

# BIOTEKNOLOGI MIKROBIA

Dr. Yessy Dessy Arna, M.Kep.,Sp.Kom | Efrita Bataragoa, M.Biotech  
Yenti Purnamasari, S.Si, M.Kes | Suwarja, S.Pd., M.Kes  
apt. Asiska Permata Dewi, M.Farm | Dr. Siti Hamidatul 'Aliyah, S.Pd, M.Sc  
Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes | Nurina Tahta Afwi Maulina, S.Si., M.Biotech  
Siti Roswiyah Yulyani, S.Si., M.Biotech | Dra. Elisabeth Natalia Barung, M.Kes., Apt  
Nisrina Fitri Nurjannah, S.Si., M.Si | Nyoman Yudi Antara, S.Si.,M.Biotech  
Ida Ayu Preharsini Kusuma, S.Si.,M.Biotech



## **BIOTEKNOLOGI MIKROBIA**

Dr. Yessy Dessy Arna, M.Kep.,Sp.Kom  
Efrita Bataragoa, M.Biotech  
Yenti Purnamasari, S.Si, M.Kes  
Suwarja, S.Pd., M.Kes  
apt. Asiska Permata Dewi, M.Farm  
Dr. Siti Hamidatul 'Aliyah, S.Pd, M.Sc  
Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes  
Nurina Tahta Afwi Maulina, S.Si., M.Biotech  
Siti Roswiyah Yulyani, S.Si., M.Biotech  
Dra. Elisabeth Natalia Barung, M.Kes., Apt  
Nisrina Fitri Nurjannah, S.Si., M.Si  
Nyoman Yudi Antara, S.Si.,M.Biotech  
Ida Ayu Preharsini Kusuma, S.Si.,M.Biotech

### **Editor :**

La Ode Alifariki, S.Kep., Ns., M.Kes



## **BIOTEKNOLOGI MIKROBIA**

### **Penulis:**

Dr. Yessy Dessy Arna, M.Kep.,Sp.Kom  
Efrita Bataragoa, M.Biotech  
Yenti Purnamasari, S.Si, M.Kes  
Suwarja, S.Pd., M.Kes  
apt. Asiska Permata Dewi, M.Farm  
Dr. Siti Hamidatul 'Aliyah, S.Pd, M.Sc  
Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes  
Nurina Tahta Afwi Maulina, S.Si., M.Biotech  
Siti Roswiyah Yulyani, S.Si., M.Biotech  
Dra. Elisabeth Natalia Barung, M.Kes., Apt  
Nisrina Fitri Nurjannah, S.Si., M.Si  
Nyoman Yudi Antara, S.Si.,M.Biotech  
Ida Ayu Preharsini Kusuma, S.Si.,M.Biotech

### **ISBN :**

978-634-7156-52-5

### **Editor Buku:**

La Ode Alifariki, S.Kep., Ns., M.Kes

### **Diterbitkan Oleh :**

PT MEDIA PUSTAKA INDO

Jl. Merdeka RT4/RW2 Binangun, Kab. Cilacap, Jawa Tengah

Website: [www.mediapustakaindo.com](http://www.mediapustakaindo.com)

E-mail: [mediapustakaindo@gmail.com](mailto:mediapustakaindo@gmail.com)

**Anggota IKAPI: 263/JTE/2023**

**Cetakan Pertama : 2025**

**Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang.** Dilarang memperbanyak sebagian karya tulis ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanik, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penulis.

## **KATA PENGANTAR**

Alhamdulillah, Kami panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada saya sehingga buku ini dapat tersusun. Buku ini diperuntukkan bagi Dosen, Praktisi, dan Mahasiswa Kesehatan sebagai bahan bacaan dan tambahan referensi.

Buku ini berjudul Bioteknologi Mikrobia mencoba menyuguhkan dan mengemas beberapa hal penting konsep Bioteknologi Mikrobia. Buku ini berisi tentang segala hal yang berkaitan dengan konsep Bioteknologi Mikrobia serta konsep lainnya yang disusun oleh beberapa Dosen dari berbagai Perguruan Tinggi.

Buku ini dikemas secara praktis, tidak berbelit-belit dan langsung tepat pada sasaran. Selamat membaca.

Kendari, 15 April 2025

Penulis

## DAFTAR ISI

BAB 1 <u>Bioteknologi Mikrobia .....</u>	1
A. Pendahuluan.....	1
B. Definisi dan Ruang Lingkup Bioteknologi Mikrobia.....	2
BAB 2 <u>Klasifikasi Mikroorganisme dalam Bioteknologi .....</u>	8
A. Pendahuluan.....	8
B. Klasifikasi Mikroorganisme dalam Bioteknologi .....	8
BAB 3 <u>Teknik Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme .....</u>	22
A. Pendahuluan.....	22
B. Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme .....	23
BAB 4 <u>Kultur Mikroba dalam Skala Laboratorium dan Industri ...</u>	36
A. Pendahuluan.....	36
B. Konsep Kultur Mikroba .....	37
BAB 5 <u>Konsep Dasar Rekayasa Genetika .....</u>	53
A. Pendahuluan.....	53
B. Konsep Rekayasa Genetika .....	53
BAB 6 <u>Teknik transformasi genetik: konjugasi, transduksi, dan transformasi .....</u>	69
A. Pendahuluan.....	69
B. Konjugasi .....	69
C. Transduksi .....	76
D. Transformasi.....	81
BAB 7 <u>Aplikasi CRISPR-Cas dalam Modifikasi Mikroorganisme..</u>	86
A. Pendahuluan.....	86
B. Aplikasi CRISPR-Cas dalam Modifikasi Mikroorganisme ..	86
BAB 8 <u>Produksi Protein Rekombinan dan Vaksin Berbasis Mikroba .....</u>	96
A. Pendahuluan.....	96

