

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PENGHASIL ENZIM SELULASE  
DARI LIMBAH AMPAS TEBU BERDASARKAN ANALISIS  
HOMOLOGI GEN PENYANDI 16S rRNA**



**DYAH RATNA ARIPUTRI  
2443009052**

**PROGRAM STUDI S1  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA  
2014**

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PENGHASIL ENZIM  
SELULASE DARI LIMBAH AMPAS TEBU BERDASARKAN  
ANALISIS HOMOLOGI GEN PENYANDI 16S rRNA**

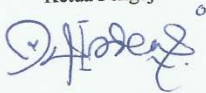
**SKRIPSI**

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan  
memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Strata 1  
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

**OLEH :**  
**DYAH RATNA ARIPUTRI**  
**2443009052**

Telah disetujui pada tanggal 17 Maret 2014 dan dinyatakan LULUS

Mengetahui,  
Ketua Penguji



Wahyu Dewi Tamayanti M.Sc., Apt.  
NIK. 241.04.0574

Pembimbing,



Dr. Lanny Hartanti, M. Si.  
NIK. 241.00.0437

**LEMBAR PERSETUJUAN  
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul : **Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Enzim Selulase Dari Limbah Ampas Tebu Berdasarkan Analisis Homologi Gen Penyandi 16S rRNA** untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu *Digital Library* Perpustakaan Unika Widya Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian Pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 17 Maret 2014



Dyah Ratna Ariputri  
2443009052

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Surabaya, 17 Maret 2014



Dyah Ratna Ariputri  
2443009052

## **ABSTRAK**

### **IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI PENGHASIL ENZIM SELULASE DARI LIMBAH AMPAS TEBU BERDASARKAN ANALISIS HOMOLOGI GEN PENYANDI 16S RNA**

Dyah Ratna Ariputri

2443009052

Uji biokimia dan mikrobiologi saja tidak dapat digunakan untuk mengidentifikasi homologi suatu bakteri. Untuk itu isolat bakteri SF01 yang memiliki aktivitas selulolitik yang berasal dari limbah ampas tebu diidentifikasi berdasarkan analisis homologi gen penyandi 16S rRNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dengan amplifikasi 16S rRNA, dapat diketahui hubungan kekerabatannya dengan bakteri selulolitik yang lain dilihat dari desain pohon filogenetik. Proses amplifikasi 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan primer 9F dan 1541R. Urutan gen penyandi 16S rRNA dari isolat SF01 adalah 1452 bp melalui analisa dengan metode *Neighbor-Joining Tree*. Berdasarkan desain pohon filogenetiknya bakteri SF01 memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan *Bacillus subtilis* strain B7 dengan homologi sebesar 99%.

Kata kunci : Limbah ampas tebu, 16S rRNA, selulase, pohon filogenetik,  
*Bacillus subtilis* Strain B7

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF CELLULASE ENZYME-PRODUCING BACTERIA FROM BAGASSE BASED ON HOMOLOGY ANALYSIS OF 16S rRNA ENCODING GENE

Dyah Ratna Ariputri  
2443009052

Biochemistry and microbiology test alone can't be used to identify the homology of a bacteria. For that reason, the bacterial isolate SF01, which derived from bagasse and have cellulolytic activity, was analyzed for its 16S rRNA gene homology by polymerase chain reaction technique (PCR). Amplification of 16S rRNA have determined the genetic relation between the bacterial isolate SF01 with the other cellulolytic bacteria through phylogenetic tree design. The 16S rRNA amplification was conducted by using 9F and 1541R primers. The sequence of the 16S rRNA encoding gene obtained from SF01 isolate was 1452 bp through analysis with Neighbor-Joining Tree method. Based on its phylogenetic trees design, bacteria SF01 shown the closest genetic relation with *Bacillus subtilis* Strain B7 at 99% homology.

