

**IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI KITINOLITIK ISOLAT
LUMPUR MANGROVE MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

**Oleh:
INTAN NOVILIA
NIM. 14630071**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI KITINOLITIK ISOLAT
LUMPUR MANGROVE MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

**Oleh:
INTAN NOVILIA
NIM. 14630071**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang Untuk
Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI KITINOLITIK ISOLAT
LUMPUR MANGROVE MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

**Oleh:
INTAN NOVILIA
NIM. 14630071**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 25 Juni 2021**

Pembimbing I



**Dr. akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19770925 200604 1 003**

Pembimbing II



**A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002**

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

**IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI KITINOLITIK ISOLAT
LUMPUR MANGROVE MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA**

SKRIPSI

**Oleh:
INTAN NOVILIA
NIM. 14630071**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 26 Juni 2021**

**Penguji Utama : Eny Yulianti, M.Si
NIP. 19760611 200501 2 006**

(.....
)

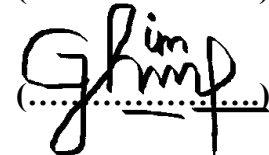
**Ketua Penguji : Dewi Yuliani, M.Si
NIP. 19880711 20160801 2 067**

(.....
)

**Sekretaris Penguji : Dr. akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19770925 200604 1 003**

(.....


**Anggota Penguji : A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002**

(.....


**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Intan Novilia
NIM : 14630071
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Identifikasi Molekular Bakteri Kitinolitik Isolat Lumpur Mangrove Menggunakan Gen 16S rRNA

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila ini di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 26 Juni 2021
Yang membuat pernyataan,



Intan Novilia
NIM. 14630071

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Dengan rasa hormat, terima kasih, dan penghargaan setinggi-tingginya karya tulis ini dipersembahkan kepada:

Bapak Musta'ran dan Ibu Nurmini

Terimakasih atas segala doa, support, serta pengorbanan yang tiada henti-hentinya mengalir untuk mengantarkanku menjadi orang yang berpendidikan dan mengerti arti perjuangan dalam kehidupan.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat, Taufiq, dan Hidayah-Nya tiada henti dan tiada batas kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“IDENTIFIKASI MOLEKULAR BAKTERI KITINOLITIK ISOLAT LUMPUR MANGROVE MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA”**. Sholawat dan salam semoga senantiasa mengalun indah dan tulus terucap kepada Nabi Muhammad SAW, keluarganya, sahabatnya dan para umat serta pengikutnya.

Skripsi ini dibuat untuk memenuhi salah satu kriteria kelulusan yang ada di jurusan kimia. Skripsi ini dapat disusun karena dukungan, motivasi, serta bimbingan dari berbagai pihak. Tiada kata yang patut terucap untuk menguntai sedikit makna kebahagiaan ini. Oleh karena itu, izinkanlah penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H.Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Kajar Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku pembimbing utama yang dengan sabar memberikan ilmu, pengarahan, bimbingan, nasehat, waktu, tenaga, dan petunjuk selama penyusunan skripsi.

5. Ibu Dewi Yuliani M.Si selaku konsultan yang membantu penulis dalam menyempurnakan skripsi.
6. Ibu Eny Yulianti, M.Si selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan evaluasi dan saran dalam penulisan skripsi.
7. Bapak A. ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen agama yang telah banyak memberikan evaluasi dan saran dalam penyusunan skripsi ini khususnya di bidang keislaman.
8. Seluruh Dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Seluruh laboran dan staff administrasi Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
10. Kedua orang tua tercinta, Bapak Musta'ran dan Ibu nurmini yang telah menjadi orangtua terhebat dan selalu memberikan curahan kasih sayang, doa, ridho, nasehat, dukungan moral maupun materil. Tidak ada apapun di dunia ini yang dapat membalas semua yang telah kalian berikan, semoga Allah selalu memberikan perlindungan dan cinta kasih kepada Bapak dan Ibu.
11. Sahabat tersayang, Citra Firunika Amalia dan Andriatul Masruro yang selalu membantu dan memberikan masukan dari awal pembuatan skripsi ini.
12. Partner terbaik, Bapak Fery Rosyi Wardani yang telah mensupport penyelesaian skripsi ini hingga selesai.
13. Teman Kimia angkatan 2014 khususnya Kimia-C yang selalu kompak dalam suka maupun duka serta selalu memberikan ilmu dan bertukar pikiran dengan penulis.

14. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis selama ini.

Penyusun menyadari atas terbatasnya ilmu yang penyusun miliki. Penyusun skripsi ini tentu masih jauh dari sempurna. Untuk itu penyusun dengan senang hati mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan dalam penyusunan selanjutnya. Akhir kata, semoga segala bantuan dan doa dibalik penulisan ini menjadi berkah serta mendapat ganjaran oleh Allah SWT.

Malang, 26 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	vi
HALAM PERSEMBAHAN.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT	xvii
ملخص البحث	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kitin.....	8
2.2 Bakteri Kitinolitik	9
2.3 Enzim Kitinase	10
2.4 Isolasi DNA Menggunakan ddH ₂ O.....	11
2.5 Analisa Kualitatif Dan Kuantitatif DNA	12
2.6 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	13
2.7 Bioinformatika	15
BAB III. METODE PENELITIAN	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
3.2 Alat dan Bahan.....	17
3.2.1 Alat	17
3.2.2 Bahan	17
3.3. Tahap Penelitian.....	17
3.4. Cara Kerja.....	17
3.4.1 Peremajaan Dan Pengulturan Bakteri.....	17
3.4.2 Isolasi DNA Bakteri Metode ddH ₂ O.....	18
3.4.3 Uji Kualitatif DNA Menggunakan Gel Agarosa.....	18
3.4.4 Penentuan Konsentrasi DNA	18
3.4.5 Amplifikasi DNA Menggunakan PCR.....	19
3.4.6 Penentuan Urutan Nukleotida	19
3.4.7 Analisis Bioinformatika.....	20

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1 Peremajaan Bakteri	21
4.2 Isolasi DNA Menggunakan Metode ddH ₂ O.....	21
4.3 Amplifikasi DNA menggunakan PCR	24
4.4 Data Hasil Analisis Bioinformatika	26
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	30
5.1 Kesimpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

Table 4.1 Hasil Analisa Kuantitatif DNA	8
--	---

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur dan interaksi ikatan hidrogen pada kitin	20
Gambar 2.2	Amplikon gen kitinase <i>Serratia marcescens</i> B4A	20
Gambar 2.3	Proses PCR	20
Gambar 4.1	Elektroferogram DNA setelah ekstraksi	32
Gambar 4.2	Elektroferogram DNA setelah PCR.....	32
Gambar 4.3	Urutan DNA Bakteri Kitinolitik	43
Gambar 4.4	Pohon filogenetik bakteri kitinolitik	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Diagram Alir	34
Lampiran 2	Dokumentasi Penelitian	35
Lampiran 3	Pengolahan Data Menggunakan Bioinformatika	40

ABSTRAK

Novilia, Intan. 2021. **Identifikasi Molekular Bakteri Kitinolitik Isolat Lumpur Mangrove Menggunakan Gen 16s rRNA**. Pembimbing I: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M. P; Pembimbing II: M. Ghanaim Fasya, M. Si; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si.

Kata Kunci : Kitinase, Bakteri Kitinolitik, metode direct boiling, *Micrococcus Luteus*

Udang merupakan komoditas ekspor Indonesia dengan jumlah permintaan tertinggi di pasar dunia. Hal tersebut menyebabkan penimbunan limbah udang yang mengalami peningkatan setiap tahunnya (Sudaryati dan Evi, 2016). Limbah udang mengandung polimer kitin yang dapat diolah oleh enzim kitinase dari bakteri kitinolitik. Bakteri kitinolitik diisolasi dari lumpur Mangrove Bejay Bakau Resort Probolinggo dan uji fenotip menunjukkan jenis *Bacillus sp.* Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kekerabatan bakteri kitinolitik secara genotip menggunakan gen 16s rRNA.

Penelitian ini diawali dengan regenerasi isolat bakteri kemudian ditumbuhkan pada media cair dan dilanjutkan dengan ekstraksi DNA. Metode ekstraksi DNA yang digunakan yaitu *direct boilling* (ddH₂O). Hasil ekstraksi DNA diuji secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometer NanoDrop dan divisualisasikan menggunakan elektroforesis. DNA dengan kemurnian tinggi diamplifikasi menggunakan PCR dan diakhiri dengan proses sikuensing DNA. Hasil sikuensing diolah menggunakan software untuk memperoleh pohon filogenetik bakteri kitinolitik.

Ekstraksi DNA bakteri menggunakan metode *direct boiling* berhasil dilakukan dengan tingkat kemurnian (rasio 1,8-2,0) DNA sebesar 1,93. DNA hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan primer 16S yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis menunjukkan DNA berukuran 1300 bp. Hasil sikuensing DNA diolah secara komputasi dan dicocokkan dengan data di *GenBank* menunjukkan kekerabatan dengan *Micrococcus Luteus* (MT214287.1) berdasarkan pohon filogenetik.

ABSTRACT

Novilia, Intan. 2021. **Molecular Identification Of Chitinolytic Bacteria From Mangrove Mud Isolates Using 16S rRNA Gene.** Supervisor I: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M. P; Supervisor II: M. Ghanaim Fasya, M. Si; Consultant : Dewi Yuliani, M.Si.

Key Words : Chitinase, Chitinolytic Bacteria, Direct Boiling, *Micrococcus Luteus*

Shrimp is an Indonesian export commodity with the highest demand on the world market. This causes the accumulation of shrimps waste which has increased every years. Shrimp Waste contains chitin polymer which can be processed by the chitinase enzyme from chitinolytic bacteria. Chitinolytic bacteria were isolated from mangrove mud Bejay Bakau Resort Probolinggo and phenotype test showed the type of *Bacillus sp.* The purpose of this research is to find out genotypically which related to chitinolytic bacteria are using 16s rRNA gene.

This research began with the regeneration of bacterial isolates, than grown in liquid media and continued with DNA extraction. The DNA extraction method used is *direct boilling* (ddH₂O). The results of DNA extraction were tested quantitatively using NanoDrop spectrophotometer and visualized using electrophoresis. DNA with high purity is amplified using PCR and ends with DNA sequencing process. The results of the sequencing were processed using softwere to obtain the phylogenetic tree of chitinolytic bacteria.

The extraction of bacterial DNA using the direct boiling method was successfully carried out within a purity level (ratio of 1,8-2,0) DNA of 1,93. The extracted DNA was amplified using 16S primers visualized using electrophoresis showing 1300 bp sized DNA. Then the DNA was sequenced to obtain the base sequence of its genome. The DNA sequences were computationally processed and matched with data in GenBank showing a relationship with *Micrococcus Luteus* (MT214287.1) based on a phylogenetic tree.

مستخلص البحث

إنتان نوفيليا.(٢٠٢١). التعريف الجزيئي للبكتيريا الكيتينية في عزلات طين المنغروف باستخدام جين ١٦ س

. البحث العلمي. قسم الكيمياء ، كلية العلوم و التكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أعين الجنة الماجستير ؛ المشرف الثاني: محمد غنام فشى الماجستير؛ المستشار ديوي يولياني الماجستير

الكلمات المفتاحية: الكيتيناز ، البكتيريا المحللة للكيتين ، طريقة الغلي المباشر ، ميكروكوكوس سف

الجمبري هو سلعة تصدير إندونيسية ذات أعلى طلب في السوق العالمية. يؤدي هذا إلى تراكم مخلفات الجمبري التي تتزايد كل عام. تحتوي نفايات الجمبري على بوليمر الكيتين الذي يمكن معالجته بواسطة إنزيم الكيتيناز من البكتيريا المحللة للكيتين . تم عزل بكتيريا الكيتين من طين المنغروف في منتج بيجاي باكوا ريسورت فوروبولينجو و أظهر اختبار النمط الظاهري نوع باسيلوس سف كان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد العلاقة الوراثية بين البكتيريا المحللة للكيتين باستخدام جين ١٦ *rRNA*.