B. Produksi Protein Rekombinan dan Vaksin Berbasis Mikroba .....	97
BAB 9 <u>Produksi Asam Organik, Enzim, dan Antibiotik</u> .....	107
A. Pendahuluan.....	107
B. Produksi Asam Organik, Enzim, dan Antibiotik .....	108
BAB 10 <u>Fermentasi Alkohol dan Asam Laktat</u> .....	125
A. Pendahuluan.....	125
B. Fermentasi Alkohol dan Asam Laktat .....	126
BAB 11 <u>Bioteknologi pangan: probiotik, prebiotik, dan fermentasi pangan</u> .....	139
A. Pendahuluan.....	139
B. Prebiotik, Probiotik, dan Fermentasi Pangan .....	139
BAB 12 <u>Teknik analisis biomolekuler: PCR, elektroforesis, spektrofotometri</u> .....	159
A. Pendahuluan.....	159
B. Teknik PCR, Elektroforesis dan Spektrofotometri .....	160
BAB 13 <u>Uji Bioaktivitas dan Toksisitas Produk</u> .....	174
A. Pendahuluan.....	174
B. Uji Bioaktivitas dan Toksisitas Produk .....	175



# BAB 1

## Bioteknologi Mikrobia

\*Dr. Yessy Dessy Arna, M.Kep.,Sp.Kom\*

### A. Pendahuluan

Bioteknologi mikroba merupakan cabang ilmu yang memanfaatkan mikroorganisme dalam berbagai aplikasi, termasuk industri pangan, kesehatan, pertanian, dan lingkungan. Mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan virus telah digunakan dalam produksi enzim, antibiotik, vaksin, serta dalam proses bioremediasi untuk mengatasi pencemaran lingkungan (Madigan et al., 2021).

Kemajuan teknologi dalam bidang mikrobiologi dan rekayasa genetika telah memungkinkan manipulasi mikroorganisme untuk meningkatkan efisiensi produksi serta menciptakan produk yang lebih unggul. Misalnya, melalui teknologi DNA rekombinan, bakteri *Escherichia coli* dapat dimodifikasi untuk menghasilkan insulin manusia, yang menjadi terobosan besar dalam dunia medis (Brock et al., 2020).

Selain dalam bidang kesehatan, bioteknologi mikroba juga memainkan peran penting dalam industri pangan, misalnya dalam fermentasi untuk menghasilkan produk seperti keju, yoghurt, dan minuman beralkohol (Tamang et al., 2020). Proses fermentasi yang melibatkan mikroba seperti *Lactobacillus* spp. dan *Saccharomyces cerevisiae* telah digunakan selama berabad-abad dalam produksi makanan yang lebih tahan lama dan memiliki manfaat kesehatan tambahan.

Di bidang lingkungan, mikroorganisme digunakan dalam pengolahan limbah dan bioremediasi untuk mendekomposisi

polutan berbahaya, seperti hidrokarbon dari tumpahan minyak (Singh & Ward, 2022). Bioteknologi mikroba juga berperan dalam produksi biofuel sebagai sumber energi alternatif yang ramah lingkungan (Oliveira et al., 2021).

Dengan berkembangnya penelitian dan teknologi, pemanfaatan mikroba dalam bioteknologi terus mengalami kemajuan, membuka peluang baru dalam berbagai sektor industri dan kesehatan. Buku ini akan membahas prinsip dasar bioteknologi mikroba, jenis-jenis mikroorganisme yang digunakan, serta aplikasinya dalam berbagai bidang.

## B. Definisi dan Ruang Lingkup Bioteknologi Mikroba

### 1. Definisi Bioteknologi Mikroba

Bioteknologi mikroba adalah cabang bioteknologi yang menggunakan mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan virus untuk menghasilkan produk atau jasa yang bermanfaat dalam berbagai bidang seperti kesehatan, pangan, pertanian, lingkungan, dan energi (Madigan et al., 2021). Mikroorganisme digunakan dalam berbagai proses seperti fermentasi, produksi enzim, antibiotik, vaksin, serta bioremediasi untuk mengatasi pencemaran lingkungan (Oliveira et al., 2021).

### 2. Ruang Lingkup Bioteknologi Mikroba

Ruang lingkup bioteknologi mikroba mencakup berbagai aspek berikut:

#### a. Mikrobiologi Industri

Pemanfaatan mikroorganisme untuk produksi enzim, antibiotik, dan bahan kimia.

#### b. Bioteknologi Pangan

Aplikasi mikroba dalam fermentasi, probiotik, dan pengawetan makanan.

#### c. Bioteknologi Kesehatan dan Farmasi

Produksi vaksin, antibiotik, terapi gen, serta rekayasa mikroba untuk pengobatan.

#### d. Bioteknologi Lingkungan

Penggunaan mikroba dalam pengolahan limbah, bioremediasi, dan rekayasa lingkungan.

e. Bioteknologi Pertanian

Mikroorganisme dalam pupuk hayati, biokontrol hama, serta modifikasi genetik tanaman (Brock et al., 2020).

**3. Sejarah dan Perkembangan Bioteknologi Mikroba**

a. Sejarah Awal

Bioteknologi mikroba telah digunakan selama ribuan tahun, terutama dalam fermentasi makanan dan minuman. Proses fermentasi dengan mikroorganisme seperti *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan roti dan alkohol telah dilakukan sejak zaman Mesopotamia dan Mesir kuno (Tamang et al., 2020).

b. Perkembangan Modern

- 1) Abad ke-19 : Louis Pasteur (1822–1895) membuktikan peran mikroba dalam fermentasi dan menemukan metode pasteurisasi untuk membunuh patogen dalam makanan dan minuman (Madigan et al., 2021).
- 2) Abad ke-20 : Alexander Fleming menemukan antibiotik pertama, penisilin, dari *Penicillium notatum* pada tahun 1928, yang membuka era baru dalam bioteknologi farmasi (Brock et al., 2020).
- 3) Revolusi DNA Rekombinan (1970-an): Teknik rekayasa genetika memungkinkan mikroorganisme dimodifikasi untuk menghasilkan insulin manusia, vaksin, dan protein terapeutik lainnya (Singh & Ward, 2022).
- 4) Abad ke-21: Bioteknologi mikroba berkembang pesat dengan aplikasi dalam biofuel, bioplastik, serta mikroba rekayasa untuk bioremediasi dan pengolahan limbah (Oliveira et al., 2021).

