

BAB II
KAJIAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

2.1.1 Morfologi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Sumber daya hayati yang telah diciptakan Allah SWT pada dasarnya diperuntukkan bagi manusia untuk diolah dan dimanfaatkan bukan untuk dieksploitasi. Semua kekayaan di bumi ini tidak sia-sia diciptakan Allah SWT, namun mengandung manfaat demi kemaslahatan dan kesejahteraan manusia. Firman Allah dalam surat Asy-Syu'araa' ayat 7-8 ;

﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾
﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾
﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾
﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾ ﴿لَا يَتَذَكَّرُ إِلَّا نَجْمًا كَاذِبًا﴾
Artinya : Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya

kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah, dan kebanyakan mereka tidak beriman.(Q.S Asy-Syu'araa: 7-8)

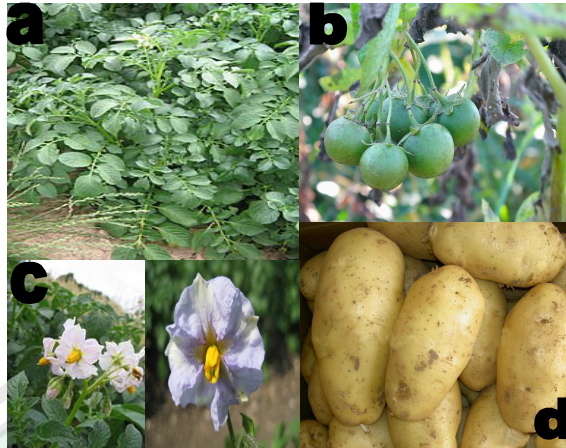
Ayat 7 dan 8 di atas mengandung pengertian bahwa dalam penciptaan tumbuh-tumbuhan terdapat tanda yang besar dan pelajaran yang tinggi, yang menunjukkan kepada hal-hal yang wajib kita imani. Hanya sayangnya kebanyakan manusia tidak mau beriman, mereka terus-menerus berada dalam kekafiran dan kesesatan (Quthb, 2004).

Tanaman kentang merupakan ciptaan Allah SWT untuk hambanya. Dimana manusia memanfaatkan sebagai bahan makanan pokok maupun sebagai sayuran. Namun dengan adanya perubahan serta kerusakan pada tanah, maka

produksi tanaman kentang terancam. Kentang yang dahulu berkembang di luar Negara Indonesia, kini dapat berkembang pesat di Indonesia. Walau harus menghadapi tantangan tersendiri dalam memeliharanya (BPPHP, 2004).

Menurut Permadi (1989), tanaman kentang masuk di Indonesia pada tahun 1794 yang telah ditemukan di sekitar Cisarua (Kabupaten Bandung) dan pada tahun 1811 tanaman kentang telah tersebar luas di Indonesia, terutama di daerah-daerah pegunungan di Aceh, Tanah Karo, Sumatera Barat, Bengkulu, Sumatera Selatan, Minahasa, Bali, dan Flores. Di Jawa daerah-daerah pertanaman kentang berpusat di daerah di Pangalengan, Lembang, dan Pacet (Jawa Barat), Wonosobo dan Tawangmangu (Jawa Tengah), serta Batu dan Tengger (Jawa Timur).

Kentang termasuk tanaman yang dapat tumbuh di daerah tropika dan subtropika, dapat tumbuh pada ketinggian 500 sampai 3000 m di atas permukaan laut, dan yang terbaik pada ketinggian 1300 m di atas permukaan laut. Tanaman kentang dapat tumbuh baik pada tanah yang subur, mempunyai *drainase* yang baik, tanah liat yang gembur, debu atau debu berpasir. Tanaman kentang toleran terhadap pH pada selang yang cukup luas, yaitu 4,5 sampai 8,0, tetapi untuk pertumbuhan yang baik dan ketersediaan unsur hara, pH yang baik adalah 5,0 sampai 6,5 (Ewing dan Keller, 1982).



Gambar. 2.1 Morfologi Tanaman Kentang, a. Tanaman kentang, b. Buah kentang, c. Bunga kentang, d. Umbi kentang (sumber : Pitojo, 2008)

Tanaman kentang ini umumnya ditanam dari umbi. Daun-daun pertama tanaman kentang berupa daun tunggal sedangkan daun-daun berikutnya berupa daun majemuk *impartipinnate* (Nurhidayah dkk, 2005). Warna bunga tanaman ini bermacam-macam, seperti putih, biru, ungu, terdapat pada tukal-tukal dengan percabangan *dikotomik* dengan ibu tangkai yang panjang. Buahnya buah buni yang bulat dengan kelopak yang tetap (Gembong, 1994).