بدأ هذا البحث بتجديد العزلات البكتيرية ، ثم نمت في وسط سائل و استمر استخلاص الحمض النووي. طريقة استخراج الحمض النووي المستخدمة هي الغليان المباشر (*ddH₂O*). تم اختبار نتائج استخراج الحمض النووي كميًا باستخدام مقياس الطيف الضوئي نانودروف (*NanoDrop*) و تصور باستخدام الرحلان الكهربائي. تم تضخيم الحمض النووي عالي النقاء باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (*PCR*) و انتهى بعملية تسلسل الحمض النووي. تمت معالجة نتائج التسلسل باستخدام برنامج للحصول على شجرة النشوء و التطور للبكتيريا المحللة للكيتين. تم إجراء استخراج الحمض النووي البكتيري باستخدام طريقة الغليان المباشر بنجاح بمستوى نقاء (نسبة ١٠٨-٢٠٠) (فيستي ، ٢٠١٧) الحمض النووي ١.93. تم تضخيم الحمض النووي المستخرج باستخدام بادئات ١ ثنائية تم تصورها باستخدام الرحلان الكهربائي لإظهار الحمض النووي بحجم ١٣٠٠ نقطة أساس. ثم يتم ترتيب تسلسل الحمض النووي للحصول على التسلسل الأساسي لجينومه. تمت معالجة تسلسل الحمض النووي حسابياً ومطابقته مع البيانات الموجودة في جين بنك (*GenBank*) و التي تُظهر علاقة مع ميكروكوكوس سف بناءً على شجرة النشوء و التطور.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang merupakan komoditas ekspor Indonesia dengan jumlah permintaan tertinggi di pasar dunia. Berdasarkan Direktorat Jenderal Pengawasan Sumber Daya Kelautan dan Perikanan (2017), ekspor udang mencapai 124 ribu ton pada tahun 2015, 131 ribu ton pada tahun 2016, dan 138 ribu ton pada tahun 2017. Banyaknya permintaan ekspor udang beku menyebabkan penimbunan limbah udang yang mengalami peningkatan setiap tahunnya (Sudaryati dan Evi, 2016). Limbah tersebut hanya dimanfaatkan 30% sebagai bahan baku kerupuk, petis, terasi, pupuk, dan pakan (Kementrian Kelautan dan Perikanan, 2016). Senyawa kitin merupakan komponen utama pada limbah yang berasal dari hewan laut terutama udang beku berupa kulit, kepala dan ekor (Edward, dkk., 2016). Oleh sebab itu, dibutuhkan pengolahan lebih lanjut untuk mengurangi limbah kitin dan pemanfaatan yang lebih efisien.

Peningkatan jumlah limbah udang setiap tahunnya dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Pencemaran lingkungan yang disebabkan dapat berupa pencemaran udara, air dan tanah (Nurhayati, A., Zulfa dan Sunarno, 2018). Hal tersebut dapat mengganggu kehidupan manusia, hewan dan tumbuhan. Dalam Al-Qur'an surat ar-Rum ayat 41 telah dijelaskan bahwa kerusakan alam disebabkan karena perbuatan tangan manusia.

kepada seluruh makhluknya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S Al-Syu'ara (26) ayat 7.

أَظْهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا
لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ

Artinya: “Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan Karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar).” (QS. ar-Rum:41).

Kerusakan yang terjadi dapat menyebabkan bencana. Menurut Ibnu Katsir, berkurangnya tanaman-tanaman dan buah-buahan karena perbuatan maksiat yang dikerjakan penghuninya (Shihab, 2000). *Telah tampak kerusakan di darat* seperti kekeringan, paceklik, hilangnya rasa aman, dan *di laut* seperti ketenggelaman, berkurangnya hasil laut dan sungai, *disebabkan karena perbuatan manusia yang durhaka*, sehingga *akibatnya Allah mencicipkan* yakni merasakan sedikit *kepada mereka sebagian* akibat dari perbuatan dosa dan pelanggaran mereka, *agar mereka kembali* ke jalan yang benar (DEPAG, 2014). Terjadinya kerusakan di darat dan di laut menurut pendapat beberapa ulama yaitu terjadinya banjir besar, musim paceklik, kekurangan air, kematian sia-sia, gagal panen dan krisis ekonomi (Giyanto, dkk., 2017). Oleh sebab itu, pentingnya pengolahan limbah untuk menjaga lingkungan.

Pengolahan limbah kitin dapat dilakukan dengan dua cara yaitu kimiawi (Younes, dkk., 2014) dan enzimatis (Yesi, dkk., 2016). Pengolahan kitin secara enzimatis memanfaatkan enzim kitinase dari mikroorganisme (Oktavia, Mangunwidjaja dan Wibowo, 2012). Kitinase banyak dimanfaatkan pada bidang pertanian sebagai agen biokontrol fungi pathogen pada tanaman cabai dan tomat (Buwono, Wahyuni dan Grandiosa, 2013). Selain itu, produk enzim ini pada

bidang biomedis digunakan sebagai antitumor, obat luka dan membran dialisis darah (Suryanto dan Yurnaliza, 2005; Toharisman, 2007). Turunan kitin yaitu kitin-oligosakarida berperan sebagai agen anti kanker, jantung, penyakit darah, dan obat-obatan (Shahidi, dkk., 1999).

Kitinase merupakan enzim yang aktif mengkatalisis polimer kitin menjadi monomer N-asetilglukosamin (Patil, dkk., 2000). Berdasarkan penelitian sebelumnya, diperoleh 2 isolat terbaik dari lumpur mangrove dengan aktivitas kitinase sebesar 0,0934 dan 0,1705 U/mL (Muthmainnah, M., 2018). Aktivitas kitinase pada penelitian lainnya yaitu isolat dari sumber air panas sebesar 3,35 dan 1,55 U/mL (Oktavius dan Maria, 2017), isolat dari Teluk Persia sebesar 8,7 U/mL (Younes, dkk., 2014) dan isolat dari limbah *seafood* sebesar 0,4 U/mL (Atalla, dkk., 2017). Berdasarkan kemampuan dalam mendegradasi kitin, sehingga bakteri kitinolitik tersebut cukup berpotensi untuk dipelajari hingga tingkat molekular.

Studi bakteri kitinolitik ditinjau berdasarkan pendekatan molekular melalui tahapan isolasi DNA. Isolasi DNA bakteri akan dilakukan menggunakan metode konvensional yaitu *Direct boilling* (ddH₂O). Prinsip metode ini berdasarkan pelisisan sel bakteri secara termal (Omar dan Anas, 2017). Keuntungan menggunakan metode ini yaitu kemurnian dan konsentrasi DNA yang diperoleh tinggi, mudah, murah, waktu singkat dan ramah lingkungan. (Sunarno, dkk., 2014). Berdasarkan penelitian sebelumnya, tingkat kemurnian DNA hasil isolasi menggunakan metode ini sesuai dengan rasio 1,8-2,0 (A₂₆₀/A₂₈₀) (Ayomi, dkk., 2017). Ragad dan Ahmed (2016) berhasil mengisolasi DNA bakteri *G. indicus* menggunakan metode yang sama dengan kemurnian sebesar 1,9 μ g/mL. Pada penelitian lainnya, bakteri *Listeria Monocytogenes* dan *Escherichia coli* berhasil

diisolasi dengan kemurnian sebesar 2,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 1,929 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sirirat, dkk., 2016; Shehata dan Hershan, 2016).

Identifikasi secara genotip menggunakan Gen penyandi 16S rRNA. Penggunaan gen tersebut untuk menunjukkan hubungan kekerabatan secara evolusi antar mikroorganisme (Julian, R. M., dkk., 1998). Selain itu, 16S rRNA lebih stabil dan tepat digunakan sebagai penanda molekular spesifik untuk identifikasi bakteri (Singh, dkk., 2001; Tran, dkk, 2017). Isolat bakteri kitinolitik dari lumpur mangrove BeeJay Bakau Resort Kota Probolinggo telah diidentifikasi secara fenotip menunjukkan bakteri tersebut adalah *Bacillus sp* (Muthmainnah, M., 2018). Identifikasi tersebut akan dilanjutkan dengan tahap genotip untuk menentukan spesies bakteri berdasarkan urutan basa nitrogennya. Identifikasi secara genotip diperlukan karena sifat morfologi bakteri dapat berubah sesuai keadaan lingkungan (Ochman, 2005). Selain itu karakter fenotip memiliki reproduibilitas rendah karena tergantung pada kondisi kultur laboratorium (Thoyibatun & Surya, 2012).

Penentuan spesies bakteri kitinolitik secara genotip dilakukan menggunakan beberapa program komputer diantaranya DNA *Baser* dan Bioedit. Sekuen yang diperoleh akan disejajarkan (*alignment*) dengan DNA dari *GenBank*. Pengkonstruksian pohon filogenetik untuk menunjukkan hubungan kekerabatan pada sampel bakteri dengan spesies bakteri lainnya menggunakan program *mega6*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kekerabatan spesies bakteri kitinolitik isolat lumpur mangrove Beejay Bakau Resort.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kemurnian hasil isolasi DNA bakteri kitinolitik menggunakan metode ddH₂O ?
2. Bagaimanakah hasil identifikasi bakteri kitinolitik isolat lumpur mangrove secara genotip ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kemurnian hasil isolasi DNA bakteri kitinolitik menggunakan metode ddH₂O.
2. Mengetahui hasil identifikasi bakteri kitinolitik hasil isolasi dari lumpur mangrove secara secara genotip.

1.4 Batasan Masalah

1. Isolat bakteri kitinolitik yang digunakan yaitu hasil isolasi dari lumpur mangrove BeeJay Bakau Resort Kota Probolinggo Jawa Timur.
2. Isolasi DNA bakteri kitinolitik menggunakan metode ddH₂O.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan upaya dalam mengurangi jumlah limbah organik di lingkungan dan menambah wawasan daftar keragaman mikroorganisme dan karakteristik enzim kitinase yang dapat digunakan dalam proses degradasi kitin. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai literatur penunjang untuk penelitian selanjutnya.