**4. Peran Mikroorganisme dalam Bioteknologi**

Mikroorganisme berperan penting dalam berbagai aplikasi bioteknologi, antara lain :

- a. Produksi Enzim Industri : Mikroba seperti *Aspergillus niger* digunakan untuk menghasilkan enzim seperti

- amilase dan protease dalam industri makanan dan deterjen (Tamang et al., 2020).
- b. Produksi Antibiotik : *Penicillium* dan *Streptomyces* menghasilkan antibiotik yang digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri (Brock et al., 2020).
  - c. Fermentasi Pangan dan Minuman : *Lactobacillus spp.* digunakan dalam fermentasi yoghurt dan keju (Madigan et al., 2021).
  - d. Bioremediasi : Mikroba seperti *Pseudomonas* dan *Bacillus* digunakan untuk menguraikan polutan dalam tanah dan air (Singh & Ward, 2022).
  - e. Produksi Biofuel: Mikroba seperti *Clostridium* dan *Saccharomyces* digunakan untuk menghasilkan bioetanol dan biogas dari bahan organik (Oliveira et al., 2021).
- 5. Aplikasi Bioteknologi Mikroba dalam Berbagai Bidang**
- a. Industri Pangan  
Mikroorganisme digunakan dalam fermentasi untuk menghasilkan produk seperti yoghurt, keju, dan kecap. Selain itu, mikroba juga digunakan dalam produksi probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan pencernaan (Tamang et al., 2020).
  - b. Kesehatan dan Farmasi  
Mikroba berperan dalam produksi antibiotik, vaksin, dan enzim terapeutik. Misalnya, *Escherichia coli* yang dimodifikasi secara genetik digunakan dalam produksi insulin manusia untuk penderita diabetes (Brock et al., 2020).
  - c. Lingkungan  
Bioteknologi mikroba digunakan dalam bioremediasi untuk menguraikan limbah berbahaya, seperti minyak bumi dan limbah industri. *Pseudomonas putida* digunakan untuk membersihkan polusi hidrokarbon (Singh & Ward, 2022).

d. Pertanian

Mikroba seperti *Rhizobium* digunakan dalam pupuk hayati untuk meningkatkan ketersediaan nitrogen di tanah. Selain itu, *Bacillus thuringiensis* digunakan sebagai agen biokontrol untuk melawan hama tanaman (Madigan et al., 2021).

e. Energi dan Industri

Mikroba digunakan dalam produksi bioetanol dari biomassa serta biogas dari limbah organik, yang merupakan alternatif energi ramah lingkungan (Oliveira et al., 2021).

## DAFTAR PUSTAKA

- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2020). *Biology of Microorganisms*. Pearson Education.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (16th ed.). Pearson.
- Oliveira, A. M., Sanromán, M. Á., & Pazos, M. (2021). Recent advances in biofuels production using microbial biotechnology. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100741.
- Singh, R., & Ward, O. P. (2022). Bioremediation and bioprocessing: Current research and future trends. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1241-1257.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2020). Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 11, 580707.

## BIODATA PENULIS



**Dr. Yessy Dassy Arna, M.Kep., Sp.Kom** lahir di Denpasar, pada 4 Desember 1976. Ia tercatat sebagai lulusan Fakultas Ilmu Keperawatan UI dan Program Doktoral Ilmu Kesehatan FKM-Unair. Wanita yang kerap disapa Yessy ini adalah anak dari pasangan Sudarso (ayah) dan Alm. Sri Hartini (ibu). **Yessy Dassy Arna** merupakan Dosen Bidang Ilmu Keperawatan di Poltekkes Kemenkes Surabaya dan Praktisi *Wound Care*. Beberapa hasil penelitian dan pengabdian masyarakat telah terpublikasi pada Jurnal Nasional terakreditasi dan jurnal Internasional. Bertugas sebagai Assesor LAM-PTKes dan Penyuluhan Anti Korupsi LSP-KPK.

# BAB 2

## Klasifikasi Mikroorganisme dalam Bioteknologi

\*Efrita Bataragoa, M.Biotech\*

### A. Pendahuluan

Bioteknologi merupakan cabang ilmu yang memanfaatkan makhluk hidup, termasuk mikroorganisme, serta proses biologis untuk menghasilkan produk yang bermanfaat bagi manusia (Bentahar, Abada, & Ykhlef, 2023). Teknologi ini telah berkembang pesat sejak pertama kali diperkenalkan, mulai dari proses fermentasi tradisional hingga rekayasa genetika modern. Bioteknologi kini memainkan peran penting dalam berbagai sektor, seperti pertanian, kesehatan, industri, dan lingkungan.

Dengan kemajuan teknologi, potensi mikroorganisme semakin luas. Teknik seperti rekayasa genetika dan biologi sintetik memungkinkan para ilmuwan untuk memodifikasi mikroorganisme agar memiliki kemampuan baru yang lebih spesifik dan efektif. Oleh karena itu, memahami klasifikasi mikroorganisme menjadi krusial agar kita dapat mengoptimalkan pemanfaatannya dalam berbagai bidang bioteknologi. Bab ini akan membahas dasar-dasar klasifikasi mikroorganisme dan jenis-jenis mikroorganisme, seperti: bakteri, jamur (kapang dan khamir), alga dan virus dikaitkan perannya dalam bioteknologi.

