi khusus ini menyebabkan banyak kerugian dan kesulitan bagi penghuninya. Tidak banyak yang bertahan di habitat hutan *mangrove* yang sukar ini. Penghuni hutan *mangrove* harus mengatasi banyak masalah lain yaitu lebih banyak mendapat sinar matahari, suhu rata-rata lebih tinggi dibandingkan daerah lain, terbuka terhadap angin pantai yang kuat, pengaruh garam yang terus menerus, serta curah hujan dan kelembaban yang rata-rata lebih rendah dari daerah lain. Tumbuhan dan satwa yang hidup di hutan *mangrove* memperlihatkan berbagai penyesuaian terhadap kondisi tersebut (Kyuma, 2000).

Tanah hutan *mangrove* pada lapisan atas mengandung 65% senyawa organik yang sebagian besar dapat terakumulasi secara cepat, sedang di bagian lapisan tanah di bawah 80 cm mempunyai kandungan mineral sedikit. Selain itu, tanah hutan *mangrove* mempunyai kandungan nitrogen, selulosa dan hemiselulosa tinggi, serta fosfor dan kalium rendah (Kyuma, 2000).

Menurut Kyuma (2000) meskipun tanah hutan *mangrove* miskin akan fosfor dan kalium, namun keduanya dapat meningkatkan fiksasi nitrogen, dan kandungan nitrogen merupakan penentu kesuburan tanah hutan *mangrove*.

Hutan *mangrove* menerima bahan pencemar dari hulu melalui aliran sungai dan lahan kering di sekitar yang dihanyutkan oleh air hujan. Aliran *netto* bahan pencemar dari lingkungan yang diterima oleh hutan *mangrove* yaitu NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- merupakan unsur hara tanaman dan bakteri pengurai.

Jumlah unsur hara yang masuk ke hutan *mangrove* tergantung kondisi ekosistem hulu misalnya kerimbunan hutan, curah hujan, kondisi tanah, dan tingkat erosi. Pasokan unsur hara yang melimpah menyebabkan *mangrove* memiliki kemampuan tinggi untuk berproduksi melalui proses fotosintesis. Pasokan unsur hara sampah organik yang dibawa air secara reguler sangat penting bagi konsumen primer sebagai bahan makanan (Khatuddin, 2003) dengan anggapan 40% dari sampah organik tersebut mengandung unsur C (Mann, 1999).

Keragaman spesies di kawasan *mangrove* lebih besar dibandingkan dengan ekosistem darat atau air, karena terjadi interaksi yang saling memperkuat di antara organisme. *Mangrove* termasuk salah satu ekosistem yang paling produktif dalam menghasilkan zat organik selain muara sungai dan hutan tropis. Zat organik yang dihasilkan merupakan sumber makanan berbagai jenis mikroorganisme (bakteri, jamur, protozoa, dan lain-lain) dan makroorganisme (serangga, siput, kepiting, kerang, ikan, udang, dan lain-lain). Produktivitas yang tinggi tersebut dapat dicapai, karena *mangrove* menerima secara permanen limbah unsur hara yang berasal dari daratan di sekeliling *mangrove* (Miller, 1998).

2.3 Tinjauan Tentang Antibiotik

2.3.1 Pengertian Antibiotik

Beberapa pengertian antibiotik adalah sebagai berikut : (1) antibiotik merupakan semua senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme hidup atau yang diperoleh melalui sintesis yang memiliki indeks kemoterapi tinggi, yang manifestasi aktivitasnya terjadi pada dosis sangat rendah secara spesifik

melalui inhibisi proses vital tertentu pada mikroba (Turpin dan Velu dalam Joke (1991)); (2) antibiotik merupakan produk dari metabolisme sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan organisme lain, walaupun digunakan dalam konsentrasi rendah (Crueger and Crueger, 1984); (3) antibiotik merupakan senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme lain dan dapat menghambat atau bahkan menghancurkan mikroba lain meskipun dalam konsentrasi rendah (Betina, 1983); (4) antibiotik merupakan senyawa yang setelah mengalami absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi selektif ataupun efektif, sanggup menghambat multiplikasi mikroba atau mematakannya di berbagai daerah huni di dalam organisme dan karena hanya sedikit toksik atau tidak toksik pada dosis yang sesuai, tetap selaras dengan aktivitas sel normal pada manusia dan hewan, bekerja secara selektif toksik terhadap proses sintesis metabolik bakteri (Joke, 1991). Dengan demikian pengertian antibiotik secara umum adalah senyawa kimia yang diproduksi dari hasil metabolisme sel hidup, dalam kadar yang sangat rendah dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan memiliki sasaran molekuler yang spesifik.