BAB II

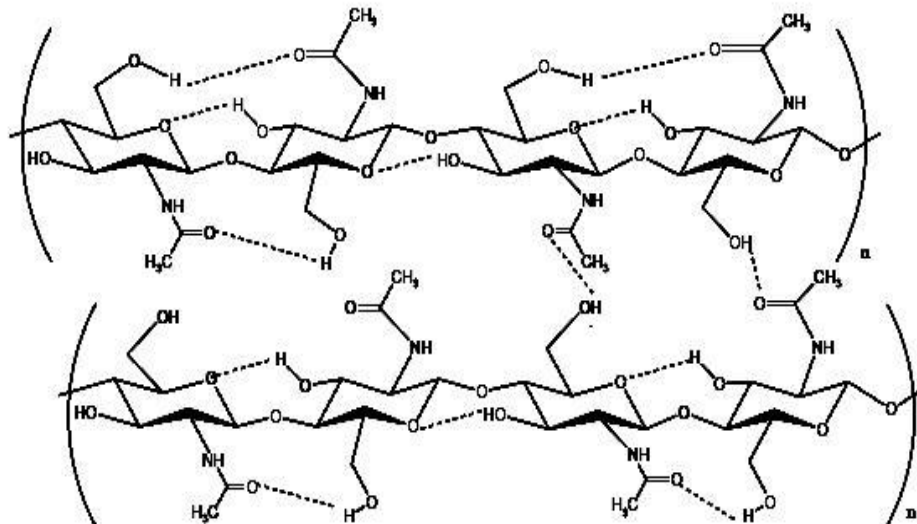
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi Kitin

Kitin merupakan suatu polisakarida struktural yang mengandung nitrogen dan bergabung dengan protein sebagai bahan dasar pembentuk kerangka luar (eksoskeleton) Invertebrata (Rahayu, S., 2000). Polisakarida ini melekat pada suatu matriks dari CaCO_3 dan fosfat yang menyebabkan kerasnya kulit *crustaceae* (udang) dan *mollusca* (kerang). Kitin memiliki kandungan nitrogen sebesar 6,98% sehingga dapat digunakan sebagai agen pengkelat. Kitin pada rantai polimer N-asetil-glukosamin memiliki ikatan hidrogen antara gugus NH dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan sehingga membentuk mikrofibril, memiliki struktur yang rigid dan tidak dapat larut dalam air (Haliza dan Suhartono, 2012).

Struktur kitin sama dengan selulosa dimana ikatan yang terjadi antara monomernya terangkai dengan ikatan glikosida pada posisi β -(1-4). Perbedaan antara kitin dengan selulosa adalah gugus hidroksil yang terikat pada atom karbon nomor dua digantikan oleh gugus asetamida (NHCOCH_2), sehingga kitin menjadi sebuah polimer berunit N-asetilglukosamin (Fernandez, dan Gustot 2012) seperti pada gambar 2.1. Kitin dapat didegradasi dalam dua jalur, yaitu (1) degradasi oleh mekanisme kitinolitik yang menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida dan (2) polimer kitin mengalami deasetilasi pertama yang selanjutnya dihidrolisis oleh kitosanase (Gooday, 1990). Struktur kitin sama dengan kitosan, perbedaannya terletak pada

setiap cincin molekul kitin terdapat gugus atom asetil ($-\text{CH}_3\text{-CO}$) sedangkan pada kitosan terdapat gugus amina ($-\text{NH}$) (Rianta, 2014).



Gambar 2.1 Struktur dan interaksi ikatan hidrogen pada kitin (Champagne, 2002).

Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan manfaat masing-masing. Udang biasanya hanya dikonsumsi dagingnya saja, namun dalam kulit udang terdapat senyawa yang memiliki banyak manfaat. Manfaat tersebut dapat dilihat dari senyawa kitin yang terkandung dalam kulit udang yaitu sebagai floakulan dalam pengolahan limbah, antitumor, obat luka dan membrane dialisa darah (Suryanto, dkk., 2005; Toharisman, 2007). Allah SWT telah menjelaskan dalam al-Qur'an surat Ali Imran ayat 191 bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu tidak ada yang sia-sia.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan Ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka.” (Q.S. Al-Imran; 191).

Dalam surat ali Imran ayat 191 dijelaskan bahwa dalam tatanan langit dan bumi serta keindahan perkiraan dan silih bergantinya siang dan malam itu merupakan bukti yang menunjukkan keesaan Allah SWT, kesempurnaan kekuasaan-Nya, dengan tidak melalaikan untuk terus-menerus mengingat Allah SWT dalam sebagian besar waktunya (Al-Maraghi, 1993: 290). *Mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi* yaitu mengingat Allah SWT dengan ucapan dan atau hati dalam situasi dan kondisi bekerja atau istirahat, sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan tafakkur memikirkan ciptaan Allah SWT yakni kejadian di alam semesta (Shihab, 2009: 308-309).

2.2 Bakteri Kitinolitik

Allah SWT menciptakan berbagai jenis makhluk hidup dengan berbagai macam ukuran. Bakteri adalah organisme uniseluler dan prokariot serta umumnya tidak memiliki klorofil dan berukuran renik atau makroskopis (Warsito, 1995). Dalam surat Al-Baqarah ayat 26 dijelaskan bahwa Allah SWT tidak segan memberi perumpamaan berupa nyamuk atau sesuatu yang lebih rendah dari itu. Sesuatu yang lebih rendah dari itu merupakan ciptaan Allah SWT yang lebih kecil dari nyamuk seperti bakteri. Allah SWT menciptakan berbagai jenis makhluk hidup dari tingkat tertinggi hingga terendah sebagai petunjuk bagi manusia untuk berfikir dan merenungi kuasa-Nya.

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا^{٣٣} فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ
 أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ^{٣٤} وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا^{٣٥} يُضِلُّ بِهِ
 كَثِيرًا^{٣٦} وَيَهْدِي بِهِ^{٣٧} كَثِيرًا^{٣٨} وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ^{٣٩}

Artinya: "Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu[33]. adapun orang-orang yang beriman, Maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan Ini untuk perumpamaan?." dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah[34], dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik"(Al-Baqarah ayat 26).

Menurut Al-Maraghi dan sebagian mufassir menjelaskan bahwa (امف اهقوف) atau (وفق تمضوعب) diartikan sebagai "lebih kecil dari nyamuk", yaitu sesuatu yang tampak lebih kecil dari nyamuk. Sesuatu yang tampak lebih kecil tersebut seperti virus, bakteri, dan jamur hanya dapat dilihat menggunakan mikroskop. Diatas tubuh nyamuk yang kecil pun terdapat bakteri. Adanya mikroorganisme yang sangat kecil yang terdapat dalam tubuh nyamuk merupakan suatu perumpamaan untuk menggambarkan kekuasaan Allah SWT dalam menciptakan sesuatu (Yahya, H., 2014).

Mikroorganisme kitinolitik adalah mikroorganisme yang memiliki aktivitas kitinolitik, yaitu dapat mendegradasi kitin menggunakan enzim kitinase yang dihasilkan (Purkan, dkk., 2014). Mikroba tersebut dapat diperoleh dari berbagai sumber lingkungan tanah, laut, danau, kolam, dan tempat pembuangan limbah udang. Bakteri kitinolitik sangat menarik diisolasi karena kemampuannya dalam mendegradasi kitin menjadi derivat kitin (Suryanto, dkk., 2005; Zarei, dkk.,

2012). Bakteri ini dapat mendegradasi kitin menghasilkan N-asetilglukosamin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Jholapara, dkk., 2013).

Genus bakteri yang sudah banyak dilaporkan memiliki kitinase antara lain *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Bacillus sp.*, dan *Pyrococcus* (Harman, dkk., 1993; Vadya, 2004). Bakteri kitinolitik dari perairan yang berhasil diisolasi yaitu *Alteromonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Vibrio alginolyticus* TK-22, *Vibrio harveyi* dan *Aeromonas* (Halimahtussadiyah, dkk., 2017; Oktavius, Y.T. dan Esteban, A., dkk., 2017). Isolat yang berhasil diisolasi dari tanah yaitu *Streptomyces sp.* J-13-3, *Arthrobacter sp.* NHB-10, *Streptomyces thermoviolaceus* OPC, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus sp.*, dan *P. Pseudomallei* (Haliza dan Maggy, 2012; Purkan, B., Afaf, B. dan Sri, S., 2014; Risky, H., dkk., 2017).

2.3 Enzim Kitinase

Kitinase (EC 3.2.1.14) adalah enzim yang menghidrolisis senyawa kitin pada β -1,4-N-asetil-glukosamin menjadi monomer N-asetil-D-glukosamin yang terdistribusi di alam (Pratiwi, dkk., 2015). Bakteri kitinolitik memanfaatkan enzim ini untuk asimilasi kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen (Tsujiibo dkk., 1999). Semua jenis kitinase termasuk keluarga Glikosil Hidrolase (GH) yaitu GH-18, 19 dan 20. GH-18 meliputi kitinase dari bakteri, jamur, virus, dan beberapa kitinase dari tanaman dan hewan (Haliza & Maggy, 2012).

Berdasarkan cara kerjanya, enzim kitinase dalam mendegradasi substrat yang dikelompokkan dalam dua tipe yaitu (Rostinawati, 2008) endokitinase dan eksokitinase. Endokitinase yaitu kitinase yang memotong secara acak ikatan β -1,4 bagian internal mikrofibril kitin. Produk akhir yang terbentuk bersifat mudah

larut berupa oligomer pendek N-asetilglukosamin (GlcNAc) yang memiliki berat molekul rendah seperti kitotetraose. Eksokitinase yaitu enzim yang memotong mikrofibril kitin pada ujung non reduksi tanpa terbentuknya unit-unit monosakarida atau oligosakarida (Susi, 2002).

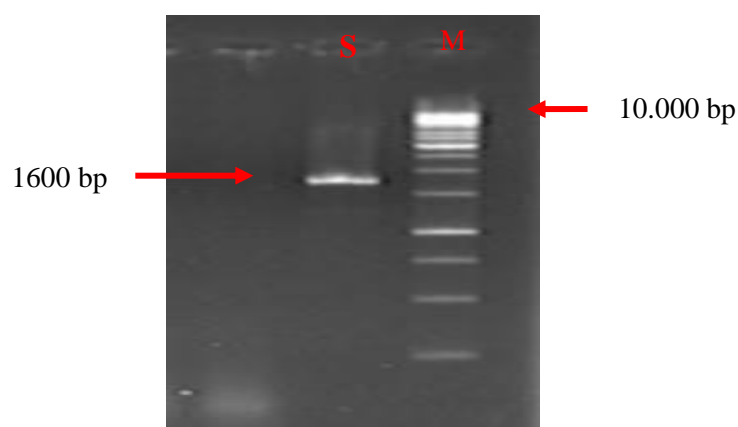
2.4 Isolasi DNA Menggunakan Metode ddH₂O

Isolasi DNA adalah suatu metode pemisahan DNA dari komponen sel lain atau kontaminan yang tidak diinginkan (Rahmat, 2012). Dalam isolasi DNA terdapat beberapa tahapan yaitu (Fatih, 2009) isolasi sel, lisis dinding sel, ekstraksi, presipitasi dan purifikasi. Isolasi DNA metode *direct boiling* (ddH₂O) menggunakan proses thermal untuk pelisisan sel (Omar dan Anas, 2017). Pemanasan tinggi selama beberapa menit akan menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding sel yang berakibat pada masuknya cairan dan materi lain di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dalam sel. Suhu tinggi juga berfungsi untuk inaktivasi enzim, terutama DNase yang dapat merusak DNA (Sunarno, dkk., 2014).

Metode ddH₂O banyak digunakan pada penelitian sebelumnya karena mudah dan memenuhi angka kemurnian DNA dan pita tidak smear seperti ditunjukkan Gambar 2.6. Shehata dan Hershman, (2016) berhasil mengisolasi DNA bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode ddH₂O dengan kemurnian 1,89 dan konsentrasi 38,3 ng/μL. Pada penelitian lain berhasil mengisolasi DNA bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode yang sama dengan kemurnian 1,8 dan konsentrasi 71,5 μg/mL (Ahmed, Atif dan Mogahid, 2014).