Gambar. 2.2 Pertunasan Kentang dari Umbi (Sumber: Pitojo, 2008)

Batang di atas tanah berdiri tegak, awalnya halus dan akhirnya menjadi persegi serta bercabang jika pertumbuhannya sudah berlanjut. Bentuk pertumbuhan tanaman berkisar dari kompak hingga menyebar. Batang di bawah permukaan tanah (*rhizoma*), umumnya disebut *stolon*, menimbun dan menyimpan produk fotosintesis dalam umbi yang membengkak pada bagian ujung. Karbohidrat ditranslokasikan sebagai sukrosa ke dalam *stolon*, yang pembelahan dan pembesaran selnya menyebabkan pertumbuhan umbi. Sukrosa yang ditransportasikan dikonversi dan disimpan dalam bentuk butiran pati (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998).

2.1.2 Klasifikasi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Menurut Gembong (1994), kentang (*Solanum tuberosum* L) diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisio Spermatophyta

Subdivisio Angiospermae

Class Dicotyledoneae

Ordo Tubiflorae (Solanales, Personatae)

Family Solanaceae

Genus *Solanum*

Species *Solanum tuberosum* L.

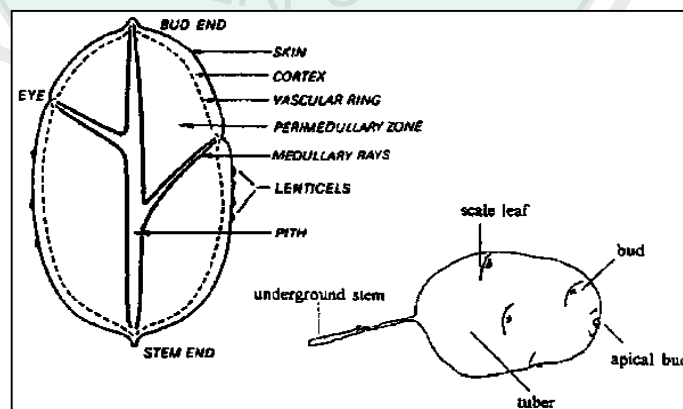
2.1.3 Umbi Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Selain mempunyai organ-organ tersebut, kentang juga mempunyai organ umbi. Umbi tersebut berasal dari cabang samping yang masuk ke dalam tanah. Cabang ini merupakan tempat menyimpan karbohidrat sehingga membengkak dan

bisa dimakan. Umbi bisa mengeluarkan tunas dan nantinya akan membentuk cabang-cabang baru. Semua bagian tanaman tersebut mengandung racun *solanin*. Begitu pula umbinya, yaitu ketika sedang memasuki masa bertunas. Namun, bagian umbi ini, bila telah berusia tua atau siap panen, racun ini akan berkurang bahkan bisa hilang, sehingga aman untuk dimakan.

Menurut Pitojo (2008) Umbi kentang merupakan umbi batang yang terbentuk dari pembesaran ujung *stolon*, mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral dan air. Air merupakan bagian terbesar dalam umbi kentang, kandungan air tersebut bias mencapai 80%.

Morfologi dari umbi adalah berbatang pendek, tebal dan memiliki daging dengan daun yang berubah menjadi kerak atau belang. Umbi berdampingan dengan tunas samping (*aksilar*), yang dikenal dengan “mata”. Tunas yang akan membentuk susunan spiral tertekan pada permukaan umbi, dengan jumlahnya yang semakin banyak mendekati titik apikal. Sebenarnya, setiap mata adalah sekelompok tunas, dan setiap tunas mampu tumbuh menjadi batang (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998). Pembentukan umbi berkorelasi positif dengan luas daun serta berhubungan dengan umur daun (Nurhidayah dkk, 2005).