2.3.2 Metabolit sekunder

Metabolit sekunder merupakan metabolit yang disintesis oleh beberapa mikroorganisme tertentu, tetapi tidak langsung diperlukan untuk pertumbuhan sel. Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, namun metabolit-metabolit tersebut dapat juga bersifat sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup. Produk-produk ini biasanya dihasilkan pada fase stasioner. Keterlambatan pembentukan produk metabolit sekunder disebabkan oleh kepadatan populasi yang tinggi, sehingga nutrisi terbatas (Wibowo, 1990).

Menurut Sudibyo (1991), ada enam karakteristik metabolit sekunder, yaitu (1) setiap metabolit sekunder adalah spesifik untuk satu atau beberapa spesies, (2) metabolit sekunder diduga tidak diperlukan untuk pertumbuhan sel, (3) produksi metabolit sekunder sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, (4) beberapa metabolit sekunder diproduksi dengan kemiripan struktur antara satu dengan yang lain, misalnya galur *Streptomyces* memproduksi 32 macam anthrasiklin, (5) banyak metabolit sekunder yang diproduksi sebagai suatu kelompok dengan struktur hampir sama, dan komposisinya dipengaruhi oleh medium serta kondisi pertumbuhan, dan (6) biosintesis metabolit sekunder dikontrol oleh mekanisme yang berbeda dengan kontrol dalam metabolit primer.

2.4 Ribonucleid Acid (RNA)

Ribonucleid acid (RNA) adalah suatu polimer yang terdiri dari molekul-molekul nukleotida. Meskipun banyak persamaan dengan *Dioxyribonucleid Acid* (DNA), RNA mempunyai perbedaan dengan DNA yaitu : (a) bagian pentosa RNA adalah ribosa, sedangkan bagian pentosa DNA adalah deoksiribosa, (b) bagian pentosa RNA adalah ribosa, sedangkan bagian pentosa DNA adalah deoksiribosa, (c) bentuk molekul DNA adalah *double helix*. Bentuk molekul RNA merupakan rantai tunggal yang berlipat sehingga menyerupai rantai ganda, (d) RNA mengandung basa adenin, guanin, dan sitosin seperti pada DNA, tetapi tidak mengandung timin dan sebagai gantinya RNA mengandung urasil. Dengan demikian bagian basa pirimidin RNA berbeda dengan bagian basa pirimidin RNA, dan (e) jumlah guanin dalam molekul RNA tidak perlu

sama dengan sitosin, demikian pula jumlah adenin tidak harus sama dengan urasil (Benyamin, 2000).

Berdasarkan tempat terdapat dan fungsinya, RNA dibedakan menjadi 3 macam yaitu : (a) *Messenger RNA (mRNA)*, mRNA berbentuk pita tunggal, terdapat dalam nukleus dan dicetak oleh DNA dalam suatu proses transkripsi. Setelah mRNA selesai dicetak, maka keluar dari nukleus melalui pori dinding nukleus menuju ribosom. Jadi fungsi mRNA adalah membawa informasi genetik yang diterima dari DNA, (b) *Transfer RNA (tRNA)*, tRNA dibuat dalam nukleus. Setelah menempatkan diri dalam sitoplasma tRNA memiliki molekul-molekul basa yang berpasangan. Bagian basa-basa yang tidak berpasangan mempunyai struktur menukik berupa bulatan yang disebut struktur daun semanggi, (c) *Ribosomal RNA (rRNA)*, rRNA terdapat dalam ribosom meskipun dibuat dalam nukleus dan berjumlah kira-kira 80% dari seluruh RNA. Molekul berupa pita tunggal, tidak bercabang dan fleksibel. Ada bagian di mana basa-basa komplementer membentuk pasangan-pasangan. Sel-sel berinti sejati (eukariot) memiliki 3 macam rRNA yaitu 28S rRNA, 18S rRNA, dan 5S rRNA. Sedangkan sel-sel yang tidak berinti sejati (prokariot) juga memiliki 3 macam rRNA yaitu 23S rRNA, 16S rRNA, dan 5S rRNA (Klug and Cumming, 2003). Huruf S merupakan singkatan dari *Svedberg* yaitu suatu ukuran kecepatan sedimentasi partikel pada ultra sentrifugasi ((Klug and Cumming, 2003).