Keywords: Bagasse, 16s rRNA, cellulase, phylogenetic trees, *Bacillus subtilis* Strain B7

## DAFTAR ISTILAH

- Buffer STEP* : larutan yang terdiri dari SDS 0,5%, 0,05M *buffer* Tris Cl pH 8 dan 0,4M *buffer* EDTA pH 8.
- Buffer TAE* : larutan yang terdiri dari basa tris, asam asetat glasial, 0,5M EDTA pH 8, dan akuades.
- Buffer TE* : larutan yang terdiri dari 0,5M *buffer* Tris Cl pH 8 dan 0,5M *buffer* EDTA pH 8.
- Buffer TEN* : larutan yang terdiri dari 10mM Tris Cl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 150mM larutan NaCl, dan akuades.
- Buffer TEN\** : larutan yang terdiri dari 10mM Tris Cl pH 8, 1mM EDTA pH 8, dan 50mM larutan NaCl dan akuades.
- DNA Primer : terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse*.  
Primer forward 9F : 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'  
Primer reverse 1541R : 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'
- dNTPs : *deoxyribonucleaside triphosphates*. Merupakan untai tunggal DNA yang kehilangan gugus O pada cincin nomor 2. dNTPs mewakili basa nitrogen (A, T, G, C).
- ddNTPs : *dideoxyribonucleaside triphosphates*. Merupakan analog dari dNTPs yang kehilangan gugus O pada cincin nomor 2 dan 3. ddNTPs mewakili basa nitrogen (A, T, G, C).
- Loading dye* : campuran bromofenol biru dan sukrosa. Fungsi bromofenol biru untuk memberikan warna pada DNA dan fungsi dari sukrosa sebagai pemberat dari DNA agar tidak ikut terlarut dalam *buffer* sehingga dapat dielektroforesis.

*Taq* DNA Polimerase : DNA polimerase yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*. Bakteri *Thermus aquaticus* dapat bekerja pada suhu tinggi hingga 95°C sehingga digunakan sebagai DNA polimerase pada suhu 72°C.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan karunianyaNya, sehingga skripsi yang berjudul “Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Enzim Selulase Dari Limbah Ampas Tebu Berdasarkan Analisis Homologi Gen Penyandi 16S rRNA” dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu selama proses pembuatan naskah skripsi ini :

1. Dr. Lanny Hartanti, M.Si., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu dan tenaga dengan penuh kesabaran dalam memberikan bimbingan dan saran yang sangat berguna sampai terselesaikannya skripsi ini.
2. Ibu Martha Ervina, S.Si., M.Si., Apt. selaku penguji dan selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala yang telah memberikan fasilitas selama penelitian berlangsung serta memberikan saran dan masukan-masukan positif yang membangun untuk skripsi ini.
3. Ibu Wahyu Dewi Tamayanti M.Sc., Apt., selaku penguji dan dosen Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala yang telah memberikan saran yang berguna untuk skripsi ini.
4. Ibu Sumi Wijaya S.Si., Ph.D., Apt., selaku ketua program studi Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala yang telah menyediakan fasilitas dan pelayanan yang baik selama penelitian.
5. Drs. Kuncoro Foe, Ph.D., G.Dip., Apt., selaku penasehat akademik yang telah mendampingi dan membimbing selama perkuliahan di Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya dan juga selaku Rektor

Universitas Katolik Widya Mandala, yang telah memberikan kesempatan, fasilitas dan waktu untuk memberikan bekal ilmu kefarmasian.

6. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala yang telah mendampingi selama proses perkuliahan mulai dari semester awal sampai akhir.
7. Pihak Tata Usaha Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Papa dan mama, yang telah memberikan kasih sayang, kepercayaan dan dukungan doa, moral, material, serta semangat untuk menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.
9. Empek, tante, wak, koko, cece, titi, dan seluruh keluarga yang telah memberikan semangat dan doa sehingga dapat terselesaikannya skripsi ini.
10. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si yang telah menyediakan fasilitas di laboratorium proteomik selama penelitian berlangsung.
11. Mas Fanani, Mbak Anita, dan Mbak One selaku staf di Laboratorium Proteomik *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya yang memberikan banyak bantuan dan saran dalam melakukan penelitian ini.
12. Ibu Istri, Mbak Septhia, Mbak Amaliah, Mbak Previta dan Mbak Nyoman yang telah banyak memberikan saran dan masukan berkaitan dengan penelitian ini.
13. Pak Anto, laboran Laboratorium Mikrobiologi yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.
14. Pak Tri, laboran Laboratorium Botani yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.

