



**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI DARI PANTAI PAPUMA JEMBER
BERDASARKAN SEKUEN DNA PENGKODE 16S rRNA**

SKRIPSI

Oleh

**Ratno Dwinanto
NIM 061810401098**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2011**



**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI DARI PANTAI PAPUMA JEMBER
BERDASARKAN SEKUEN DNA PENGKODE 16S rRNA**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Ratno Dwinanto
NIM 061810401098**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2011**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Robianah dan Ayahanda Umbaran yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan dan doa yang tiada henti-hentinya.
2. semua keluarga yang telah mendukung dan memberi motivasi dalam menempuh pendidikan.
3. semua guru-guru yang telah mendidik dan mengajarku, terima kasih yang tak terhingga atas ilmu yang kalian berikan.
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.”

(Terjemahan Surat Al-Mujaadilah ayat 11)

“Seseorang akan tetap pandai selama dia menuntut ilmu, namun jika ia menganggap dirinya telah berilmu (cepat puas) maka berarti ia bodoh.”

(Sofyan bin Ayyinah)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Ratno Dwinanto

NIM : 061810401098

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "*Identifikasi Isolat Bakteri Dari Pantai Papuma Jember Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi mana pun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian berjudul "*Studi Molekuler Diversitas dan Aktivitas Bakteri dari Perairan Pantai Watu Ulo Jember: Upaya Pemanfaatan Potensinya untuk Mengatasi Masalah Permasalahan Lingkungan*" dan dibiayai program Hibah Strategis Nasional Batch I 2009 DIKTI, DIPA Universitas Jember atas nama Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S. Si., M. Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 7 Juni 2011

Yang menyatakan,

Ratno Dwinanto
NIM 061810401098

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI DARI PANTAI PAPUMA JEMBER
BERDASARKAN SEKUEN DNA PENGKODE 16S rRNA**

Oleh

Ratno Dwinanto
NIM 061810401098

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr.rer.nat. Kartika Senjarini S. Si., M. Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Sattya Arimurti, S. P., M. Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Identifikasi Isolat Bakteri Dari Pantai Papuma Jember Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si
NIP 197509132000032001

Sattya Arimurti, S.P., M.Si
NIP197403311999032001

Anggota I

Anggota II

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr., Sc
NIP 195510221982121001

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si
NIP 196805031994011001

Mengesahkan,
Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA, Ph. D
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Identifikasi Isolat Bakteri Dari Pantai Papuma Jember Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA; Ratno Dwinanto, 061810401098; 2011: 38 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

16S rRNA merupakan salah satu RNA ribosomal yang terdapat pada prokariot, di samping 5S dan 23S rRNA (Pangastuti, 2006). Sekuen 16S rRNA telah sering digunakan sebagai dasar identifikasi prokariota dan keberhasilannya telah banyak dilaporkan. Lebih jauh, metode identifikasi bakteri menggunakan sekuen 16S rRNA, memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan metode konvensional diantaranya karena kecepatan dan keakuratan hasilnya. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Huda (2010) terhadap sampel bakteri dari perairan Pantai Papuma, Jember telah berhasil mengisolasi 4 isolat bakteri dari Pantai Papuma Jember, yaitu WU 021004, WU 021009, WU 021015*, dan WU 021042. Keempat isolat tersebut terbukti memiliki aktivitas hidrolitik dalam mendegradasi beberapa jenis polimer, diantaranya adalah tween 40 dan 80 sehingga perlu dilakukan proses identifikasi sebagai langkah lanjutan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi 4 isolat bakteri dari perairan Pantai Papuma Jember secara molekuler berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA serta untuk mengetahui hubungan filogenetiknya. Isolat bakteri yang digunakan yaitu 4 isolat bakteri yang berasal dari Pantai Papuma Jember yaitu WU 021004, WU 021009, WU 021015*, dan WU 0210042 yang berpotensi mempunyai aktifitas hidrolitik.

Penelitian dilakukan dengan tahap-tahap yaitu: Isolasi DNA genom yang dilakukan dengan metode *freeze and thaw*. Kemurnian dan stabilitas profil genom isolat dapat ditentukan dengan BOX PCR. Identifikasi dilakukan dengan mensekuensing DNA hasil purifikasi produk PCR 16S rRNA. *Alignment* sekuen 16S

rRNA dari masing-masing isolat dibandingkan dengan database gen 16S rRNA menggunakan BLAST.

DNA genom berhasil diisolasi dan selanjutnya digunakan sebagai *template* dalam proses PCR. Hasil BOX PCR menunjukkan bahwa hanya isolat bakteri WU 021004 yang memiliki profil pita DNA yang sama dengan profil pita DNA WU 021004 hasil pengujian Huda (2010). Hal ini menunjukkan kestabilan profil genetik yang mengindikasikan kemurnian isolat tersebut. Isolat WU 021004 selanjutnya diidentifikasi dengan mengamplifikasi sekuen DNA pengkode 16S rRNA-nya. Proses PCR sekuen 16S rRNA menggunakan 2 pasang primer dengan tujuan untuk mendapatkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA secara utuh. Identifikasi sekuen DNA pengkode 16S rRNA ditentukan dengan urutan nukleotidanya melalui proses sekuensing. Proses sekuensing dan pengeditan dengan program *Bioedit Software* menghasilkan data sekuen DNA pengkode 16S rRNA sepanjang 902 pasang basa untuk dianalisa dengan program BLAST. Berdasarkan hasil analisa sekuen dengan menggunakan program BLAST, sekuen DNA pengkode 16S rRNA isolat bakteri WU 021004 memiliki kemiripan tertinggi dengan sekuen DNA pengkode 16S rRNA bakteri *Pseudomonas alcaliphila* strain D11 dengan prosentase kemiripan 99%.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul: "Identifikasi Isolat Bakteri Dari Pantai Papuma Jember Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada :

1. Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S. Si., M. Si., dan Sattya Arimurti, S. P., M. Si., selaku Dosen Pembimbing yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, saran serta motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr., Sc, dan Dr. Kahar Muzakhar, S. Si selaku Dosen Penguji, yang telah banyak memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Dra. Dwi Setyati, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam masa perkuliahan sampai dengan penyelesaian penyusunan skripsi ini;
4. Bapak dan Ibu Dosen, serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala keikhlasan hati membantu penulis selama dalam masa perkuliahan;
5. rekan kerja dan teman-teman seperjuangan Nurul Huda, Herawati, Dina, Bernet, Hilda, Ryza, Ratna, Lusi, Dewi Riska, Esti, teman-teman dari Laboratorium Mikrobiologi serta Fakultas Kedokteran , terima kasih atas kerjasama, dukungan serta bantuan yang diberikan selama penelitian;
6. teman-teman di jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember angkatan 2006, 2005 dan 2004 terima kasih atas kebersamaan, persaudaraan dan tempat berbagi suka dan duka;

7. semua saudara/i seperjuangan di Nurul Haq dan Nurul Muttaqin yang telah menjadi tempat diskusi, menimba ilmu, dan menempa diri selama perkuliahan;
8. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga do'a, bimbingan dan semangat yang telah diberikan semua pihak kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis sangat mengharapkan segala masukan yang bersifat kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, Juni 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 16S rRNA Sebagai Basis Identifikasi Dan Menentukan Pohon Filogeni	4
2.2 Analisis Filogeni	8
2.3 Sekuensing DNA.....	10
2.4 BOX PCR.....	15

BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.2.1 Alat.....	17
3.2.2 Bahan	17
3.3 Prosedur Penelitian.....	18
3.3.1 Isolasi DNA Genom.....	18
3.3.2 BOX PCR Untuk Menjaga Kemurnian dan Stabilitas Profil Genom Isolat	19
3.3.3 Amplifikasi DNA Pengkode 16S rRNA	19
3.3.4 Purifikasi DNA Hasil PCR	20
3.3.5 Analisis Sekuen 16S rRNA	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1. Isolasi DNA Genom Isolat Bakteri WU 021004, WU 021009, WU 021015* dan WU 021042	22
4.2. Stabilitas Profil Genetik Melalui BOX PCR Untuk Menentukan Kemurnian Isolat	23
4.3. Amplifikasi Gen Pengkode 16S rRNA	24
4.4. Purifikasi DNA Isolat Bakteri WU 021004 Hasil PCR	27
4.5. Analisis Sekuen 16S rRNA Isolat Bakteri WU 021004.....	28
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan.....	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Enam Belas Bakteri Yang Memiliki Kemiripan Terdekat Dengan Isolat Bakteri WU 021004 Berdasarkan Urutan Sekuen 16S rRNA.....	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Peta Variabilitas Sekuen Gen 16S rRNA Bakteri <i>E. coli</i> , Daerah Penempelan Primer dan Daerah Variabel.....	6
2.2 Pohon Filogenetik yang Menunjukkan Tiga Domain Kehidupan	10
2.3 Struktur Molekul dNTP dan ddNTP	12
2.4 Prinsip Metode Sanger Dengan Pewarnaan Fluoresen Dilakukan Pada Primer.....	14
2.5 Prinsip Metode Sanger Dengan Pewarnaan Fluoresen Pada ddNTP	14
2.6 Elektroferogram	15
2.7 Hasil BOX PCR Sekuen Repetitif Berbagai Strain <i>Eschericia coli</i>	16
4.1 Hasil Elektroforesis Genom Isolat Bakteri WU 021004, WU 021009, WU 021015* dan WU 021042.....	23
4.2 Hasil Elektroforesis DNA Genom Empat Isolat Bakteri yang Diampifikasi Dengan BOX PCR	24
4.3 Strategi Penggunaan Primer 27f, 907r, 533f dan 1492r Untuk Amplifikasi Sekuen 16S rRNA Isolat WU 021004.....	25
4.4 Hasil Elektroforesis Produk PCR Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA Dari Isolat WU 021004.....	26
4.5 Hasil Elektroforesis Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA Isolat Bakteri WU 021004 Hasil Purifikasi.....	27
4.6 Hasil Homologi Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA dari Isolat Bakteri WU 021004 dengan <i>Pseudomona alcaliphila</i> strain D11.....	31
4.7 Pohon Filogeni yang Menunjukkan Hubungan Kekerabatan Isolat WU 021004 dengan Bakteri yang Terdapat di <i>Gene Bank</i>	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A Komposisi Media dan Larutan	39
B Sekuen 16S rRNA Utuh Isolat Bakteri WU 021004 Editing Hasil Sekuensing Dengan Primer 27F, 907R, 533F dan 1492R.....	40

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	: <i>base pair</i> (pasangan basa)
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
dNTP	: deoxinukleosida trifosfat
ddNTP	: dideoxinukleosida trifosfat
EtBr	: Ethidium Bromida
µg	: mikrogram
mg	: miligram
ml	: mililiter
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NA	: <i>Nutrien Agar</i>
NB	: <i>Nutrien Broth</i>
PBS	: Phosphat Buffer Saline
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
rRNA	: Ribosomal RNA
S	: Svedberg (satuan koefisien sedimentasi)
TBE	: Tris Boric EDTA