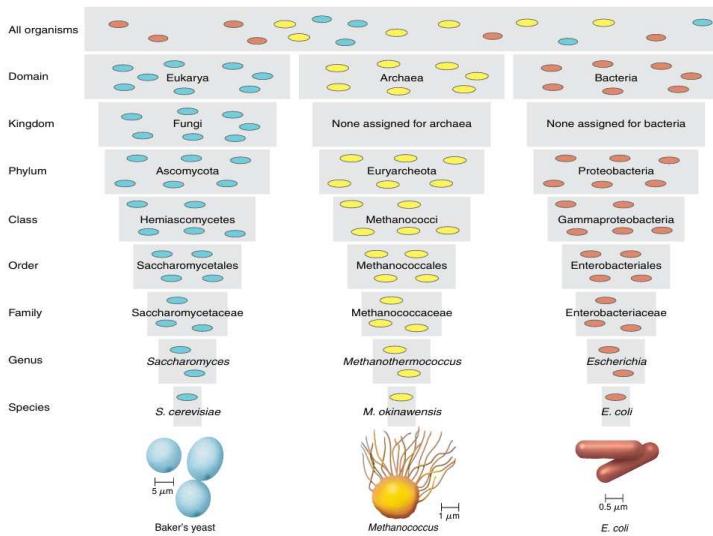
### B. Klasifikasi Mikroorganisme dalam Bioteknologi

#### 1. Taksonomi

Istilah taksonomi berasal dari bahasa Yunani *taxis* (susunan) dan *nomos* (hukum/aturan), yang pertama kali

diusulkan oleh Candolle tahun 1813 sebagai teori klasifikasi tumbuhan. Kemudian dalam perkembangannya, Linnaeus mengembangkan hierarki ini untuk klasifikasi hewan (Rosadi & Pratomo, 2014).

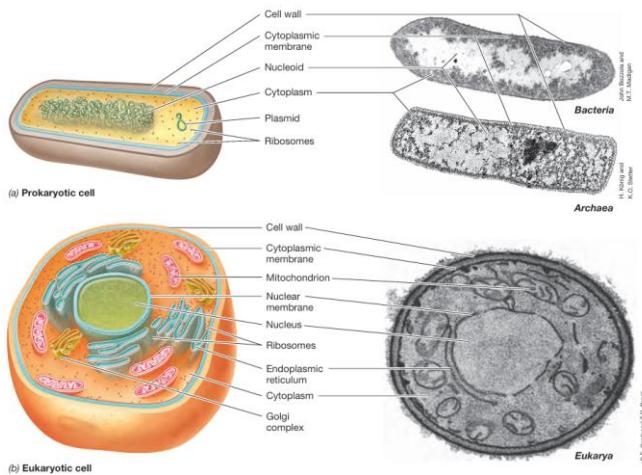
Semua organisme dapat dikelompokkan ke dalam serangkaian subdivisi yang membentuk hierarki taksonomi. Spesies bakteri menggunakan beberapa teknik dalam klasifikasi. Morfologi adalah cara paling sederhana dengan menunjukkan berbagai bentuk bakteri, seperti batang, kokus, spiral atau lengkung. Meskipun demikian, bakteri yang dikelompokkan dalam klasifikasi yang berbeda dapat memiliki bentuk yang sama. Sehingga, faktor-faktor seperti metabolisme dan sifat biokimia merupakan cara lain untuk menentukan klasifikasi bakteri. Perkembangan dalam teknik analisis molekuler memungkinkan para bakteriologi dalam membedakan bakteri menurut perbedaan RNA serta sekuen gen tertentu. Genus terdiri dari spesies yang berbeda satu sama lain. Misalnya nama genus *Pleurotus* untuk jamur tiram, terdiri dari semua jenis jamur (jamur tiram biasa, jamur tiram coklat, jamur tiram coklat, jamur tiram putih dan seterusnya). Meskipun setiap spesies jamur tiram berbeda setiap spesies, semuanya terkait secara genetik. Sama seperti sejumlah spesies membentuk genus, genus yang terkait akan membentuk famili. Sekelompok famili yang serupa membentuk ordo, dan sekelompok ordo yang serupa membentuk kelas. Kelas yang terkait akan membentuk filum. Semua filum yang berkerabat satu sama lain membentuk suatu kingdom, dan kingdom yang berkerabat dikelompokkan ke dalam suatu domain (Gambar 1).



**Gambar 1.** Hierarki taksonomi spesies mikroba  
(Madigan, Bender, Buckley, Sattley, & Stahl, 2021)

## 2. Klasifikasi Prokariotik dan Eukariotik

Bersadarkan materi genetik di dalam sel, mikroorganisme dibedakan menjadi dua yaitu sel prokariotik yang tidak memiliki membran inti dan sel eukariotik yang memiliki membran inti. Hampir semua komponen sel memiliki banyak kesamaan (Gambar 2). Semua sel memiliki membran sitoplasma, ribosom, dan dinding sel. Sel-sel eukariotik memiliki nukleus yang dibatasi membran (karion), yang kemudian menjadi serangkaian kromosom yang berfungsi sebagai gudang utama menyimpan informasi genetik dalam sel. Sel-sel eukariota juga mengandung organel lain yang terikat membran yang memiliki informasi genetik, yaitu mitokondria dan kloroplas. Pada prokariota, kromosom berupa molekul DNA melingkar tertutup yang terletak di sitoplasma, tidak dikelilingi oleh membran nuklear, dan mengandung semua informasi yang diperlukan untuk reproduksi sel. Prokariota juga tidak memiliki organel lain yang terikat membran (Tortora, Funke, & Case, 2021).