Gambar. 2.3 Bagian-Bagian Anatomi Umbi Kentang (sumber: Pitojo, 2008)

Menurut Pitojo (2008) bentuk umbi, mata tunas, warna kulit dan warna daging umbi bervariasi menurut varietas kentang. Umbi kentang berbetuk bulat, lonjong, meruncing atau mirip ginjal, dengan ukuran kecil hingga besar. Pada waktu masi muda, umbi kentang di lapiasi ± 1 cm dan menghasilkan *periderm*, sehingga pada umbi kentang yang sudah tua tersusun enam lapis *periderm*. Kulit umbi kentang sangat tipis, berwarna putih, kuning, merah, atau ungu. Ketebalan kulit dipengaruhi oleh varietas dan keadaan lingkungan. Pada umbi yang masih muda, sel-sel kulit membelah dengan cepat, ditandai dengan kulit yang mudah terkelupas. Pada umbi yang sudah tua, sel-sel kulit sudah tidak membelah dan kulit melekat erat sehingga tidak mudah terkelupas. Daging umbi kentang berwarna putih, kuning, atau kemerahan.

Mata tunas tersusun secara spiral pada bagian luar dan dekat kulit umbi. Mata tunas tertua terletak pada pangkal umbi. Jumlah mata tunas berkisar antara 2-14, tergantung pada besar kecilnya umbi. Mata tunas dan kulit memiliki peranan yang sangat penting dalam budi daya kentang, terutama dalam penangkaran benih. Umbi kentang mengalami masa dormansi antara 3-4 bulan (Pitojo, 2008).

2.2 Bakteri Endofit

Segala ciptaan Allah SWT memberi manfaat bagi hambanya, baik itu hal kecil. Tidak ada ciptaan Allah SWT yang sia-sia. Manusia boleh membenci akibat yang ditimbulkan oleh bakteri, virus dll, misalnya penyakit *influenza*, infeksi maupun kerusakan pada tanaman juga. Namun dibalik semua itu, ada hikmah tersendiri yang belum kita pelajari. Dalam firman Allah dalam surat An-Nahl; ayat 10-11 berbunyi:



Artinya; “Dan tidak ada suatu binatang melata-pun di bumi melainkan Allah-lah yang memberi rezkinya, dan dia mengetahui tempat berdiam binatang itu dan tempat penyimpanannya. semuanya tertulis dalam Kitab yang nyata (*Lauh mahfuzh*)” (Q.S Huud; 6).

“*daabbatin*” penggalan ayat yang dimaksud binatang melata di sini ialah segenap makhluk Allah yang bernyawa. “*mustakorrohaa, wamustauda’ahaa*” penggalan ayat selanjutnya, menurut sebagian ahli tafsir yang dimaksud dengan tempat berdiam di sini ialah dunia dan tempat penyimpanan ialah akhirat. dan menurut sebagian ahli tafsir yang lain maksud tempat berdiam ialah tulang sulbi dan tempat penyimpanan ialah rahim.

Isi kandungan pada ayat di atas, dijelaskan bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT nantinya wajib bagi kita (manusia) untuk mengkaji, meneliti dan mengaplikasikannya sehingga dapat bermanfaat bagi kehidupan manusia itu sendiri, oleh karena itu, kita sebagai makhluk yang diberi akal dan pikiran wajib untuk mengobservasi dan mengkaji segala sesuatu yang ada di alam ini baik sesuatu yang bersifat makro maupun sesuatu yang bersifat mikro. Salah satu contoh ciptaan Allah yang termasuk makro adalah alam beserta isinya, sedangkan sesuatu yang tergolong mikro adalah organisme yang tidak dapat kita lihat secara kasat mata seperti bakteri, jamur, virus dll (Goffar, 2004).

Adapun hewan yang berukuran lebih kecil (mikro) antara lain adalah mikroba. Mikroba walaupun berukuran sangat kecil dan umumnya sangat dibenci orang karena merugikan manusia, tetapi sekali lagi segala sesuatu yang diciptakan

Allah SWT di bumi ini tidak ada yang sia-sia. Mikroba ada yang merugikan, tetapi juga ada yang menguntungkan yaitu salah satunya mikroba endofit yang hidup pada jaringan tanaman dan dapat menghasilkan zat antibiotik yang sangat berguna sebagai obat.

Bakteri endofit adalah mikroorganisme yang sebagian atau seluruh dari siklus hidupnya tinggal dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan gejala penyakit. Mereka berada pada jaringan yang sehat seperti berbagai macam jaringan, biji, akar, batang dan daun. Tanaman mendapatkan manfaat dengan kehadiran bakteri endofit ini seperti memacu pertumbuhan tanaman, dan meningkatkan resistensi tanaman pada dari berbagai macam patogen dengan memproduksi antibiotik. Endofit juga memproduksi metabolit sekunder yang sangat penting bagi tumbuhan (Long, 2003).