15. Mas Rendy, laboran Laboratorium Biokimia yang dengan ikhlas membantu dan meminjamkan beberapa peralatan praktikum.
16. Mbak Mega, laboran Laboratorium Instrumen yang telah menyediakan fasilitas laboratorium selama penelitian berlangsung.
17. Ko Fandi selaku kakak kelas dan peneliti terdahulu dalam penelitian ini.
18. Seluruh pihak LIPI yang membantu melakukan penelitian ini.
19. Yanuar, Ryma, Arian, Dessy, dan Oky yang telah memberikan semangat dan menemani dalam selama penyelesaian naskah skripsi.
20. Ko Roy, Cindy, Jenny dan Jessi yang memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
21. Teman-teman BPMU khususnya Ayu, Ricky, Wang, Rendy, Yohan, Frans, Lusi, Tari, Jefri, Calica dan Kristalia yang telah memberikan semangat dan dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini.
22. Teman-teman angkatan 2009 Fakultas Farmasi lainnya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dan mendampingi sejak awal studi hingga selesainya skripsi ini.

Penyusun menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Untuk itu penyusun mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari para pembaca untuk penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan siapa saja yang membacanya.

Surabaya, Mei 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

|                                              | Halaman |
|----------------------------------------------|---------|
| ABSTRAK.....                                 | i       |
| ABSTRACT.....                                | ii      |
| DAFTAR ISTILAH.....                          | iii     |
| KATA PENGANTAR.....                          | v       |
| DAFTAR ISI.....                              | viii    |
| DAFTAR LAMPIRAN.....                         | xi      |
| DAFTAR TABEL.....                            | xii     |
| DAFTAR GAMBAR.....                           | xiii    |
| BAB                                          |         |
| 1     PENDAHULUAN.....                       | 1       |
| 1.1.    Latar Belakang Masalah.....          | 1       |
| 1.2.    Rumusan Masalah.....                 | 3       |
| 1.3.    Tujuan Penelitian.....               | 3       |
| 1.4    Hipotesis Penelitian.....             | 4       |
| 1.5    Manfaat Penelitian.....               | 4       |
| 2     TINJAUAN PUSTAKA.....                  | 5       |
| 2.1.    Tinjauan tentang Enzim.....          | 5       |
| 2.2.    Tinjauan tentang Selulosa.....       | 6       |
| 2.3.    Tinjauan tentang Enzim Selulase..... | 8       |
| 2.4.    Tinjauan tentang Bakteri.....        | 9       |
| 2.5.    Tinjauan tentang Materi Genetik..... | 10      |
| 2.6.    Tinjauan tentang Isolasi DNA.....    | 12      |
| 2.6.1    Isolasi DNA.....                    | 12      |
| 2.6.2    Elektroforesis Gel.....             | 13      |