**Gambar 2.** Struktur sel mikroba

(Madigan, Bender, Buckley, Sattley, & Stahl, 2021)

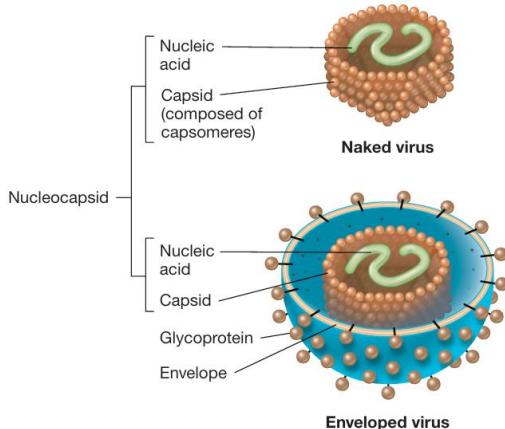
Jamur, tumbuhan, dan hewan termasuk tiga kingdom organisme eukarya yang kompleks dan sebagian besar multiseluler. Kingdom jamur mencakup khamir uniseluler, kapang multiseluler, dan spesies makroskopis seperti jamur. Bacteria dan archaea adalah prokariota, setiap domain dibagi menjadi filum. Ingat, bahwa klasifikasi taksonomi didasarkan pada kesamaan dalam urutan nukleotida rRNA sampai pada tingkat spesies.

### 3. Klasifikasi Virus

Virus tidak diklasifikasikan sebagai bagian dari salah satu dari tiga domain bacteria, archaea, dan eukarya karena tidak dianggap sebagai entitas hidup. Ada tiga hipotesis tentang asal usul virus: (1) Virus muncul dari untaian asam nukleat yang bereplikasi secara independen (seperti plasmid). (2) Virus berkembang dari sel degeneratif yang, melalui beberapa generasi, secara bertahap kehilangan kemampuan untuk bertahan hidup secara independen tetapi dapat bertahan hidup ketika dikaitkan dengan sel lain. (3) Virus berevolusi bersama dengan sel inang (Plotkin & Orenstein, 2018).

Virus adalah elemen genetik yang hanya dapat berkembang biak di dalam sel hidup, yang disebut sel inang. Virus bergantung pada sel inang untuk energi, zat antara metabolisme, dan sintesis protein, sehingga mereka adalah parasit intraseluler obligat. Namun, virus memiliki genom asam nukleatnya sendiri yang tidak bergantung pada genom inang. Meskipun virus bukan sel, genomnya mengkodekan fungsi-fungsi yang diperlukan untuk berkembang biak dan mereka memiliki bentuk ekstraseluler yang rumit secara struktural, yang disebut virion. Virion memungkinkan virus untuk berpindah dari satu sel inang ke sel inang lainnya.

Virion tersusun dari cangkang protein, yang disebut kapsid, struktur bagian dalam asam nukleat ditambah protein kapsid disebut nukleokapsid. Sebagian besar virus bakteri dan tanaman tidak memiliki lapisan luar atau disebut *naked*, sedangkan banyak jenis virus lainnya, terutama virus hewan, memiliki lapisan luar. Lapisan luar tersebut tersusun dari lapisan ganda fosfolipid yang diambil dari membran sel inang yang disebut *enveloped* (Gambar 3). Virion melindungi genom virus saat virus berada di luar sel inang, dan protein pada permukaan virion penting dalam menempatkannya ke sel inangnya (Pommerville, 2021).



Gambar 3. Perbedaan partikel virus *naked* dan *enveloped*.

4. Jenis-Jenis Mikroorganisme yang berperan dalam Bioteknologi
  - a. Bakteri.

Bakteri adalah mikroorganisme uniselular yang tidak memiliki membran inti, aktif secara metabolismik, dan membelah dengan pembelahan biner. Sebagian besar bakteri dianggap memiliki potensi membahayakan. Sebenarnya, hanya sedikit spesies bakteri yang menyebabkan penyakit pada manusia, hewan, tumbuhan, atau organisme lainnya. Bakteri merupakan mikroorganisme pertama yang dipilih untuk digunakan sebagai *living factories*. Setelah *Homo sapiens*, bakteri *E. coli* merupakan organisme yang paling banyak dipelajari sehingga pemahaman mengenai genetika, fisiologi dan reaksi biokimia dari *E.coli* telah banyak diketahui. Bakteri mudah beradaptasi dan dapat berkembang biak dengan sangat cepat pada media yang sederhana, murah dan mudah diperoleh. Misalnya, *E. coli* menggandakan diri setiap 20 menit atau lebih dalam media yang kaya nutrisi. Terakhir, bakteri berukuran sangat kecil ( $0,5\text{-}5 \mu\text{m}$ ) sehingga hingga satu miliar sel dapat muat pada satu cawan petri yang hanya berdiameter 10 cm (Rini & Jamilatur, 2020). Hal ini memungkinkan peneliti untuk menguji dan mempelajari mutasi dan rekombinasi DNA menggunakan populasi bakteri yang besar. Misalnya, bakteri rekombinan yang diproduksi melalui rekayasa genetika sangat berguna dalam memproduksi biomolekul langka seperti interferon, yang dibutuhkan untuk penelitian dan pengobatan pasien autoimun (Raghuvanshi, Yadav, & Ali, 2023).

Kemajuan besar dalam bakteri dalam bioteknologi adalah pengembangan vaksin yang efektif (misalnya, vaksin polisakarida pneumokokus, toksoid difteri, dan toksoid tetanus) serta vaksin lain (misalnya, vaksin kolera, tifoid, dan wabah) yang kurang efektif

atau memiliki efek samping . Kemajuan besar lainnya adalah penemuan antibiotik. Meskipun belum mampu memberantas penyakit bakteri dengan tuntas, tetapi antibiotik merupakan salah satu cara pengobatan yang *powerfull*. Kemanjurannya antibiotik berkurang dengan munculnya bakteri yang resistan terhadap antibiotik. Walaupun, resistensi menjadi suatu masalah, secara paradoks gen resistensi antibiotik merupakan penanda yang sangat diperlukan dalam melakukan rekayasa genetika. Pemeriksaan genetik dan Polymerase Chain reaction (PCR) berguna dalam identifikasi patogen mikroba pada spesimen pasien. Manipulasi genetik bakteri patogen menjadi sangat diperlukan dalam mendefinisikan mekanisme virulensi. Karena lebih banyak antigen protein diidentifikasi, dikloning, dan disekuens, vaksin bakteri rekombinan dapat jauh lebih dikembangkan. Jenis bakterial vaksin untuk resistensi antibiotik *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* telah dikembangkan dengan pendekatan ini (Sette & Rappuoli, 2010).