Menurut Yunus (1999) bakteri endofit merupakan organisme yang hidup selama satu periode siklus hidup dalam jaringan tanaman, tidak termasuk mikroorganisme yang hidup di permukaan tanaman, organisme yang menyebabkan penyakit pada tanaman yaitu mikrozoa maupun rhizobium.

Mikroba endofit ini juga ditemukan pada berbagai varietas tanaman inang di seluruh dunia, termasuk pohon, semak, rumput-rumputan, lumut, tumbuhan paku dan lumut kerak (Clay, 1991). Bakteri endofit juga dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Berdasarkan sifat kerjanya bakteri endofit melawan mikroba patogen dengan cara mengganggu metabolisme sel, menghambat sintesis dinding sel, mengganggu permeabilitas dan menghambat sintesis protein dalam sel (Syarmalina, 2008).

Sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur (Strobel GA., et.al. 2003; Radji, 2008).

Menurut Strurz dan Christir (1998) hubungan yang terjadi antara inang dan bakteri endofit bukan merupakan hubungan patogenitas. Bakteri endofit yang terdapat dalam tanaman memacu perkecambahan, untuk bertahan dalam kondisi yang kurang menguntungkan, mempercepat pertumbuhan, ketahanan terhadap patogen lemah, dan beberapa kasus yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap tekanan lingkungan.

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya yang merupakan peluang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya. Menurut Stierle et al., (1995) dalam Susilowati (Tanpa Tahun), bahwa pemanfaatan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan, antara lain (1) lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, (2) dapat diproduksi dalam skala besar.

Menurut penelitian yang telah dilakukan Harni (2004). Berdasarkan bentuknya, bakteri dibagi menjadi tiga golongan besar, yaitu:

- a. Kokus (Coccus) adalah bakteri yang berbentuk bulat seperti bola dan mempunyai beberapa variasi sebagai berikut
 1. Mikroccoccus, jika kecil dan tunggal
 2. Diplococcus, jika berganda dua-dua
 3. Tetracoccus, jika bergandengan empat dan membentuk bujur sangkar
 4. Sarcina, jika bergerombol membentuk kubus

5. Staphylococcus, jika bergerombol
 6. Streptococcus, jika bergandengan membentuk rantai
- b. Basil (*Bacillus*) adalah kelompok bakteri yang berbentuk batang atau silinder, dan mempunyai variasi sebagai berikut:
1. Diplobacillus, jika bergandengan dua-dua
 2. Streptobacillus, jika bergandengan membentuk rantai
- c. Spiral (*Spirillum*) adalah bakteri yang berbentuk lengkung dan mempunyai variasi sebagai berikut:
1. Vibrio, (bentuk koma), jika lengkung kurang dari setengah lingkaran (bentuk koma)
 2. Spirillum, jika lengkung lebih dari setengah lingkaran
 3. Spirochete, jika lengkung membentuk struktur yang fleksibel.

Bentuk tubuh/morfologi bakteri dipengaruhi oleh keadaan lingkungan, medium, dan usia. Walaupun secara morfologi berbeda-beda, bakteri tetap merupakan sel tunggal yang dapat hidup mandiri bahkan saat terpisah dari koloninya.

2.2.1 Jenis-Jenis Bakteri Endofit

Mikroorganisme disebut sebagai endofit jika berada dalam tubuh tumbuhan setidaknya satu bagian dari siklus hidupnya, sehingga mikroorganisme ini tidak hanya numpang lewat atau menyebabkan penyakit (patogen). Mikroba endofit yang umum ditemukan adalah berupa bakteri dan jamur, namun jamur lebih sering diisolasi. Beberapa pihak bahkan berspekulasi bahwa masih dimungkinkan adanya beberapa jenis bakteri endofit lain, seperti *rickettsia* dan

archaeobacteria. Karena tumbuh dalam jaringan tanaman, dimana tanaman yang satu tentunya berbeda dengan tanaman lainnya, maka tempat hidup bakteri sangat unik sifatnya. Bahkan, fisiologi tumbuhan tinggi termasuk yang berasal dari spesies yang sama akan beda di lingkungan yang berbeda. Karena itu keanekaragaman bakteri endofit sangatlah tinggi. Berdasarkan pertimbangan tersebut endofit dapat menjadi sumber berbagai metabolit sekunder baru yang berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang medis, pertanian, dan industri (Prihatiningtyas, 2006).