2.5 Analisis Kualitatif Dan Kuantitatif DNA

Elektroforesis memiliki prinsip kerja memanfaatkan muatan listrik pada DNA yang bermuatan negatif. DNA bermuatan negatif disebabkan karena adanya gugus fosfat pada molekul DNA. Ketika molekul DNA dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Yuwono 2005). Elektroforesis gel agarosa digunakan dalam analisis DNA karena dapat memisahkan DNA dengan ukuran lebih dari 100 bp (Westemeier, 2005 dan Karp, 2008). Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan pewarna flourosens EtBr (*ethidium bromide*). Pewarna ini akan berinterkalasi diantara pasangan basa nukleotida pada struktur heliks ganda sehingga akan tampak fragmen-fragmen DNA yang terpisah ketika gel disinari lampu UV (Campbell dan Shawn, 2009). Hasil uji DNA yang baik ditunjukkan dengan pita DNA yang tebal dan tampak sedikit atau tidak *smear* ketika divisualisasikan dengan sinar UV (Sauer, dkk., 1998).



Gambar 2.2 Amplikon gen kitinase *Serratia marcescens* B4A terbaca pada 1600 bp (Zarei, dkk., 2012).

Uji keberhasilan DNA yang kedua ialah uji kuantitatif menggunakan spektrofotometri NanoDrop. Prinsip kerja spektrofotometri NanoDrop ialah basa purin dan pirimidin pada DNA murni mampu menyerap cahaya ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein atau senyawa fenol akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm (Fatchiyah, dkk., 2011; Muladno, 2010). Rasio absorbansi 260/280nm menentukan kemurnian DNA dengan rentang 1,8-2,0. Jika nilai <1,8-2,0 menunjukkan terdapat kontaminan berupa protein, sedangkan jika nilai >1,8-2,0 menunjukkan kontaminan berupa RNA (Ayomi, dkk., 2017).

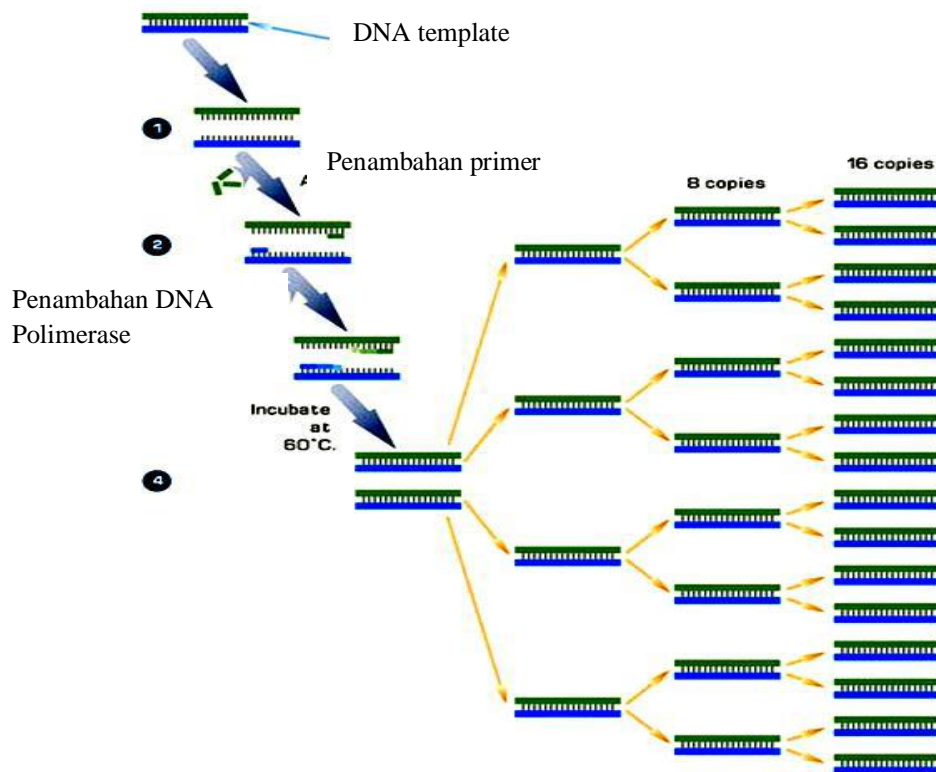
2.6 Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA template (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20–40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat. DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier (Newton and Graham, 1994).

Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah (1) template DNA, (2) sepasang primer, (3) dNTPs (Deoxynucleotidetriphosphates),

(4) bufer PCR, (5) Magnesium klorida ($MgCl_2$), dan (6) enzim polimerase DNA. Template DNA sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Deoxynucleotidetriphosphates (dNTPs) sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA, terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Buffer PCR untuk menjamin pH medium. Magnesium klorida ($MgCl_2$) sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Enzim polimerase DNA sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA (Butler, 2012).

Primer yang digunakan dalam PCR adalah primer gen 16S rRNA. Sepasang primer sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA (Butler, 2012). DNA target akan diperbanyak sesuai dengan daerah 16S rRNA sehingga diperoleh daerah konservatif. Pada struktur *conserved* ini terdapat sejumlah basa yaitu daerah variabel yang khas sehingga dapat membedakan setiap organisme (Rinanda, T., 2011). Hasil dari proses PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis yang ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Proses PCR meliputi (1) denaturasi, (2) penempelan primer, (3) elongasi (Yuwono dan Tribowo, 2006).

2.7 Analisis Bioinformatika

Analisis data menggunakan bioinformatika menggunakan beberapa program yaitu DNA *Baser* untuk mengambil daerah basa murni dengan intensitas tinggi dari hasil sikuensing. Bioedit digunakan dalam penjajaran urutan DNA hasil sikuensing dengan DNA dari *GenBank*. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) merupakan alat cepat pembandingan sekuen dengan mengkonstruksi *alignment* untuk mengoptimasi kemiripan antara sekuen nukleotida dan protein dengan database sekuen di *GeneBank*. Program ini digunakan untuk mendeteksi hubungan antar sekuen yang hanya mempunyai kesamaan pada region tertentu. (Altschul, dkk., 1990).

Filogenetik adalah ilmu yang mempelajari hubungan evolusi antar organisme, gen, atau protein dengan menggunakan kombinasi biologi molekuler atau perhitungan statistik. Hubungan filogenetik umumnya digambarkan pada suatu bentuk pohon binary. Struktur pohon filogenetik menggambarkan hubungan antara nenek moyang dan keturunannya (Polanski dan Kimmel, 2007). Simpul pohon filogenetik melambangkan suatu unit taksonomi atau takson yang dapat berupa spesies, populasi, individu, gen, atau sekuen (asam nukleat atau protein) (Sentausa, 2003).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada 1 Februari–1 April 2019, bertempat di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, cawan petri, jarum ose, neraca analitik untuk pembuatan media. Proses isolasi DNA bakteri menggunakan tabung mikro, mikropipet (Bio-Rad), mikro pipet tip, bunsen, *autoclave*, *shaker*, *hot plate*, *centrifuge* (Thermo scientific), *vortex* (Maxi Mix II), incubator (mammert), mikroskop. Seperangkat alat elektroforesis (Bio-Rad), lampu UV transluminator (Bio-Rad), spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), alat PCR (Bio-Rad), dan alat sikuensing (1-AB370301521-035) untuk analisa kualitatif dan kuantitatif DNA.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain isolat bakteri dari lumpur mangrove, media agar kitin, Media *Nutrient Broth* (NB), akuades, ddH₂O. Elektroforesis DNA hasil solasi menggunakan bahan agarosa (*Science Prencur*), *Loading Buffer* (*Vivantis*), bufer TBE IX, EtBr. Proses amplifikasi DNA menggunakan *Maxime* PCR Premix Kit-*i*-Taq (dNTPs 2,5 mM, DNA Taq

polimerase 2,5 μ , *Gelloading buffer*, dan *reaction buffer*), *Nuclease-free water* (*Applied BioSystem*), *primer forward* dan *primer reserve* (IDT).

3.3 Tahap Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan yaitu:

1. Peremajaan Bakteri
2. Kultur bakteri
3. Isolasi DNA bakteri
4. Uji kualitatif dan kuantitatif DNA
5. Amplifikasi DNA dengan PCR
6. Penentuan urutan nukleotida
7. Analisis bioinformatika.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Peremajaan dan Pengulturan Bakteri (Haedar, dkk., 2017; Wulansari, 2016)

Peremajaan dilakukan dengan mengambil satu ose isolat secara aseptis, kemudian digoreskan pada media miring dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pembuatan kultur bakteri menggunakan media *Nutrient Broth* (NB) yaitu dengan melarutkan 0,8 gram NB ke dalam 100 mL aquades dan dipanaskan. Media dituang ke dalam erlenmeyer dan disterilkan dalam *autoclave*. Kultur bakteri dilakukan dengan mengambil 1 ose bakteri kitinolitik dari media agar kitin secara aseptik dan dimasukkan ke dalam media NB. Kemudian, dishaker selama 18 jam pada suhu ruang.

3.4.2 Isolasi DNA Bakteri Metode ddH₂O (Silva, dkk., 2012)

Diambil 30 μ L produk isolasi diresuspensi dengan ddH₂O 200 μ L dan disentrifuge 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang. Kemudian dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 100 °C selama 10 menit. Kemudian di vortex dan disentrifuge 13.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, supernatan dipindahkan ke dalam tabung steril. DNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C. Hasil diuji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa dan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer NanoDrop pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3.4.3 Uji Kualitatif DNA Menggunakan Gel Agarosa

Pembuatan gel agarosa 1% dengan melarutkan 0,3 gram bubuk agarosa ke dalam 30 mL bufer TBE IX dan dipanaskan hingga larut sempurna. Setelah larut, kemudian dituang ke dalam cetakan. Agarosa ditunggu hingga hangat dan ditambahkan dengan 1 mL EtBr. Selanjutnya sumuran pada gel dibentuk dengan memasang sisir pada gel dan didinginkan hingga mengeras (Fathiyah, 2011).

Setelah membeku, gel dimasukkan ke dalam *tank* elektroforesis. Bufer TAE IX dimasukkan ke dalam *tank* hingga gel terendam sempurna. Sampel hasil isolasi dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 10 μ L dan *loading dye* 1 μ L. Mesin elektroforesis dinyalakan dan atur waktu *running* selama 60 menit dengan voltase 65 volt. Selanjutnya hasil elektroforesis diamati menggunakan UV-transluminator. Munculnya pita tebal pada gel menunjukkan keberhasilan isolasi DNA (Sinta, dkk., 2010).

3.4.4 Penentuan Konsentrasi DNA

Uji kuantitatif DNA dilakukan dengan mengukur kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer NanoDrop. Sampel DNA 1 μ L diteteskan pada alat deteksi, kemudian diatur panjang gelombang pada 260 dan 280 nm. Rasio absorbansi 260/280 nm menentukan kemurnian DNA dengan rasio 1,8-2,0. Jika nilai <1,8-2,0 menunjukkan terdapat kontaminan berupa protein, sedangkan jika nilai >1,8-2,0 menunjukkan kontaminan berupa RNA (Ayomi, dkk., 2017).

3.4.5 Amplifikasi DNA Menggunakan PCR (Zhong, dkk., 2015)

Volume total yang digunakan dalam reaksi PCR yaitu 25 μ L dengan komposisi 0,5 μ L DNA template, dan 0,5 μ L primer P1 dan P2 dan 23,5 μ L master mix. DNA amplification KIT terdiri atas 2 μ L dNTPs 2 mM, 5 μ L 10x Vi bufer A, 1,5 μ L MgCl₂ 50 mM dan 0,4 μ L *Taq* DNA polymerase. Siklus amplifikasi sebanyak 30 siklus. Kondisi reaksi PCR dengan *pre denaturasi* pada suhu 95 °C selama 5 menit, *denaturasi*: 95 °C selama 1 menit; *annealing*: 55°C selama 1 menit; *elongasi*: 72 °C selama 1 menit dan *post elongasi* 72 °C selama 10 menit. Primer yang digunakan yaitu 1492F 5' -AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' dan 27R 5' -TACGGCTACCTTGTTACGA-3' . Hasil amplifikasi selanjutnya diuji dengan elektroforesis gel agarose dengan munculnya pita tunggal berdasarkan ukuran pita gen kinitase.