b. Jamur

Jamur atau fungi merupakan organisme non-motil yang tersebar luas didunia yang mencakup kelompok kapang, kamir dan jamur makroskopi. Sekitar 100,000 spesies jamur telah teridentifikasi. Sebagian besar spesies jamur adalah terestrial dan berukuran mikroskopis termasuk kapang dan khamir. Sebagian besar jamur bersifat multiseluler, membentuk jaringan filamen yang disebut hifa dan menghasilkan spora aseksual (Tortora, Funke, & Case, 2021). Jamur yang hidup ditanah dan bangkai tanaman memainkan peran penting dalam penguraian bahan organik. Selain bersifat patogen pada tanaman, spesies jamur tertentu juga membentuk asosiasi simbiosis dengan tanaman, yang memudahkan tanaman memperoleh mineral dari

tanah, dan banyak jamur yang bermanfaat bagi manusia melalui fermentasi dan sintesis antibiotik.

Organisme mikroskopis ini digunakan sebagai sumber makanan dan suplemen pakan. Misalnya asam organik dari *Aspergillus* dan *Rhizopus*, dan produksi enzim dari *Aspergillus*. *Aspergillus oryzae* dan *A. awamori* dikenal sebagai penghasil  $\alpha$ -amilase dan glukoamilase yang baik. *Penicillium* juga dikenal sebagai penghasil enzim amilase dan *Fusarium* sp. Memiliki potensi amilolitik. Enzim amilolitik yang memiliki aplikasi bioteknologi di industri makanan, deterjen, kertas, dan tekstil. Enzim ini digunakan untuk produksi sirup glukosa, glukosa kristal, sirup jagung fruktosa tinggi, sirup maltosa, dll. Dalam industri deterjen, enzim ini digunakan sebagai aditif untuk menghilangkan noda berbasis pati. Dalam industri kertas, enzim ini digunakan untuk mengurangi viskositas pati agar dapat melapisi kertas dengan baik. Dalam industri tekstil, amilase digunakan untuk mengubah ukuran serat tekstil menjadi lengkung. Demikian pula, enzim seperti protease, lipase, atau xilanase memiliki aplikasi yang luas di sektor makanan (Singh, Kumar, Mittal, & Mehta, 2017). Jamur telah dikenal luas potensinya dalam pengembangan teknologi bioproses guna memenuhi permintaan yang meningkat seiring dengan pertumbuhan populasi dunia yang terus berlanjut.

c. Alga

Alga merupakan organisme eukariotik fotoautotrof yang tidak memiliki jaringan (akar, batang, dan daun) seperti pada tumbuhan. Beberapa alga bersifat uniselular dengan ukuran mikroskopis; yang lain membentuk filamen; dan beberapa memiliki talus multiselular. Tubuh multiseluler dari alga disebut talus. Talus dari alga yang lebih besar biasanya disebut rumput laut, yang terdiri dari *holdfast* (yang mengikat alga ke batu), tangkai seperti batang dan sering kali

berongga atau *stipe*, dan bilah seperti daun atau *blade*. Sel-sel yang menutupi talus dapat melakukan fotosintesis. Talus tidak memiliki jaringan konduktif (xilem dan floem) yang merupakan karakteristik tumbuhan vaskular; alga menyerap nutrisi dari air melalui seluruh permukaannya. *Stipe* tidak mengalami lignifikasi atau berkayu, sehingga tidak memberikan dukungan seperti batang tanaman; sebaliknya, air di sekitarnya mendukung talus alga; beberapa alga juga didukung oleh *bladder* yang mengapung dan berisi gas yang disebut pneumatosit.

Sebagian besar alga ditemukan di lautan. Lokasi mereka bergantung pada ketersediaan nutrisi yang sesuai, panjang gelombang cahaya, dan habitat mereka ditemukan. Keragaman filogenetik alga juga tercermin dalam keragaman morfologi, fisiologi, dan biokimianya. Alga telah memiliki aplikasi bioteknologi yang luas sebagai sumber bahan kimia yang bermanfaat seperti polisakarida, karotenoid, pigmen fikobilin, dan asam lemak tak jenuh ganda rantai panjang (Minhas, Hodgson, Barrow, & Adholeya, 2016). Dalam industri makanan dan pakan, alga dimanfaatkan sebagai pupuk dan pemacu pertumbuhan di bidang pertanian, dan dalam pengolahan air limbah. Mikroalga, banyak membuka minat baru sebagai sumber potensial bahan bakar terbarukan. Pencarian produk baru dari spesies baru serta aplikasi baru atau yang ditingkatkan terus berlanjut. Ada perkembangan baru dalam kultur alga, yaitu perkembangan dalam biologi molekuler, metabolomik dan 'omic' lainnya menciptakan peluang untuk bioteknologi alga. Mikroalga hijau *Chlamydomonas reinhardtii* menjadi model spesies dalam studi bioteknologi karena metode molecular sudah diketahui dengan baik (Salomé & Merchant, 2019).

d. Virus

Virus adalah parasit obligat yang terdapat pada manusia, hewan, tumbuhan, dan organisme hidup lainnya yang dapat menyebabkan penyakit yang mematikan. Dalam bidang pertanian, virus dapat menyebabkan kerugian pada semua hasil panen atau menyebabkan penurunan drastis kualitas produk (Roger, 2021). Dalam bidang kedokteran, virus menyebabkan kematian bagi manusia dan hewan, seperti Ebola, rabies, HIV, cacar, influenza, demam berdarah, dan SARS-CoV-2. Oleh karena itu, tidak mengherankan bahwa virus tidak memiliki citra publik yang baik .