2.4.1 *Ribosomal Ribonucleid Acid (rRNA)*

Ribosomal Ribonucleid Acid (rRNA) merupakan salah satu makromolekul paling menarik, karena molekulnya merupakan kerangka

ribosomal yang berperan dalam mekanisme translasi. Semua rRNA identik secara fungsional dalam produksi protein. Meski demikian sekuen di bagian-bagian tertentu terus berevolusi dan mengalami perubahan pada tingkat struktur primer sambil tetap mempertahankan struktur sekunder dan tersier yang homolog (Old and Primose, 1989).

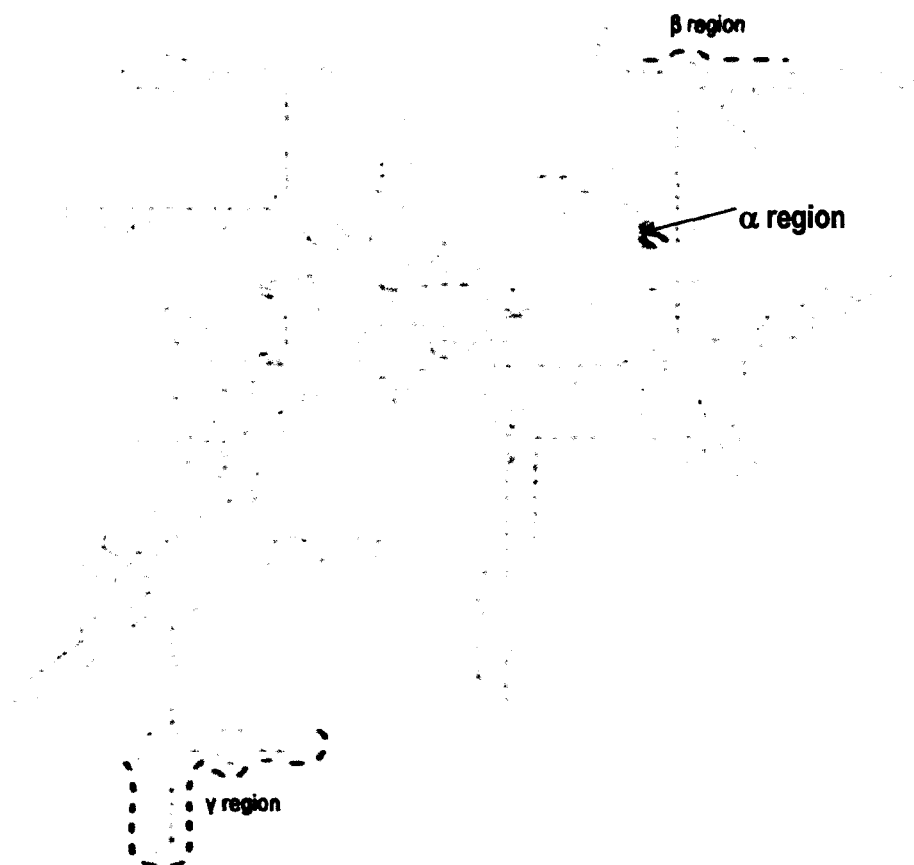
Molekul rRNA ini tersusun oleh daerah-daerah konservasi yang lebih tinggi dan lebih rendah secara evolusioner. Beberapa segmen rRNA berevolusi kembali, sedangkan bagian lain cukup bervariasi, sehingga dapat dipakai untuk menggolongkan dari tingkat genus hingga ke spesies. Sifat yang sangat konservasi memungkinkan untuk mensintesis primer universal untuk proses PCR yang mampu melekat pada sekuen terkonservasi dari gen rRNA ketiga domain filogenik : Archaea, Bacteria, dan Eukaryota. Daerah yang sangat terkonservasi tersebut seringkali dipakai menjadi situs pelekatan primer dalam rangka mengamplifikasi RNA secara *in vitro* dari DNA *template* yang telah diisolasi (Benyamin, 2000).