3.4.6 Penentuan Urutan Nukleotida

Proses sikuensing dilakukan dengan metode *dye terminator dideoxy* Sanger di First Base laboratories; The Gemini Singapore Science Park. Analisa terdiri dari beberapa tahapan yaitu penyiapan template, reaksi sikuensing, pemurnian produk PCR, dan elektroforesis dengan *scanning fluorosence* untuk

menentukan urutan DNA berdasarkan berat molekulnya. Hasil sikuensing akan dianalisis lebih lanjut menggunakan bioinformatika.

3.4.7 Analisis Bioinformatika

Hasil urutan basa DNA dianalisis menggunakan beberapa program komputer antara lain DNA *Baser*, BLAST-N, MEGA6, Bioedit. DNA *Baser* untuk mengambil daerah basa murni dengan intensitas tinggi dari hasil sikuensing. Bioedit digunakan dalam penjajaran urutan DNA hasil sikuensing. BLAST-n untuk mengkonfirmasi kemiripan bakteri dengan sekuen lain dari *Gen Bank*. Mega7 digunakan dalam pengkonstruksian pohon filogenetik untuk menunjukkan hubungan kekerabatan pada sampel bakteri (Ismaun, dkk., 2017).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri menggunakan media agar yang mengandung koloidal kitin sebagai substrat yang akan didegradasi oleh enzim kitinase. Kandungan karbon dan nitrogen dalam media merupakan sumber makanan bagi bakteri. Kondisi optimum pertumbuhan bakteri kitinolitik pada pH netral dengan masa inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (Muthmainnah, M., 2018), diperoleh dua isolat terbaik yang memiliki aktivitas kitinase yaitu isolat A1 dan A2. Hasil pengamatan morfologi menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Bacillus sp.* Karakter isolat bakteri tersebut termasuk ke dalam bakteri gram positif karena sel berwarna ungu, dan berbentuk batang.

4.2 Isolasi DNA Bakteri Menggunakan Metode ddH₂O

Prinsip isolasi DNA yaitu (Fatih, 2009) lisis dinding sel, ekstraksi, presipitasi dan purifikasi. Isolasi DNA menggunakan metode *direct boiling* merupakan suatu metode pemisahan DNA dengan proses pemanasan untuk pelisisan sel dan ekstraksi DNA. Lisis sel yaitu proses pemecahan membran sel untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel bakteri. Menurut Sunarno, dkk., (2014), Pemanasan tinggi selama beberapa menit akan menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding sel yang menyebabkan masuknya cairan dan materi lain di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dalam sel. Suhu tinggi juga berfungsi untuk inaktivasi enzim, terutama DNase yang dapat merusak DNA.

Penggunaan ddH₂O steril untuk suspensi sampel bakteri dan sebagai pengelusi DNA ketika disentrifuge. Menurut Farmawati, dkk., (2015) ddH₂O steril untuk melarutkan DNA kembali dan berfungsi sebagai pengelusi agar DNA terpisah dari komponen lain dan berada pada supernatan yang mengandung DNA. Komponen lain seperti protein yang terkandung pada DNA didenaturasi dengan proses pemanasan. Proses pemanasan dapat memutus ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik sehingga kelarutan protein pada air menurun. Menurunnya kelarutan protein pada air menyebabkan protein terpisah dari DNA ketika proses sentrifugasi. Menurut Zaldy, R., dan Lusy, (2020) menjelaskan bahwa protein pada DNA dapat terdenaturasi pada suhu 45°C-80°C, dan laju denaturasi meningkat setiap 10°C. Keberhasilan isolasi DNA ditunjukkan dengan uji kuantitatif dan kualitatif.

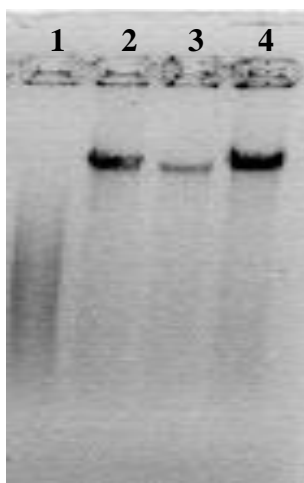
Analisis hasil isolasi DNA secara kuantitatif menggunakan Spektrofotometer NanoDrop. DNA hasil ekstraksi akan diuji tingkat kemurnian dan konsentrasinya berdasarkan panjang gelombang A₂₆₀/280 dengan rasio 1,8-2,0 (Novel, S., dkk., 2010). Pita ganda DNA murni menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein dan fenol menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm (Nugroho dan Rahayu, 2016). Hasil analisis tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 4.1. Hasil Uji Kualitatif DNA Menggunakan Spektrofotometer NanoDrop

No	Isolat	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /280	Konsentrasi DNA (ng/ul)
1	A1	12,71	6,58	1,93	635,75
2	A2	5,12	2,20	2,33	255,92

Berdasarkan tabel 4.1, data hasil analisa menunjukkan kemurnian DNA yang tinggi ditunjukkan oleh isolat A1. Angka 1,93 memenuhi syarat rasio kemurnian yaitu diantara 1,8-2,0. Jika rasio tersebut $<1,8$ maka dikatakan bahwa DNA tersebut mengandung protein. Sedangkan jika rasio $>2,0$ maka DNA masih mengandung RNA (Sambrook, dkk., 1989). Kemurnian isolat A2 melebihi rasio. Hal ini menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh terdapat kontaminan berupa RNA. Menurut Fatchiyah, dkk., (2011) nilai kemurnian DNA diatas 2,0 menunjukkan bahwa terdapat kontaminan berupa RNA yang dapat diatasi dengan penambahan ribonuklease (Kartini, 2012).

Analisis hasil isolasi DNA secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa. Elektroforesis digunakan untuk uji kualitatif DNA berdasarkan kemunculan pita ketika divisualisasikan menggunakan Spektrofotometer-UV.



Gambar 4.1 Elektroferogram genom DNA. Lajur 1 dan 3 Lajur (isolate A2), lajur 2 dan 4 (isolat A1)

Berdasarkan gambar 4.1, pita DNA terlihat jelas pada sumur ke-2 dan ke-4 yaitu isolat A1. Kemunculan pita DNA menunjukkan adanya molekul DNA yang

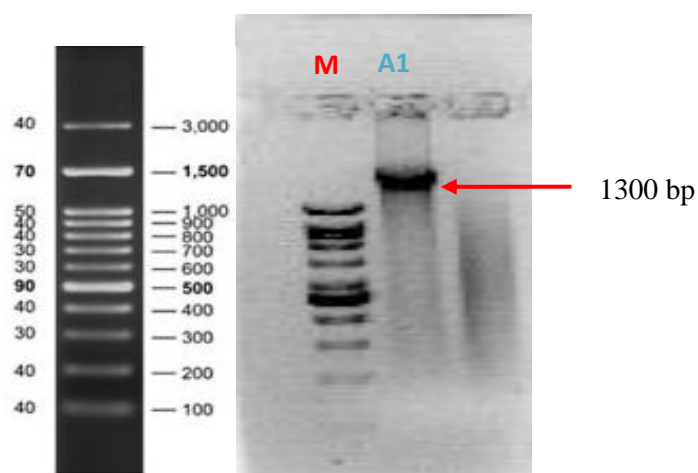
telah terisolasi. Pita DNA pada isolat tersebut terlihat tebal, utuh dan jelas seperti yang terlihat pada gambar 4.1. Menurut Annisaqois (2018) dan Ningsih, dkk., (2017), pita DNA hasil isolasi yang berkualitas baik ditunjukkan dengan pita tebal seperti kumis pada posisi dekat sumur. Semakin tinggi konsentrasi DNA, pita yang terbentuk semakin tebal dan terang (Sambrook dan Russel, 2011). Pada sumur ke-1 menunjukkan munculnya *smear*, mendakan molekul DNA yang terdegradasi. Sedangkan, sumur ke-3 muncul pita DNA yang tipis, menandakan bahwa konsentrasi DNA sedikit. Menurut Mulyani, dkk., (2011), *smear* tersebut merupakan sisa dari larutan yang masih terbawa selama proses isolasi atau juga dapat berupa DNA yang terdegradasi pada proses isolasi. DNA isolat A1 kemudian diamplifikasi menggunakan PCR.

4.3 Amplifikasi gen 16S rRNA Menggunakan PCR

Amplifikasi merupakan tahap perbanyakan daerah gen 16S rRNA menggunakan metode PCR (*Polimerase Chain Reaction*). DNA target akan diperbanyak sesuai dengan daerah gen 16S rRNA yang diapit oleh sepasang primer. Pembatasan daerah gen 16S rRNA untuk memperoleh daerah konservatif sehingga dapat membedakan setiap organisme. Primer universal yang digunakan yaitu 27F 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' dan 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'. Isolat A1 digunakan sebagai cetakan DNA karena kemurnian dan konsentrasi yang tinggi berdasarkan uji kualitatif dan kuantitatif. Cetakan DNA ini digunakan untuk pembentukan molekul DNA baru.

Satu siklus pada PCR terdapat tiga tahapan yaitu denaturasi, annealing dan elongasi. Pada penelitian ini menggunakan 30 siklus. Penelitian yang dilakukan Fitri dan Fitriani (2020) menggunakan 30 siklus pengulangan pada PCR. Menurut

Handoyo dan Ari (2001), penggunaan jumlah siklus lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan jumlah ampikon secara bermakna. Selain itu, dapat memungkinkan peningkatan jumlah produk non target. Suhu yang digunakan pada penelitian ini yaitu 95°C untuk denaturasi, 55°C untuk annealing dan 72°C untuk elongasi. Hasil PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarosa sesuai dengan gambar 4.2.



Gambar 4.2 elektroferogram pita DNA. lajur 1 (M) marker dan lajur 2 isolat A1.

Berdasarkan hasil elektroforesis, pita yang diperoleh memiliki ukuran 1300 bp (*base pair*) setelah dicocokkan dengan marker DNA. Marker PCR merupakan penanda berat molekul DNA (Iqbal, Ibnu dan Nia, 2016). Panjang daerah gen bakteri kitinolitik sebesar 1300 bp dan 1200 bp (Risky, dkk., 2017 dan Buwono, dkk., 2013). Menurut Clarridge, (2004) panjang daerah gen 16S rRNA 1500 bp. DNA genom yang telah diamplifikasi ditunjukkan dengan munculnya pita DNA yang jelas dan tebal. Hasil uji DNA yang baik ditunjukkan dengan pita DNA yang tebal dan tampak sedikit atau tidak *smear* ketika divisualisasikan dengan sinar UV (Sauer et al. 1998).