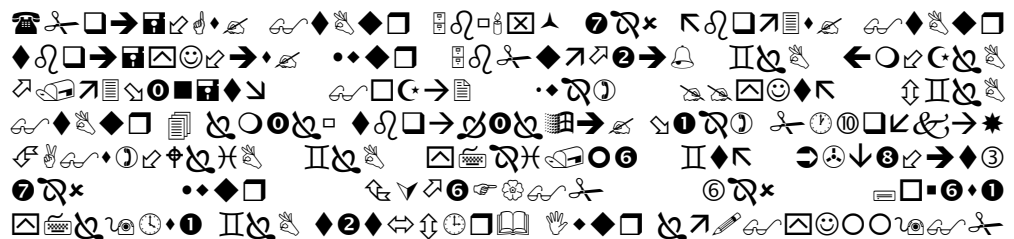
Tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa bakteri endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi, atau metabolit sekunder. Diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam bakteri endofit sepanjang waktu evolusinya (Tan & Zhou, 2001 dalam Radji, 2005). Sejumlah mikroba endofit yang telah berhasil diisolasi dari bagian dalam beberapa tanaman pangan, yaitu pada tanaman padi, jagung, sorgum dan tebu (James dan Olivares, 1996). Ada beberapa bakteri penghasil hormon IAA yang terdapat pada tanaman tertentu dan menghasilkan fitohormon yang bermanfaat bagi pertumbuhan tanaman tersebut (Hoflich, 1995 dalam Aryantha, 2005). Tumbuhan yang telah diteliti bakteri endofitnya masih sedikit. Oleh karena itu, masih ada banyak kesempatan untuk menemukan berbagai jenis, taksa endofit baru (Prihatiningtyas, 2006).

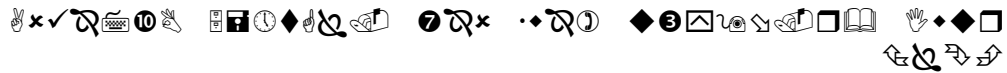
Bakteri endofit dapat juga menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang langka dan penting bagi tumbuhan inangnya, maka kebutuhan untuk menumbuhkan tumbuhan yang masa hidupnya panjang dan mungkin termasuk langka akan berkurang dan keanekaragaman hayati dunia juga terlindungi. Bakteri

digunakan sebagai sumber suatu produk hayati akan memudahkan proses dan mengurangi biaya produksi, sehingga pada akhirnya menghasilkan produk dengan harga lebih murah. Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder (Radji, 2005).

2.3 16S rDNA

rRNA merupakan gen yang paling *conserved* dalam sel. Proporsi sikuen rDNA dari organisme yang berkerabat adalah hamper sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa sikuen dari organism yang berkerabat dapat diurutkan secara persisi dan membuat perbedaannya menjadi lebih mudah untuk diukur. Gen-gen pengkode rRNA yaitu rDNA digunakan secara ekstensif untuk membedakan secara taksonomi, filogeni (hubungan kekerabatan secara evolusi) dan untuk memperkirakan tingkat divergensi spesies diantara bakteri. Perbandingan sikuen 16S rDNA dapat menunjukkan hubungan kekerabatan secara evolusi antar mikroorganisme. Dasar teori tersebut telah digunakan oleh peneliti pendahulu yaitu, Carl Woese yang mengajukan sistim klasifikasi tiga domain (*Achaeae*, *Bacteria* dan *Eucarya*) berdasarkan informasi sikuen rDNA. Sesuai dengan firman Allah dalam surat Yunus; ayat 61. Yang berbunyi:





Artinya : Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarah (atom) di bumi ataupun di langit. tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam Kitab yang nyata (Lauh mahfuzh) (Q.S Yunus ; 61).