rRNA prokariot terdiri dari 5S rRNA, 16S rRNA, dan 23S rRNA. 5S rRNA telah digunakan untuk pengukuran filogenetik, namun karena ukuran yang kecil (kira-kira hanya 120 nukleotida), maka informasi keragaman yang diperoleh dari sekuen ini sangat terbatas. 16S dan 23S rRNA berukuran panjang sekitar 1500 dan 3000 nukleotida dan mempunyai daerah sekuen konservatif (tidak banyak berubah dari satu organisme ke organisme lain), sedangkan daerah pada rRNA yang bersifat mudah berubah (*variable sequence*) sangat berguna untuk pencirian organisme dalam takson yang lebih sempit. Daerah inilah yang digunakan sebagai *signature sequence* (Klug and Cumming, 2003).

2.4.2 Gen 16S rRNA *Streptomyces*

Gen 16S rRNA (16-Svedberg *ribosomal Ribonucleid acid*) merupakan penanda evolusi yang terdapat pada semua sel makhluk hidup, mempunyai laju evolusi rendah, mempunyai fungsi konstan dalam translasi protein, terdistribusi secara universal, mempunyai urutan menetap di antara jarak filogenetik yang luas, dan mempunyai jumlah nukleotida 1500 pb. Gen 16S rRNA disebut juga gen 16S rDNA (ribosomal DNA) (Clarridge, 2004).

Terdapat 3 tempat gen 16S rRNA yang menunjukkan derajat variabilitas tinggi pada *Streptomyces coelicolor* yaitu γ (158- 278 bp), α (982-988 bp), dan β (1.102-1.122 bp) (Anderson and Wellington, 2001).



Gambar 2.4 Daerah variabel nukleotida β 1102–1122 bp, α 982–998 bp, dan γ 158–203 bp dari struktur sekunder 16S rRNA *Streptomyces coelicolor* (Anderson and Wellington, 2001)



Gambar 2.5 Perbandingan 16S rDNA *Streptomyces* sp. dari 158–278 bp (Anderson and Wellington, 2001)

Beberapa metode spesifik yang dipergunakan untuk identifikasi spesies menurut Anderson and Wellington (2001) dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Metode spesifik untuk identifikasi spesies (Anderson and Wellington, 2001)

Jenis	Metode	Identifikasi
Total kromosom	- Hibridisasi DNA - RFLP, LFRFA	Genus ke spesies Species ke galur
Klon secara random atau amplifikasi fragmen DNA	Isolasi dan kloning pada fragmen hibridisasi	Spesies ke galur
Protein pengkode gen atau fragmen gen	Isolasi dan sekuensing pada gen atau fragmen	Spesies to galur
16S / 23S rRNA	Membandingan analisis sekuensing	Famili, genus, spesies

Sekuen keseluruhan dari 1.500 bp diperlukan untuk mengidentifikasi spesies baru sampai tingkat sub spesies. Dengan mengetahui urutan gen tersebut sampai sekarang telah ditemukan lebih dari 1.500 spesies

Streptomyces, sedangkan di Indonesia telah dipublikasikan sebanyak 11 isolat lokal yaitu *Streptomyces* sp. NT471 (1480 bp) (Isik *et al.*, 2005), *Streptomyces asiaticus* (1483 bp), *Streptomyces cangkringensis* (1482 bp), *Streptomyces javensis* (1471 bp), *Streptomyces yogyakartaensis* (1481 bp), *Streptomyces rhizosphaericus* (1480 bp), *Streptomyces* sp. D6RI (1476 bp), *Streptomyces* sp. A33RI (1461 bp), *Streptomyces* sp. A23R2 (1471 bp), *Streptomyces* sp. C9P3 (1470 bp), *Streptomyces* sp. B13P3 (Sembiring *et al.*, 2000).