4.4 Data Hasil Analisis Bioinformatika

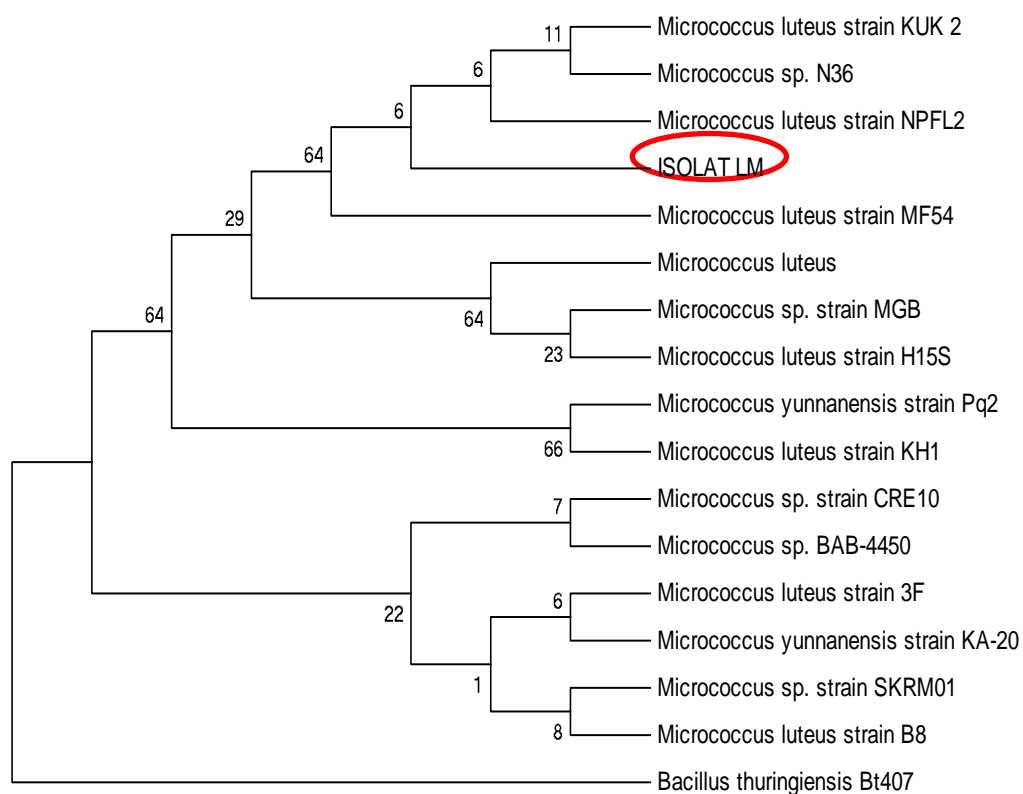
DNA hasil sikuensing diolah menggunakan software *Bioedit* untuk mengcountig urutan DNA yang diinginkan. Countig urutan DNA berfungsi untuk mengambil urutan DNA dengan intensitas puncak yang konstan. Kemudian urutan DNA yang telah dicountig diolah secara online menggunakan *Blastn* pada situs NCBI untuk mencocokkan urutan DNA sampel dengan urutan DNA pada GenBank.

```
AGCTCCCCCACAAGGGTTAGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCAACTTTCGTGACTTGAC
GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACT
AGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTT
TGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTG
AAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCTCACCTTCTCCGAGTTGAC
CCCGGCAGTCTCCCATGAGTCCCCACCACGACGTGCTGGCAACATGGAACGAGGGTTGCG
CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACC
TGTGAACCCACCCCAAAGGGGAAACCGTATCTCTACGGCGATCGAGAACATGTCAAGCCT
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGCACTTAATGC
GTTAGCTGCGGGCGGAAACCGTGAATGGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGC
ATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGT
TACAGCCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTTCTCCTGATATCTGCGCATTCACCAG
CTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACTGCACTCTAGTCTGCCCCGTACCCACCGCAGAT
CCGGGGTTAAGCCCCGGACTTTCACGACAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACG
CCCAATAATTCCGGATAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAAGTT
AGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTA
CAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTCGCTGCATCAGGCTTTTCGCCATTGGGC
AATATTCCCACCTGCTGCCTCCGGTAGGAATCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC
GGTACCCTTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCCTTGTGCATTACCTACCAACAAGCTGAA
AGGCCAGTCCATCCAAACCGAATCTTTCCAACCCCCCGGGGACCCCCCATCCGGTT
TAAACCCGTTTCCAAGGTTATCCCAAATTAAGGCAGGTTTTCCTTCTCCCCGTT
```

Gambar 4. 3 Urutan Genom Bakteri Kitinolitik Isolat Lumpur Mangrove

Isolat A1 memiliki urutan basa 1346 pasangan basa. dengan homologi terdekat sebesar 99,85% dengan bakteri *Micrococcus Luteus* (SMN826463.1). penelitian yang dilakukan oleh Nailil, dkk., (2014), berhasil mengisolasi bakteri

Micrococcus Luteus dari cangkang kepiting bakau. Berdasarkan penelitian lain, bakteri *Micrococcus sp.* (AG84) telah diisolasi dari endapan air laut menghasilkan enzim kitinase (Annamalai, dkk., 2010).



Gambar 4.4 Pohon filogenetik isolat A1 (LM)

Urutan DNA isolat A1 (isolat lumpur mangrove) disejajarkan dengan urutan DNA pada GenBank untuk mengkonstruksi pohon filogenetik menggunakan software *mega6*. Berdasarkan gambar 4.4, kekerabatan isolat A1 berada pada cabang yang sama dengan bakteri *Micrococcus Luteus* strain MF54 (MT214287.1) pada pohon filogenetik. Berdasarkan homologi BLAST pada situs NCBI, isolat A1 memiliki kemiripan urutan basa homologi 99,7% dengan bakteri *Micrococcus Luteus* strain MF54. Sedangkan, Bakteri *Bacillus Thuringiensis*

tidak berada dalam cabang yang sama dengan bakteri *micrococcus* (out of group). Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat A1 memiliki kemiripan spesies dengan bakteri *Micrococcus Luteus* berdasarkan identifikasi secara genotip.

Allah SWT menciptakan setiap makhluk hidup dengan perbedaan masing-masing. Perbedaan ini terlihat secara fisik seperti bentuk morfologi dan karakter makhluk hidup. Tujuan dari perbedaan ini untuk mengetahui klasifikasi makhluk hidup berdasarkan jenisnya, sehingga memudahkan manusia untuk mengenali jenis yang satu dengan lainnya. Faktor yang berperan penting dalam perbedaan jenis makhluk ciptaan Allah SWT adalah DNA. DNA merupakan senyawa yang berperan sebagai penyimpan informasi genetik dan pewarisan sifat.

أَيَحْسَبُ الْإِنْسَانُ أَنْ نَجْمَعَ عِظَامَهُ^{قُلْ} بَلَىٰ قَدْرَيْنَ عَلَىٰ أَنْ تُسَوِّيَ بَنَانَهُ

Artinya: "Apakah manusia mengira, bahwa kami tidak akan mengumpulkan (kembali) tulang belulangnya? Bukan demikian, Sebenarnya kami Kuasa menyusun (kembali) jari-jemarinya dengan sempurna."

Berdasarkan surat al Qiyamaah ayat 3-4 diatas disebutkan ‘*tulang-belulang dan jari-jemari*’ dimana terdapat DNA didalamnya sebagai identitas setiap individu. Menurut al Biqa’i, kata *banān* merupakan tulang-tulang kecil yang terdapat pada ujung-ujung jari kaki dan tangan. Jika ujung-ujung jari terhimpun, terdapat gambar dan ciri penyusunan yang menghasikan manfaat dan rahasia yang terdapat padanya (Shihab, 2000). Garis-garis halus pada ujung jari yang membentuk pola unik dan khusus yang mencerminkan identitas individu (Thayyarah, N., 2013). Jumlah garis-garis sidik jari tidak akan berubah karena pola sidik jari dipengaruhi oleh DNA. DNA sidik jari memiliki pola yang bersifat khas

pada setiap individu sehingga dapat digunakan untuk tujuan identifikasi dalam ilmu forensik dan kerancuan induk (Elizabeth, A., 2012).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Isolasi DNA bakteri kitinolitik menggunakan metode ddH₂O diperoleh kemurnian DNA isolat A1 sebesar 1,93 dengan konsentrasi 635,75 ng/ul, dan isolat A2 sebesar 2,33 dengan konsentrasi 255,92 ng/μl.
2. Berdasarkan hasil identifikasi secara genotip, isolat A1 memiliki tingkat homologi sebesar 99,7% dengan *Micrococcus Luteus* strain MF54 (MT214287.1).

5.2 Saran

Saran yang dapat dilakukan untuk penelitian selanjutnya yaitu diharapkan penelitian ini dapat dilanjutkan dengan identifikasi enzim kitinase secara molekular.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, Y., Ahmad, F., dan Drastinawati, 2017. Kinetika Reaksi Demineralisasi Pada Isolasi Kitin Dari Limbah Ebi. *Jom. J. FTeknik*. Vol. 4, No. 2.
- Atalla, S., Nadia, G., dan Aliaa, R., 2017. Production of Chitinase From Some Mixed Culture Bacterial Strains Grown On Seafood Wastes and It's Applications. *RJPBCS*. Vol. 8, No.3.
- Ayomi, D., Asanga, S., Chinthika, G., Neluka, F., Deepaka, W., dkk., 2017. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. *Biochem*. Vol. 7: 179.
- Buwono, Wahyuni dan Grandiosa, 2013. Karakterisasi Molekuler Gen Penyandi Kitinase Bakteri Asal Limbah Udang dan Kepiting Sebagai Anti-Saprolegnia. *Jurnal konferensi akuakultur indonesia*.
- Brown, T. E., H. E. LeMay, & E. Bruce. 2012. *Chemistry: The Central Science*. New York: Pearson Prentice Hall.
- Brzezinska, M., Urszula, J., dan Maciej, W., 2013. Biodegradation of Chitinous Substances and Chitinase Production by the Soil Actinomycetes *Streptomyces rimosus*. *J. Int. Biod.*, Vol. 84: 104-110.
- Cahyani, Luthfia., 2013. Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang Sebagai Media Produksi Kitinase Oleh Bakteri Kitinolitik Isolat 26. *Skripsi*.
- Champagne L.M., 2002. *The synthesis of water soluble n-acyl chitosan derivatives for characterization as antibacterial agents*, Dissertation, B.S. Xavier University of Louisiana.
- Campbell, K. L. dan Campbell, J. R. 2009. *Companion Animals Their Biology, Care, Health and Mangement Second Edition*. London: Pearson Prentice Hall. Pp: 10-63.
- Ditjen PSDP KKP, 2016. *Kelautan dan Perikanan Dalam Angka Tahun 2016*. Jakarta.
- Ditjen PSDP KKP, 2017. *Kelautan dan Perikanan Dalam Angka Tahun 2017*. Jakarta.
- Edward, J., Marni, K., dan Riardi, P., 2016. Isolasi Kitin Dan Kitosan Dari Limbah Kulit Udang. *Majalah BIAM*. Vol. 12, No. 1.

- Esteban, A. V., Pilar, M. H., dan Ann, M. H., 2017. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*. Vol. 3, No., 3: 689-705.
- Fathiyah, 2015. Analisis Kandungan Gelatin Babi dan Gelatin Sapi Pada Cangkang Kapsul Keras yang Mengandung Vitamin A Menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Skripsi*.
- Fernandez, J. dan Gustot, T., 2012. Management of bacterial infections in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. Vol. 56: 1–12.
- Fitriya, R.T., Muslimin, I., dan Lisa, L., 2015. Keefektifan Metode Isolasi DNA Kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *LenteraBio* Vol. 4 No. 1: 87-92.
- Gooday, G.W., 1990. *Physiology of Microbial Degradation of Chitin and Chitosan, Biodegradation*, 1 : 177-190.
- Gowda, T ., Chandrappa, M.S., Harsha, R., dan Dinesha, R. (2010). Antibacterial Activity Of *Coleus aromaticus* Leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2(3): 63-64.
- Gustav, Vajee, K., Liv, A.B., Sigrid, G., Bjorn, D., Magnar, B., dkk., 2012.
- Characterization of the Chitinolytic Machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and High-Resolution Structure of Its Oxidative CBM33 Enzyme. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 416: 239-254.
- Halimahtussadiyah, R., Natsir, M., Kurniawati, D., dan Utamy, S., 2017. Isolation and Identification of Chitinolytic Bacteria of Pohara River of South East Sulawesi and The Optimization Production of Chitinase Enzyme. *IC3PE*. 1823, 020062.
- Haliza dan Suwartono, 2012. Karakteristik Kitosanase Unik Dari *Bacillus coagulans* LH 28.38 Asal Lahendong Sulawesi Utara. *Tesis*. Bogor: Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di-Pietro, A., Peterbauer, C. and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. *Phytopathology*. 83: 313-318.
- Herdyastuti, N., Tri, R. J., Mudasir, M., dan Sabirin, M., 2009. Chitinase and Chitinolytic Microorganism : Isolation, Characterization and Potential. *Indo. J. Chem*. Vol. 9, No. 1.