Sebagian besar virus tidak diketahui, namun kemajuan teknologi melalui next-generation sequencing mempercepat penemuan virus baru dan menunjukkan bahwa virus-virus memiliki karakteristik unik yang menjadikannya sebagai tools baru dalam berbagai aplikasi bioteknologi. Virus merupakan agen penting dalam pembuatan vaksin. Vaksin adalah sediaan biologis yang merangsang sistem kekebalan tubuh untuk mengenali dirinya sebagai ancaman asing kemudian menghancurkan dan mengingatnya. Karakteristik vaksin berikut dapat diubah atau ditingkatkan oleh bioteknologi. Bioteknologi terutama digunakan dalam tiga cara sebagai berikut: pemisahan antigen murni menggunakan antibodi monoklonal spesifik, sintesis antigen dengan bantuan gen kloning; dan sintesis peptida untuk digunakan sebagai vaksin (Chen, Cheng, Yang, & Yeh, 2016).

Namun, vaksin hanyalah salah satu dari banyak contoh bagaimana virus digunakan sebagai agen yang bermanfaat. Virus terlibat dalam banyak proses biologis yang telah merevolusi beberapa bidang, yaitu gene editing, yang dipatenkan melalui hadiah Nobel tahun 2020, yang diberikan kepada Emmanuelle Charpentier

dan Jennifer Doudna, atas penemuan tracrRNA sebagai bagian dari sistem kekebalan bakteri, CRISPR/Cas, yang membuat virus tidak aktif dengan memotong daerah spesifik DNA virus dan telah diterapkan di beberapa bidang sebagai metodologi untuk merubah gen dengan tepat. Di antara virus, terdapat virus yang menginfeksi bakteri, yaitu bakteriofag yang juga telah diselidiki potensinya untuk terapi, karena bakteriofag mampu menargetkan, menginfeksi, dan menghancurkan bakteri tertentu dan tidak berbahaya bagi manusia. Bakteriofag menghadirkan potensi yang sangat menarik, terutama untuk digunakan melawan bakteri yang sangat resistan terhadap antibiotik (Haq, et al., 2012). Virus juga dapat digunakan sebagai vektor dengan membuang bagian patogeniknya sambil mempertahankan kemampuannya untuk membawa gen tertentu, menjadika virus ebagini alat yang sangat serbaguna untuk membawa dan mengirimkan materi genetik. Vektor virus telah digunakan dalam terapi gen dengan memasukkan gen yang berfungsi ke dalam sel manusia. Ada beberapa jenis vektor virus yang digunakan dalam sel mamalia, termasuk lentivirus dan adenovirus yang banyak digunakan dalam terapi gen (Segura, Ayoub, Hart, & Kohn, 2023).

Selain semua aplikasi bioteknologi yang berfokus pada industri obat-obatan dan farmasi, virus juga telah digunakan di bidang lain, seperti ilmu materisil dan nanoteknologi sebagai sumber nanopartikel dan building blocks. Industri lain seperti kosmetik dan elektronik, adalah beberapa bidang lain yang juga mendapatkan manfaat dari penggunaan virus (Carballal, Gutierrez-Gutierrez, Rivas, & Garcia-Fuentes, 2023).

## DAFTAR PUSTAKA

- Bentahar, S., Abada, R., & Ykhlef, N. (2023). Bbiotechnology: Definitios, Types and Main Applications. *Ymer DIGITAL*, 563-575.
- Carballal, R. M., Gutierrez-Gutierrez, S., Rivas, C., & Garcia-Fuentes, M. (2023). Viral protein nanoparticles (Part 1): Pharmaceutical characteristics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 187:106460.
- Chen, Y.-C., Cheng, H.-F., Yang, Y.-C., & Yeh, M. K. (2016). Biotechnologies Applied in Biomedical. *Vaccines*.
- Haq, I. U., Waqas, N. C., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Maha Nadeem Akhtar, A. S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J*, 9, 9.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock biology of microorganisms* (16th ed.). Pearson Education Limited..
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. . *Front. Microbiol.*, 7:546.
- Plotkin, S. A., & Orenstein, W. A. (2018). *Vaccines Seventh Edition*. Elsevier, Inc.
- Pommerville, J. C. (2021). *Fundamentals of Microbiology Twelfth Edition*. Jones & Bartlett Learning.
- Raghuvanshi, V., Yadav, P., & Ali, S. (2023). Interferon production by Viral, Bacterial & Yeast system: A comparative overview in 2023. *International Immunopharmacology*, 1567-5769.
- Rini, C. S., & Jamilatur, R. (2020). *Buku Ajar Mata Kuliah Bakteriologi Dasar*. SIDOARJO: UMSIDA PRESS.
- Roger, A. C. (2021). Global plant virus disease pandemics and epidemics. *Plants*, 10:233.
- Rosadi, B., & Pratomo. (2014). *Modul 1 Taksonomi Secara Umum*. Universitas Terbuka Pers.
- Salomé, P. A., & Merchant, S. S. (2019). A series of fortunate events: introducing Chlamydomonas as a reference organism. *Plant Cell*, 31:1682-1707.

- Segura, E., Ayoub, P., Hart, K., & Kohn, D. (2023). Gene therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies: From Discovery to Clinical Trials. *Viruses*, 15.
- Sette, A., & Rappuoli, R. (2010). Review: Reverse vaccinology: Developing vaccines in the era of genomics. *Immunity*, 33(4):530-541.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. (2017). Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, 7(1):15.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2021). *Microbiology: An Introduction, 13th Edition*. Pearson Education Limited .

## BIODATA PENULIS



**Efrita Bataragoa, M.Biotech**  
lahir di Manado, pada tanggal 12 Agustus 1995, memiliki garis keturunan suku Toraja-Mamasa dan Minahasa. Berhasil menyelesaikan pendidikan S1 di Program Studi Biologi, Surya University dan S2 di Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Sampai saat ini penulis merupakan seorang pengajar di Universitas Halu Oleo, Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi Republik Indonesia.