Dalam surat Yunus ayat 61 ini, dijelaskan bahwa proses penciptaan makhluk hidup di bumi hanya Allah yang lebih tahu detailnya. Umatnya hanya diperbolehkan mengetahui sebagian kecil dari proses penciptaan tersebut. Tidak hanya itu bagian terkecil dari makhluk (DNA, RNA, dan protein) hidup pun ada dan tertulis dalam Al-Qur'an. Sehingga membantu dalam hal menganalisis segala urusan yang kecil atau besar dengan tepat dan menghasilkan data yang akurat (Quthb, 2004).

Pada bakteri *Archaea*, mitokondria dan kloroplas, sub unit kecil ribosomnya mengandung 16S rRNA (S adalah satuan unit *Svedberg*). Bakteri memiliki gen 16S, 23S, dan 5S rRNA yang terorganisir sebagai operon *cotranscribed*. Terdapat satu atau lebih salinan operon yang tersebar pada DNA genom.

Sikuen 16S rDNA memiliki bagian hipervariabel, yaitu sikuen mengalami perbedaan-perbedaan melalui proses evolusi. Primer-primer didisain untuk menempel pada bagian-bagian *conserved*-nya dan mengamplifikasi bagian variabelnya. Sikuen DNA dari gen 16S rDNA telah dapat digunakan untuk mendeterminasi banyak spesies. Menurut fakta yang ada, bahwa belum ada gen

lain yang terkarakterisasi di dalam banyak spesies selain gen 16S rDNA. Sikuen-sikuen dari 10.000an isolate di klinik maupun lingkungan telah tersedia melalui jaringan internet dan dapat diakses melalui National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) dan Ribosomal Database Project (www.eme.msu.edu/RDP/html/index.html). Situs-situs tersebut menyediakan pencarian algoritma untuk membandingkan sikuen baru yang dihasilkan dari penelitian dengan database mereka.

2.4 Identifikasi Mikroorganisme Menggunakan 16S rDNA

Metode identifikasi mikroorganisme menggunakan 16S rDNA dan berdasarkan teknik PCR telah digunakan untuk mendiagnosis spesies-spesies bakteri penyebab meningitis akut. Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa penggunaan teknik tersebut dapat digunakan sebagai tes tambahan yang sangat berarti dalam pemeriksaan rutin di klinik untuk diagnosis bakteri penyebab meningitis akut di rumah sakit (Chakrabarti *et al*, 2009).

Isolasi dan karakterisasi koloni bakteri endofit dari tanaman agronomi dan taman padang rumput di daerah Nabraska, Amerika telah dilakukan oleh Zinniel dkk (2000). Identifikasi taksonominya dilakukan dengan analisa biokimia dan analisa terhadap sikuen 16S rDNA.

Isolasi dan karakterisasi bakteri endofit pada kedelai (*Glycine* sp) telah dilakukan oleh Hung Annapurna pada 2004. Karakterisasi molekulernya dilakukan menggunakan teknik PCR-RFLP 16S rDNA. Karakterisasi dari 35 isolat bakteri endofit yang diperoleh dilakukan dengan mengamplifikasi gen 16S rDNA kemudian dilakukan analisis restriksi menggunakan enzim restriksi *HaeIII*, *Mbol*

dan *Mspl*. Terdapat 2 kluster utama dengan koefisien kesamaan 48% dan 43% dan 6 isolat yang berbeda kluster.

Elevazhagan dkk, (2009), telah melakukan isolasi bakteri endofit dari tanaman *Mikania micrantha* dan melakukan karakterisasi molekulernya menggunakan teknik PCR-RAPD terhadap sikuen DNA genom berdasarkan 16S rDNA. Tim peneliti tersebut berhasil mengkarakterisasi 5 isolat hasil isolasi bakteri endofit dari bagian daun, petiole, batang, dan akar. Hasil analisis amplifikasi RAPD 16S rDNA nya menunjukkan kesamaan dan menunjukkan kelimanya berasal dari genus *Bacillus*.

2.5 Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR atau polimerisasi berantai adalah teknik amplifikasi (perbanyak) DNA spesifik dengan melakukan proses pemanjangan nukleotida dari primer yang merupakan pasangan komplementer dari utas DNA secara simultan. Proses pemanjangan nukleotida dilakukan oleh DNA polimerase berdasarkan cetakan DNA (Bardacki, 1994).

Menurut Kapil (2009), tahap-tahap PCR meliputi tahap denaturasi, penempelan primer pada cetakan DNA (*annealing*) dan tahap pemanjangan primer melalui reaksi polimerisasi nukelotida (*extention*).