- Haedar, N., Hasnah, N., Fahrudin, dan Wilda, A., 2017. Produksi dan Karakterisasi Enzim Kitinase dari Bakteri Kitinolitik Asal Kerang *Anadara Granosa*. *Jurnal Ilmu Alam Dan Lingkungan*. vol. 8, No. 15; 14-21.
- Imanda dan Suharjono, 2015. Chitinolytic Assay and Identification of Bacteria Isolated from Shrimp Waste Based On 16S rDNA Sequences. *advanced in Microbiology*. Vol. 5: 541-548.
- Jholapara, R.J., R.S. Mehta, A.M. Bhagwat dan C.S. Sawant., 2013. Exploring and optimizing the potential of chitinase production by isolated *Bacillus sp.* *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* Vol. 5: 412-418.
- Julian, R. M., Takuichi, S., Andrew, J. W., Tracey, A. M., Jhon, C. F., dkk. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *J. Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 64, No. 2: 795-799.
- Mehtap, D., Ismail, D., Kazim, S., Hacer, M., dan Ramziye, N., 2015. Cloning And Expression Of Chitinase A, B, And C (*Chia, Chib, Dan Chic*) Genes from *Serratia Marcescens* Originating from *Helicoverpa Armigera* and Determining Their Activities. *Turkish Journal of Biology*. Vol. 39: 78-87.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika. Edisi Ke-2*. Penerbit IPB Press, Bogor.
- Muthmainnah, M. 2018. Isolasi Bakteri Kitinolitik Dari Lumpur Mangrove Beejay Bakau Resort Dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase Dengan Variasi Suhu Inkubasi. *Skripsi*.
- Nuswantara S. 2000. Internet untuk biologi molekuler. *Warta Biotek* Vol.14, No. 2
- Oktavia, D.A., D. Mangunwidjaja, dan S. Wibowo. 2012. Pengolahan Limbah Cair Perikanan menggunakan Konsorsium Mikroba Indigenus Proteolitik dan Lipolitik. *Agointek* 6, No. 2: 65–71.
- Oktavius, Y.T. dan Maria, F. P. 2017. Produksi Kitinase Dan *N*-Asetilglukosamin Menggunakan Bakteri Kitinolitik Termotoleran Dari Sumber Air Panas. *Universitas Nusa Nipa*. Vol.11, No.1.
- Omar dan Anas, 2017. Quality Improvement Of The DNA Extracted By Boiling Method In Gram Negative Bacteria. *International Journal of Bioassays*. Vol. 6, No. 4: 5347-5349.
- Patil, R. S., Ghormade, V., dan Deshvande, M., 2000. Chitinolytic Enzymes: an Exploration. *J. Enz. Mic. Tec.*, Vol. 26: 473–483.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.

- Purkan, Badiatul, A., Afaf, B., dan Srie, S., 2014. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik Dari Sampah Organik : Isolasi dan Karakterisasi Enzim Kitinase. *Molekul*. Vol. 9, No. 2: 128-135.
- Raghad, J. dan Ahmed. 2016. New Modified Protocol of DNA Extraction Comparison With Other Extraction Methods For PCR Analysis Of Genomic DNA From *Cyanophyceae* isolates. *Advances of Environmental Biology*. Vol. 10, No. 9: 77-82.
- Rahayu, S. 2000. Karakterisasi dan Pemurnian Kitinase dan Kitin Deasetilase Termotabil dari Isolat K29-14 asal Kawah Kamojang, Jawa Barat. *Tesis*. Bogor: Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Risky, H., dkk., 2017. Penapisan dan Identifikasi Bakteri Kitinolitik Penghambat Pertumbuhan *Ganoderma boninense in Vitro*. *Jurnal Fitopatologi*. Vol. 13, No. 3 Hal. 105-111.
- Rostinawati, T. 2008. Skrining dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase dari Air Laut di Perairan Pantai Pondok Bali. *Penelitian Mandiri*. Fakultas Farmasi. Universitas Padjadjaran. Jatinangor. hal 22-25.
- Sakar, S. 2001. *The Biology and History of Molecular Biology: New Perspectives*. Londok (UK).
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Quantitation Of Nucleic Acids. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.; pp. A8.19-A8.24.
- Sauer, P., M. Miller, dan J. Kang. 1998. Quantitation DNA. *Qiagen News* 2: 23-26.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon Y-J. 1999. *Food Applications of Chitin and Chitosans. Trends in Food Sci and Technol* 10.
- Shehata dan Hershman. 2016. Boiling, Freezing-Thawing And Simple Chemical Extraction Methods Are Comparable To Costly Kit-Based Bacterial DNA Extraction Methods As Evidenced By Conventional And Real-Time PCR. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. Vol. 25, No. 1: 45-51.
- Silva, G., Tais, L. B., Patricia, D., Carvalho, S., Morgana, M., dan Patricia, V., 2012. Rapid Yeast DNA Extraction By Boiling And Freeze-Thawing Without Using Chemical Reagents And DNA Purification. *J. Braz Arch Biol Technol*. Vol. 55: 319-327.
- Singh. 2001. *PCR Primer Design. Molecular Biology Today*. No. 2: 27 -32.
- Sinta, dkk., 2010. *Genetika Laboratorium*. CV. Trans Info Media: Jakarta.

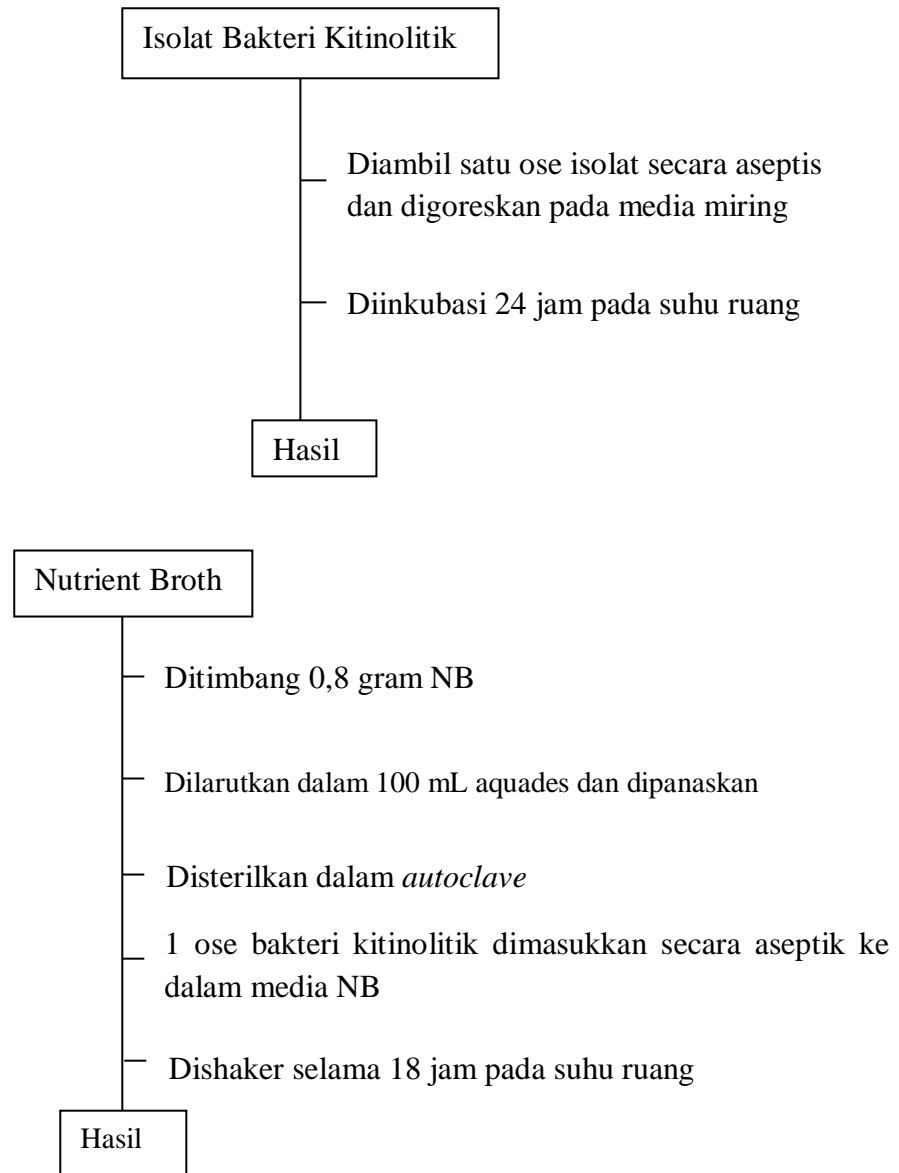
- Sudaryati dan Evi, 2016. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang untuk Menghasilkan Enzim Kitinase dari *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454. *Jurnal Kimia Terap Indonesia*. Vol. 18, No. 1: 91-101.
- Sunarno, Fauzul, M., Nyoman, F., Amarila, M., Anis, K., dan Amin, S., 2014. Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium Diphtheriae* Untuk Pemeriksaan PCR. *Bulletin Penelitian Kesehatan*. Vol. 42, No. 2: 85-92.
- Suryanto, D., Munir, E., dan Yunarliza. 2005. Eksplorasi Bakteri Kitinolitik: Keragaman Gen Penyandi Kitinase pada Berbagai Jenis Bakteri dan Pemanfaatannya. *Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi*. Universitas Sumatera Utara.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, New York.
- Susi. 2002. Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnae* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar*. 3, No. 1: 30-35.
- Takafumi, I., Takao, H., Yutaka, F., Ikumi, S., Akihiro, F., dkk., 2013. Cooperative Degradation of Chitin by Extracellular and Cell Surface-Expressed Chitinases from *Paenibacillus* sp. Strain FPU-7. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 79, No. 23: 7482-7490.
- Thikra, A. Abed. 2013. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA of cultured *Lactobacillus* colony isolated from dairy products Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA of cultured *Lactobacillus* colony isolated from dairy products. *IJAMBR*. Vol. 1: 20-25.
- Toharisman, A. 2007. *Peluang Pemanfaatan Enzim Kitinase di Industri Gula*. Pusat Pengembangan Penelitian Geologi Kelautan (P3GL).
- Tran, F. T., Thi, B. X., Thi, K. N., Xuan, T. V., Bich, N. D., dan Hoai, H. N., 2017. A Simple, Efficient and Universal Method For The Extraction Of Genomic DNA From Bacteria, Yeasts, Molds And Microalgae Suitable For PCR-Based Applications. *Life Sciences Biotechnology*. Vol. 59, No. 4.
- Tsujibo, H., K. Miyomoto, T. Kuda, K. Minami, T. Sakamoto, T. Hasegawa, and Y. Ianamori. 1992. Purification, properties, and partial amino acid sequences of thermostable xylanase from *Streptomyces termoviolaceus* OPC-520. *Apl. Environ. Microbiol.* Vol. 58: 371-375.
- Usharani, T. R., & Gowda, T. K. S. 2011. Cloning of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis*. *Indian Journal of Biotechnology*. 10: 264-269.