Sampai sekarang, banyak genom *Streptomyces* sebagai sumber keanekaragaman hayati belum diteliti. Data urutan rRNA *Streptomyces* tersebut sangat penting untuk pembedaan analisis, biosintesis metabolit sekunder dalam menghasilkan antibiotik baru, dan aspek biologi yang lain (Paradkar, *et al.*, 2003).

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik pelipatgandaan atau amplifikasi urutan DNA spesifik secara *in vitro* dengan jalan polimerisasi simultan dari *primer* yang komplementer dengan untai DNA target (Sambrook *et al.*, 2001). Teknik ini memberi peluang untuk pelipatgandaan antara dua *region* DNA yang diketahui hanya di dalam tabung reaksi (*in vitro*) tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). *Polymerase chain reaction* merupakan teknik yang memiliki beberapa keunggulan yaitu sensitif, karena dapat melipatgandakan DNA dalam jumlah sedikit dan memiliki spesivitas tinggi, serta waktu yang diperlukan cukup singkat (kurang dari 24 jam) (Nelson and Michael, 2000).

Sistem kerja PCR dilandasi oleh struktur DNA dalam keadaan *native*, DNA merupakan untai ganda yang terdiri dari dua buah pita berpasangan antipararel satu dengan yang lain dan berikatan dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terbentuk antara basa-basa komplementer, yaitu antara basa adenin (A) dengan timin (T) dan guanin (G) dengan sitosin (S). Basa-basa terikat dengan molekul gula, deoksiribosa, dan setiap satu molekul gula berikatan dengan molekul gula melalui ikatan fosfat (Brown, 2001).

2.5.1 Komponen *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Komponen utama proses PCR adalah (1) *template* DNA (*Deoxyribonucleid acid*), yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) *primer* oligonukleotida, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 bp) yang digunakan sebagai pemula sintesis rantai DNA. *Primer* Oligonukleotida yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai *template* DNA pada ujung 5'-fosfat, sedangkan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai *template* DNA yang lain. Apabila memungkinkan, *primer* yang dipilih adalah yang mengandung G (guanin) + S (sitosin) = $\pm 50\%$ untuk menghindari adanya polipurin atau polipirimidin dan menghindari struktur sekunder dan komplementer antara *primer-dimer*. Stok *primer* harus diencerkan menjadi ± 10 mM, dan disimpan pada suhu 4°C , (3) dioksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Stok dNTP harus berada dalam keadaan netral (pH 7). Konsentrasi antara 20 sampai 200 μM dapat memberikan hasil optimal. Keempat dNTP harus berada dalam jumlah yang ekuivalen untuk meminimalkan kesalahan

yang terjadi, (4) enzim polimerase DNA. *Taq* polimerase merupakan enzim polimerase DNA yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA dan memiliki keaktifan dalam suhu tinggi, sehingga penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklusnya dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin, (5) jumlah siklus. Jumlah optimum siklus tergantung pada konsentrasi awal DNA target. Jumlah siklus yang terlalu banyak akan menyebabkan latar belakang yang tidak spesifik dalam jumlah yang banyak, (6) elektroforesis. Hasil PCR dapat dideteksi secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Elektroforesis merupakan metoda pemisahan yang didasarkan pada pergerakan DNA dalam medan listrik. Oleh karena DNA mempunyai muatan negatif (gugus fosfat), maka selama elektroforesis DNA akan bergerak ke kutub positif. Kecepatan pergerakan DNA selama elektroforesis tergantung pada ukuran DNA dan konsentrasi agarosa. Setelah elektroforesis, gel direndam dalam larutan EtBr (*ethidium bromide*) untuk pewarnaan DNA dan diamati di bawah sinar ultra violet (Sambrook *et al.*, 2001).