2.5.1 Denaturasi

Tahap ini merupakan tahap pengudaran DNA utas ganda menjadi DNA utas tunggal, dimana masing-masing untai dapat mencetak pasangannya (komplementer). Denaturasi berlangsung pada suhu 90-95°C.

2.5.2 Penempelan primer pada cetakan DNA (*annealing*)

Tahap ini merupakan tahap penempelan primer pada utas DNA cetakan yang telah terdenaturasi menjadi utas tunggal akibat kecocokan pasangan basa. Umumnya penempelan terjadi pada suhu 55-57°C untuk primer 20 mer dan 34-40°C untuk primer 10 mer. Suhu penempelan primer yang ideal umumnya adalah 5°C di bawah suhu leleh (T_m) dari tiap primer (Sambrook et al., 1989).

2.5.3 Pemanjangan primer DNA

Setelah primer menempel pada utas tunggal DNA cetakan, maka DNA polimerase akan mensintesis utas DNA yang baru berdasarkan utas DNA cetakan. DNA polimerase mulai mensintesis DNA dengan mengikatkan deoksinukleotida pada ujung 3'-OH dari primer, sehingga arah pertumbuhan utas DNA yang baru adalah 5'-P ke 3'-OH. Sintesis DNA atau pemanjangan primer ini dilakukan pada suhu cukup tinggi, yaitu sekitar 72°C supaya tahap berikutnya (denaturasi protein) relatif lebih mudah dan enzim Taq DNA polimerase dapat bekerja optimal.

Ketiga tahap di atas akan berulang beberapa kali sehingga proses amplifikasi DNA dapat terjadi. Untuk memudahkan proses reaksi berantai ini, maka reaksi dilakukan oleh mesin PCR. Mesin PCR terdiri dari suatu alat pemanas dan pendingin yang dapat diprogram sehingga dapat memanaskan pada suhu dan selang waktu yang dikehendaki untuk setiap siklus pada suatu reaksi. Banyaknya pengulangan sangat tergantung dari kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis DNA dan biasanya berkisar antara 25 dan 40 siklus. Reaksi polimerisasi ini berantai atau berulang, maka dibutuhkan primer dalam jumlah relatif banyak. Efisiensi reaksi dapat dilakukan dengan perlakuan pra-PCR pada

suhu 95°C selama 5 menit untuk mendenaturasi DNA cetakan yang ukurannya relatif besar. Setelah reaksi selesai, biasanya ditambahkan perlakuan pasca-PCR pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dapat dilihat dengan melakukan migrasi di dalam gel (elektroforesis).

Menurut Sambrook et al., (1989) Kegagalan reaksi PCR selain karena tidak sempurnanya denaturasi atau suhu *annealing* yang terlalu tinggi, juga disebabkan oleh beberapa faktor lain diantaranya :

1. Konsentrasi DNA cetakan

Proses PCR tidak memerlukan DNA dengan tingkat kemurnian tinggi, namun amplifikasi akan terganggu apabila DNA cetakan masih banyak yang terkontaminasi dengan deterjen, EDTA maupun fenol. Konsentrasi DNA yang dibutuhkan adalah 10-100 ng untuk setiap reaksi.

2. Pemicu reaksi

Primer adalah rantai utas tunggal DNA yang pendek dan terdiri dari beberapa nukleotida. Umumnya terdiri atas 10-25 nukleotida (oligonukleotida). Primer yang biasa digunakan dalam percobaan adalah primer acak dan primer spesifik. Primer acak adalah primer yang susunan basa nukleotida seimbang sehingga dapat digunakan untuk analisis DNA dengan sampel yang belum diketahui susunan basa nukleotidanya. Primer spesifik adalah primer yang susunan basa nukleotidanya telah diketahui dan merupakan komponen dari utas DNA yang akan dianalisis.

3. Enzim Taq DNA Polimerase

Pada proses replikasi DNA diperlukan adanya enzim untuk polimerisasi jalinan DNA. Enzim yang mampu mengkatalis replikasi DNA

disebut DNA polimerase dan jenis yang biasa digunakan adalah Taq. Enzim ini bersifat termostabil, yang berasal dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus* yang dapat bertahan hidup pada suhu 94°C. Taq DNA polimerase bekerja secara optimum.