- Vesty, K., Kristi, B., Michael, W., Kim, G., dan Richard, G. D., 2017. Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PLoS One Vol. 12, No. 1*.
- Widhyastuti N. 2010. Produksi Kitinase Ekstraseluler *Aspergillus Rugulosus* 501 secara Optimal pada Media Cair. *J Berita Biologi*. Vol. 8, No. 6: 547-553.
- Wulansari, S. 2016. Identifikasi Molekuler Bakteri Isolat Bekatul Berdasarkan Sikuen Gen 16s rRNA. *Skripsi*
- Yesi, A., Ahmad, F., Subkhan, M., dan Ika, K., 2016. Sintesis, Kinetika Reaksi dan Aplikasi Kitin dari Cangkang Udang. *Seminar Nasional Teknik Kimia*.
- Younes, I., Ghorbel, B., Chaabouni, M., Rinaudo, M., Souard, F., dkk., 2014. Use of a fractional factorial design to study the effects of experimental factors on the chitin deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 70 385–390.
- Yurnaliza. 2005. *Senyawa Kitin dan Kitosan Aktivitas Enzim Mikrobia Pendegradasinya*. Program Studi Biologi. FMIPA. Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Yuwono, T. 2005. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*, C.V. Andi: Yogyakarta
- Zarei, M., Saeed, A., Hossain, Z., Alireza, S., Ahmad, G., dkk., 2012. *Serratia marcescens* B4A Chitinase Product Optimization using Taguchi Approach. *Iranian Journal of Biotechnology* Vol. 8, No. 4.
- Zhong, W., Shaoujun, D. dan Huifang, G., 2015. The chitinase C gene *PsChiC* from *Pseudomonas* sp. and its synergistic effects on larvicidal activity. *Genet Mol Biol*. Vol. 38, No. 3

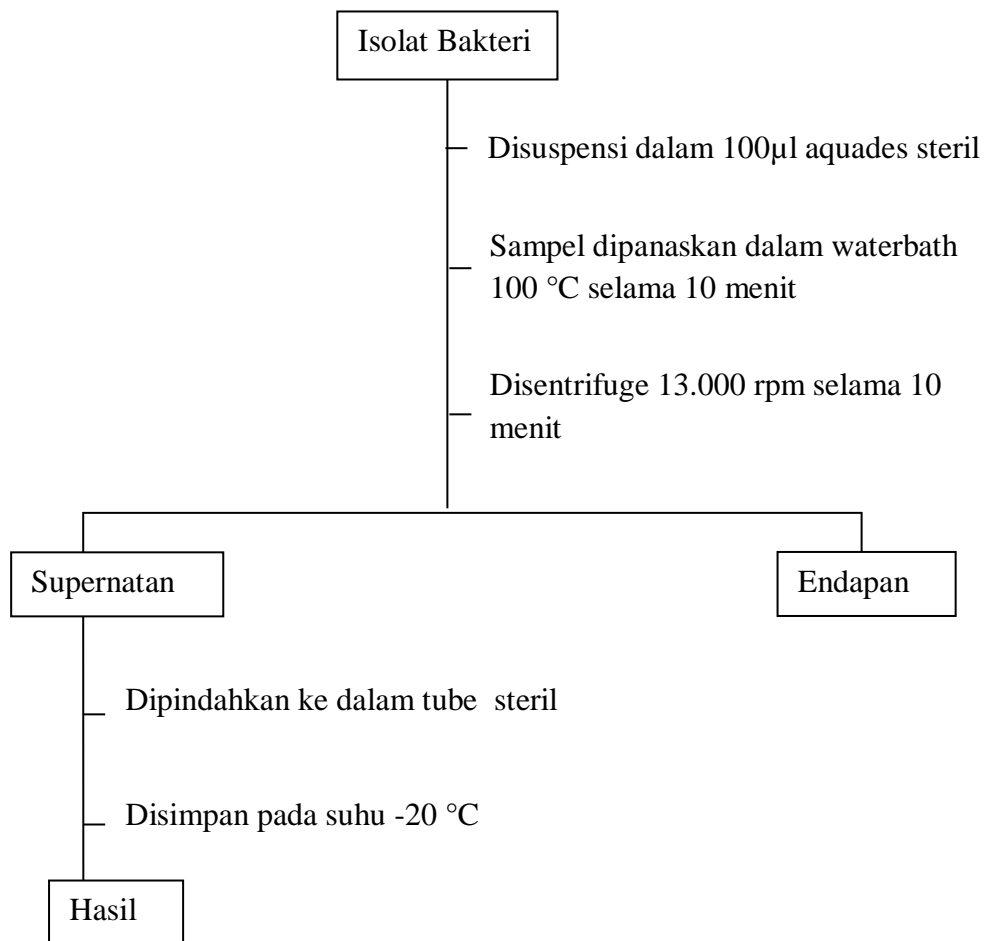
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir

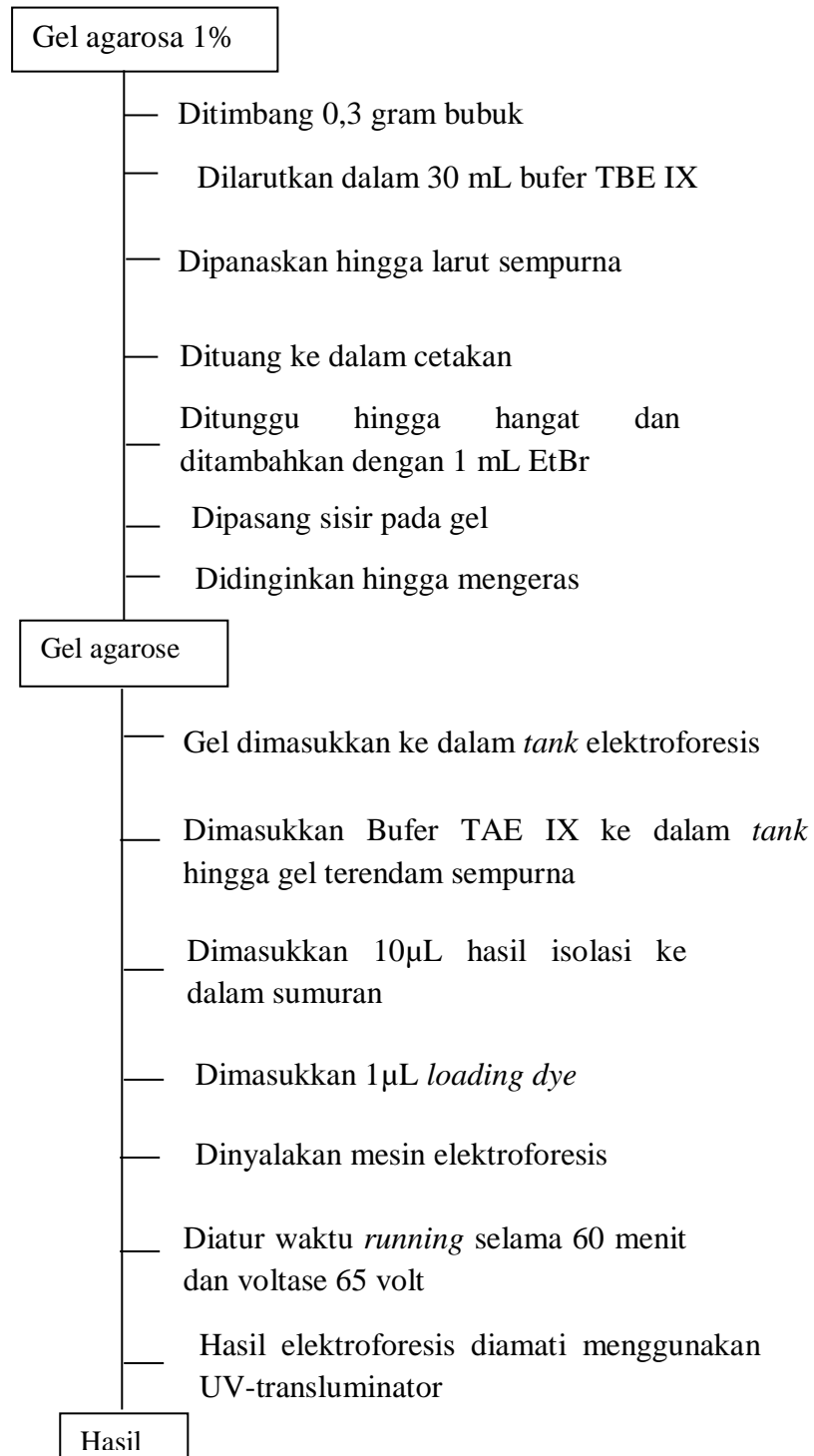
1. Peremajaan dan Pengulturan Bakteri



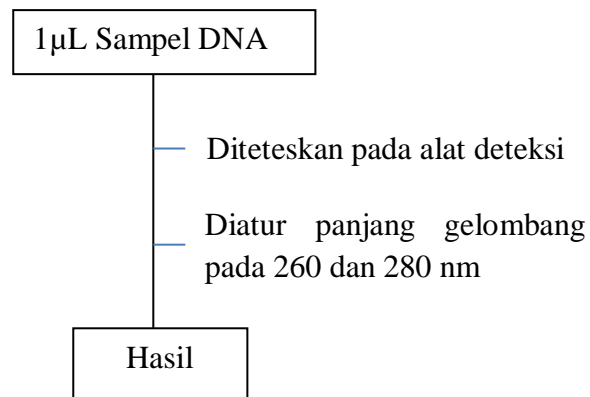
2. Isolasi DNA Bakteri Metode ddH₂O



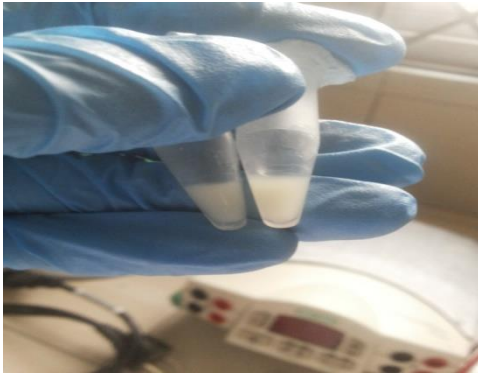
3. Uji Kualitatif DNA Menggunakan Gel Agarosa



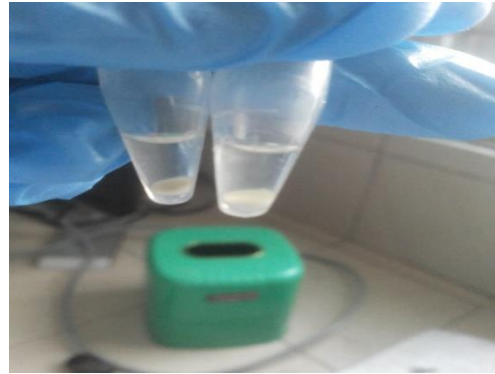
4. Penentuan Konsentrasi DNA



Lampiran 2. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Gambar 1. Sampel DNA setelah dipanaskan dalam waterbath 95°C



Gambar 2. Sampel DNA setelah divortex

Sample Name: 3140283_A1_R
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 14.7873
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 247, C = 346, G = 232, T = 250
Lane/Cap#: 9
Matrix: n/a
Direction: Native