|        |                                                                                 |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7.   | Tinjauan tentang <i>Polymerase Chain Reaction</i> .....                         | 15 |
| 2.8.   | Tinjauan tentang <i>Sequencing DNA</i> .....                                    | 16 |
| 2.9.   | Tinjauan tentang Pohon Filogenetik.....                                         | 17 |
| 3      | METODE PENELITIAN.....                                                          | 19 |
| 3.1.   | Sampel, Bahan, dan Alat Penelitian.....                                         | 19 |
| 3.1.1  | Sampel Penelitian.....                                                          | 19 |
| 3.1.2  | Bahan Penelian.....                                                             | 19 |
| 3.1.3  | Alat Penelitian.....                                                            | 20 |
| 3.2.   | Metode Penelitian.....                                                          | 20 |
| 3.2.1  | Pembuatan Media.....                                                            | 20 |
| 3.2.2  | Pembuatan Larutan.....                                                          | 21 |
| 3.2.3  | Peremajaan Isolasi Bakteri SF01.....                                            | 23 |
| 3.2.4  | Uji Halo Isolat Bakteri.....                                                    | 23 |
| 3.2.5  | Prokduksi Sel Isolat Bakteri SF01.....                                          | 23 |
| 3.2.6  | Isolasi Sampel Penelitian.....                                                  | 23 |
| 3.2.7  | Elektroforesis Gel.....                                                         | 25 |
| 3.2.8  | <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....                                    | 25 |
| 3.2.9  | <i>Sequencing DNA</i> .....                                                     | 26 |
| 3.2.10 | Pohon Filogenetik.....                                                          | 27 |
| 3.3.   | Skema Kerja.....                                                                | 28 |
| 4      | HASIL PERCOBAAN DAN BAHASAN.....                                                | 29 |
| 4.1.   | Uji Mikrobiologi Isolat Bakteri SF01.....                                       | 29 |
| 4.2.   | Isolasi DNA Kromoson Bakteri Selulolitik Isolat<br>SF01.....                    | 31 |
| 4.3.   | Amplifikasi Gen Penyandi 16S rRNA dengan<br>Polymerase Chain Reaction (PCR).... | 34 |
| 4.4    | Pohon Filogenetik Bakteri Selulolitik Isolat<br>Bakteri SF01.....               | 36 |

|   |                                       |    |
|---|---------------------------------------|----|
| 5 | SIMPULAN.....                         | 39 |
|   | 5.1. Simpulan.....                    | 39 |
|   | 5.2. Saran.....                       | 39 |
|   | 5.3. Alur Penelitian Selanjutnya..... | 39 |
|   | DAFTAR PUSTAKA.....                   | 40 |
|   | LAMPIRAN.....                         | 43 |

## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran                                                                               | Halaman |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. PERHITUNGAN PEMBUATAN LARUTAN<br>ISOLASI DNA KROMOSOM.....                          | 43      |
| 2. PERHITUNGAN LARUTAN ELEKTROFORESIS.....                                             | 46      |
| 3. KONSENTRASI AGAROSE UNTUK PEMBUATAN<br>GEL ELEKTROFORESIS.....                      | 47      |
| 4. PROSES PELACAKAN SEKUEN GEN PENYANDI<br>16S rRNA PADA <i>GENEBANK</i> .....         | 48      |
| 5. PENENTUAN POHON FILOGENETIK ISOLAT<br>BAKTERI SF01.....                             | 49      |
| 6. CARA PENGGUNAAN PROGRAM MEGA6.....                                                  | 50      |
| 7. SERTIFIKAT HASIL ANALISIS AMPLIFIKASI GEN<br>PENYANDI 16S rRNA DARI LIPI BOGOR..... | 53      |

## DAFTAR TABEL

| Tabel                                    | Halaman |
|------------------------------------------|---------|
| 4.1 Hasil BLAST Isolat Bakteri SF01..... | 37      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar                                                                                  | Halaman |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 2.1. Selulosa.....                                                                      | 6       |
| 2.2. Mekanisme Pemecahan Selulosa.....                                                  | 8       |
| 2.3. Pohon filogenetik kehidupan yang dibedakan berdasarkan gen sekuensing rRNA.....    | 17      |
| 4.1. Isolat Bakteri SF01 secara Makroskopis dalam media NB.....                         | 29      |
| 4.2. Hasil Foto Mikroskopis Isolat Bakteri SF01 dengan Pengecatan Diferensial Gram..... | 30      |
| 4.3. Hasil Pengujian Halo terhadap Isolat Bakteri SF01.....                             | 30      |
| 4.4. Hasil elektroforesis isolasi DNA kromosom isolat SF01.....                         | 31      |
| 4.5. Hasil Amplifikasi Gen Penyandi 16S rRNA dengan PCR.....                            | 35      |
| 4.6. Amplikon Isolat Bakteri SF01 pada 1452 bp.....                                     | 36      |
| 4.7. Pohon Filogenetik Isolat Bakteri SF01.....                                         | 38      |