Pada suhu 75-80°C dan digunakan untuk membantu amplifikasi potongan primer dan proses pemanjangan DNA. Aktivitas enzim ini akan terhambat oleh adanya bufer fosfat, tetapi akan aktif apabila ditambahkan 10 mM tris dalam bufer pada suhu ruang dengan pH 8.3 (Sambrook et al. 1989). Taq DNA polimerase mulai aktif pada pH 8.2 - 9.0 dan suhu 65 - 72°C.

4. dNTP

dNTP yang digunakan berupa campuran dari keempat macam nukleotida yaitu dATP, dGTP, dTTP dan dCTP. Larutan stok dNTP bersifat netral pada pH sekitar 7.0. Konsentrasi dNTP yang digunakan berkisar antara 0.1 - 1.6 mM untuk setiap reaksi. dNTP masih bersifat stabil sampai proses siklus berulang 50 kali hanya berkurang 50% (Newton, 1995).

5. Mg²⁺

Mg²⁺ mempengaruhi aktivitas enzim Taq DNA polimerase karena ion Mg²⁺ berfungsi sebagai kofaktor yang dapat membentuk kelat dengan larutan EDTA. Ion ini berperan dalam kestabilan primer pada tahap penempelan primer.

6. Bufer

Bufer PCR terdiri atas larutan Tris-HCl dengan konsentrasi 10-50 mM dan pH 8.3 - 8,8 serta berperan dalam keberhasilan proses amplifikasi (Innis dan Gelfand, 1990). Proses penempelan primer pada bufer PCR dapat ditambahkan KCl dengan konsentrasi 50 mM.

2.6 Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)-RAPD

PCR-RAPD merupakan salah satu teknik molekuler berupa penggunaan penanda tertentu untuk mempelajari keanekaragaman genetika. Dasar analisis RAPD adalah menggunakan mesin PCR yang mampu mengamplifikasi sekuens DNA secara *in vitro*. Teknik ini melibatkan penempelan primer tertentu yang dirancang sesuai dengan kebutuhan. Tiap primer boleh jadi berbeda untuk menelaah keanekaragaman genetic kelompok yang berbeda. Penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer arbitrase, terutama karena amplifikasi DNA secara *in vitro* dapat dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR (Suryanto, 2001; Setiyono, 2011).

Penggunaan penanda RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal preparasi. Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relative tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya. Pada tanaman tahunan RAPD dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi seleksi awal.

Teknik RAPD sering digunakan untuk membedakan organisme tingkat tinggi (*eucaryote*). Namun demikian beberapa peneliti menggunakan teknik ini untuk membedakan organisme tingkat rendah (*Procaryote*) atau melihat perbedaan organisme tingkat rendah melalui piranti organel sel seperti mitokondria (Suryanto, 2001; Setiyono, 2011).

Penggunaan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) yang penggandaannya memakai teknik PCR pertama kali digunakan oleh Welsh dan McClelland pada tahun 1990 sebagai penanda genetik. Teknik ini relative sederhana karena hanya menggunakan sejumlah kecil (beberapa nanogram) DNA total genom yang dianalisis sudah dapat terdeteksi pola pitanya dan oligonukleotida primer yang digunakan relative pendek yaitu 10-mer sampai 20-mer. Pada reaksi ini primer acak tunggal akan menempel pada DNA yang berlawanan. Jika tempat penempelan primer yang satu dengan yang lainnya berada dalam jarak yang dapat diamplifikasi mereka akan memperoleh satu atau lebih fragmen DNA hasil amplifikasi tersebut, dengan penggunaan teknik PCR maka penggandaan DNA secara invitro dapat dilakukan dengan cepat dengan hasil yang baik. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil amplifikasi seperti konsentrasi DNA, ukuran panjang primer, komposisi primer, konsentrasi ion magnesium dan jumlah unit *taq-polymerase* yang digunakan harus dikontrol secara hati – hati (Tingey et al., 1983).

Beberapa alasan yang digunakan orang sehingga memilih teknik RAPD ini yaitu (1) tidak diperlukan pengetahuan latar belakang genom yang dipelajari, (2) secara cepat hasil RAPD dapat diperoleh terutama jika dibandingkan dengan analisis RFLP yang memerlukan banyak tahapan dan (3)

beberapa jenis atau set universal acak yang umum secara komersial telah tersedia dan dapat digunakan untuk analisis genomic pada hampir semua jenis organisme (McClelland, 1990; William et al., 1990)