2.5.2 Prinsip *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Prinsip utama teknik PCR adalah (1) *denaturasi* (pemanasan). Mula-mula *template* DNA dipanaskan di dalam campuran yang mengandung *primer* oligonukleotida serta keempat dNTP. Selama proses pemanasan, DNA untai ganda akan membuka menjadi DNA untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu pemanasan tinggi (95⁰C) selama 1-2 menit menyebabkan putusanya ikatan hidrogen di antara basa-basa yang komplemen, (2) *annealing* (penempelan). *Primer* akan menuju daerah spesifik yang komplementer

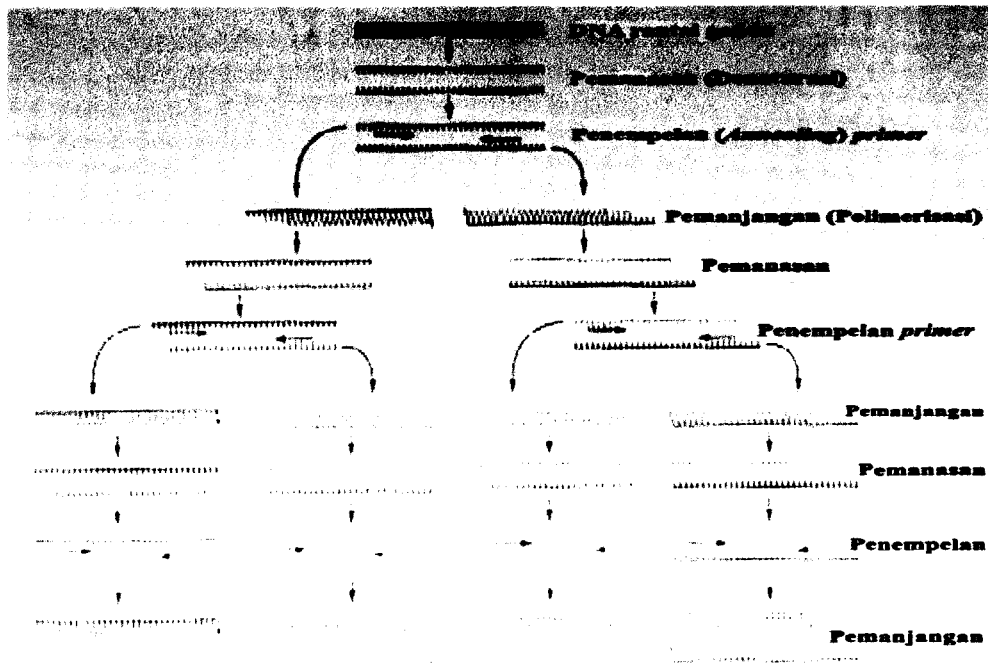
dengan *primernya*. Pada proses penempelan, dilakukan dengan cara menurunkan suhu reaksi menjadi 55°C untuk memberi kesempatan *primer* menempel pada urutan target. *Primer* akan membentuk ikatan hidrogen dengan *template* pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen *primer*. Selanjutnya polimerase DNA akan berikatan, sehingga ikatan hidrogen tersebut menjadi kuat dan tidak putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi/pemanjangan, (3) *extention/polimerisasi/pemanjangan*. Proses pemanjangan dapat terjadi karena enzim polimerase DNA. Umumnya reaksi pemanjangan rantai DNA urutan target terjadi dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 72°C. Pada suhu ini polimerase DNA akan melakukan proses polimerase rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada *template* DNA. Setelah terjadi polimerisasi, rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA *template*. *Deoxyribonucleid acid* (DNA) rantai ganda yang terbentuk dengan adanya ikatan hidrogen antara rantai DNA *template* dengan rantai DNA baru hasil polimerisasi selanjutnya akan didenaturasi lagi dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 95°C. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya akan berfungsi sebagai *template* bagi reaksi polimerisasi berikutnya (Sambrook *et al.*, 2001).

2.5.3 Amplifikasi Urutan DNA (*Deoxyribonucleid Acid*)

Amplifikasi urutan DNA spesifik secara *in vitro* dengan jalan polimerisasi simultan dari *primer* yang komplementer dengan untai DNA target sehingga terjadi pelipatgandaan dua *region* DNA yang diketahui (Sambrook *et al.*, 2001).

Mula-mula *template* DNA dipanaskan di dalam campuran yang mengandung *primer* oligonukleotida serta keempat dNTP. Selama proses

pemanasan menyebabkan putusya ikatan hidrogen di antara basa-basa yang komplemen, sehingga DNA untai ganda akan membuka menjadi DNA untai tunggal. *Primer* akan menuju daerah spesifik yang komplementer *primernya*. *Primer* yang telah menempel akan mengalami pemanjangan dengan dNTP yang komplemen pada sisi 3'. Jadi seandainya terdapat satu *copy* gen sebelum siklus berlangsung, maka setelah siklus, satu *copy* siklus akan menjadi dua *copy*, sesudah 2 siklus akan menjadi empat *copy*, setelah tiga siklus akan menjadi delapan *copy* dan diulangi lagi menjadi 25-30 siklus, sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target di dalam campuran reaksi. Produk pertama dari hasil amplifikasi akan berfungsi sebagai *template* untuk siklus kedua, demikian seterusnya (Gambar 2.6). Apabila siklus pemanasan, penempelan, dan pemanjangan diulang-ulang, maka DNA target akan dilipatgandakan. Produk yang dihasilkan adalah segmen DNA untai ganda yang panjangnya ditentukan oleh jarak antara kedua *primer*. Keuntungan pelipatgandaan dengan PCR adalah memperbanyak urutan target dari preparasi *crude* DNA maupun RNA, sehingga tidak perlu dilakukan pemurnian *template*. Dengan metode ini, suatu segmen DNA yang panjangnya 110 pasang basa (5×10^{-19} mol) dapat digandakan 200.000 kali setelah siklus reaksi selama 20 menit, sehingga perbanyakan dapat dilakukan dengan cepat (Brown, 2001).



Gambar 2.6 Skema amplifikasi PCR (Sambrook *et al.*, 2001)

2.6 Sekuen DNA

Terdapat dua macam teknik sekuen DNA yang dikenal saat ini, yaitu metode enzimatis Sanger dan metode degradasi kimia Maxam-Gilbert. Meskipun kedua teknik mempunyai prinsip yang sangat berbeda, tetapi keduanya menghasilkan populasi oligonukleotida berlabel radioaktif yang dimulai dari titik tertentu dan berakhir di sembarang titik pada residu atau kombinasi residu tertentu. Setiap basa pada DNA mempunyai kesempatan yang sama untuk menjadi ujung penghentian, sehingga setiap populasi akan mengandung campuran oligonukleotida yang panjangnya ditentukan oleh basa pada *template* DNA. Populasi nukleotida ini kemudian dipisahkan dengan elektroforesis di bawah kondisi tertentu, sehingga dapat membedakan DNA-DNA yang panjangnya berbeda walaupun hanya satu nukleotida. Pada saat populasi tersebut dimasukkan ke dalam jalur yang

bersebelahan pada gel sekuen DNA, maka urutan nukleotida sepanjang itu dapat dibaca dengan autoradiogram (Sambrook *et al.*, 2001).

2.7 Analisis Sekuen DNA

Analisis data hasil sekuensing DNA dilakukan dengan komputer, yang meliputi dua tahap, yaitu (1) pengumpulan data sekuen. Memasukkan informasi sekuen dan hasil autoradiograf gel ke dalam *file* komputer. Secara otomatis *scanner* laser akan membaca jejak gel dan memasukkan data, (2) analisis sekuen DNA, yang meliputi 4 cara yaitu : (a) berdasarkan urutan polipeptida hasil deduksi atau sekuen DNANYa sendiri, yang kemudian dibandingkan dengan bank data dari sekuen lain, (b) pencarian seluruh tapak sasaran endonuklease restriksi, sehingga menghasilkan peta menyeluruh dan tepat, (c) pengulangan tandem atau pengulangan terbalik, sehingga terbentuk lingkaran jepit rambut (*hairpin loop*) di dalam salah satu rantai DNA atau RNA hasil transkripsi, dan (d) secara konseptual yaitu translasi dari satu rantai menjadi protein tiga kerangka baca, sehingga pada kedua rantai akan diperoleh 6 kerangka baca. Salah satu kerangka baca yang terbuka (ORF/*Open Reading Frames*) merupakan suatu kerangka yang tidak mencakup kodon terminasi. Suatu kerangka baca terbuka yang panjang mungkin menunjukkan bahwa terdapat daerah pengkode polipeptida yang sebelumnya tidak diketahui (Old dan Primrose, 1989).