# BAB 3

## Teknik Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme

\*Yenti Purnamasari, S.Si, M.Kes\*

### A. Pendahuluan

Isolasi dan identifikasi mikroorganisme adalah proses penting dalam mikrobiologi yang bertujuan memisahkan mikroorganisme tertentu dari lingkungannya dan menentukan karakteristiknya. Proses isolasi melibatkan pemisahan satu jenis mikroba dari campuran berbagai mikroba lainnya, biasanya dengan menumbuhkannya pada media padat sehingga setiap sel mikroba dapat berkembang menjadi koloni yang terpisah (Sabbathini et al., 2017). Setelah isolasi, identifikasi mikroorganisme dilakukan melalui pengamatan morfologi koloni, pewarnaan Gram, dan uji biokimia untuk mengenali spesies atau genus mikroba tersebut.

Dalam konteks bioteknologi mikroba, teknik isolasi dan identifikasi mikroorganisme memiliki peran krusial. Dalam industri, mikroorganisme digunakan untuk produksi enzim, antibiotik, dan produk fermentasi lainnya (Saraswati, 2020). Selain itu, dalam bidang kesehatan, identifikasi mikroorganisme patogen penting untuk diagnosis penyakit dan pengembangan terapi yang tepat. Di sektor lingkungan, mikroorganisme yang diisolasi dan diidentifikasi dapat dimanfaatkan untuk bioremediasi, yaitu proses pembersihan polutan menggunakan agen hidup (Ed-Har et al., 2017). Dengan demikian, penguasaan teknik isolasi dan identifikasi mikroorganisme menjadi fundamental dalam penerapan bioteknologi untuk meningkatkan kualitas hidup manusia.

## B. Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme

### 1. Isolasi Mikroorganisme

#### a. Tujuan

Isolasi mikroorganisme merupakan langkah awal dan penting dalam kegiatan mikrobiologi untuk mendapatkan kultur murni, yaitu populasi mikroba yang berasal dari satu sel atau unit mikroorganisme yang sama. Dengan kultur murni ini, para peneliti dapat mengidentifikasi spesies mikroba secara akurat dan mengkaji karakteristiknya, seperti kemampuan metabolismik, patogenitas, resistensi antibiotik, atau potensinya dalam produksi bahan bioaktif. Isolasi juga sangat penting dalam pengembangan produk bioteknologi berbasis mikroba, seperti antibiotik, enzim industri, biofertilizer, dan probiotik. Tanpa teknik isolasi yang tepat, karakteristik mikroorganisme bisa tertutup oleh mikroba lain yang lebih dominan dalam campuran awal (Pommerville, 2018).

Mikroorganisme dapat ditemukan hampir di seluruh lingkungan. Beberapa sumber umum isolasi mikroba meliputi (Prakash et al., 2013):

- 1) Tanah: Merupakan reservoir terbesar dan paling beragam untuk mikroorganisme, termasuk bakteri, jamur, actinomiseta, dan alga. Mikroba tanah banyak digunakan dalam eksplorasi senyawa antimikroba dan degradasi bahan organik.
- 2) Air: Air tawar, laut, dan limbah mengandung mikroba spesifik seperti Cyanobacteria, bakteri heterotrof, dan mikroalga, yang berperan penting dalam ekosistem perairan dan juga berpotensi sebagai sumber bioenergi.
- 3) Udara: Meskipun bukan media hidup utama, udara dapat membawa spora jamur, bakteri, dan virus yang tersebar melalui aerosol, debu, atau droplet.
- 4) Tubuh manusia dan hewan: Mikroorganisme yang diisolasi dari kulit, rongga mulut, saluran

pencernaan, dan saluran pernapasan memiliki peran baik sebagai mikrobiota normal maupun patogen. Isolasi mikroba dari tubuh manusia sangat penting dalam bidang kedokteran dan diagnostik klinis.

- 5) Lingkungan industri dan rumah sakit: Sering menjadi sumber mikroorganisme yang memiliki resistensi terhadap bahan kimia atau antibiotik.
- b. Teknik Aseptik dan Pentingnya Kondisi Steril (Lamerhofer, 2022)

Teknik aseptik adalah prosedur yang digunakan untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme asing dalam proses isolasi dan identifikasi. Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa hanya mikroorganisme target yang tumbuh dalam kultur. Teknik ini mencakup:

- 1) Sterilisasi alat dan media: Menggunakan autoklaf, oven, atau filtrasi.
- 2) Flaming loop dan mulut tabung: Menggunakan api Bunsen untuk membunuh mikroorganisme di alat kerja.
- 3) Kerja di bawah laminar airflow cabinet: Untuk menciptakan lingkungan kerja bebas partikel dan mikroba.
- 4) Penggunaan sarung tangan, masker, dan desinfektan: Untuk menjaga sterilitas lingkungan kerja dan menghindari infeksi silang.

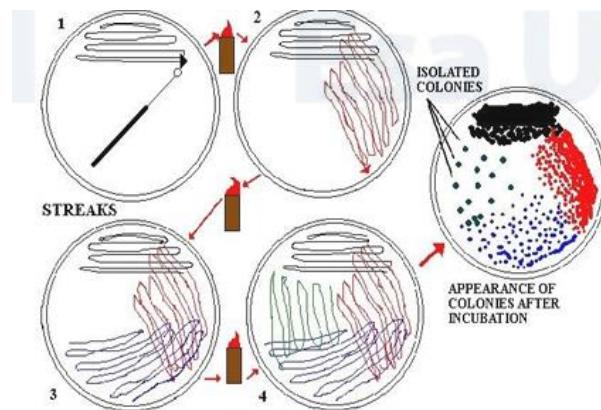
Kegagalan menerapkan teknik aseptik dapat menyebabkan kontaminasi silang yang mengaburkan hasil isolasi dan identifikasi, serta menimbulkan risiko biohazard bagi pekerja laboratorium. Dalam konteks industri dan klinis, pelanggaran prinsip aseptik bahkan dapat menyebabkan kerugian besar dan membahayakan kesehatan masyarakat.

### c. Metode Isolasi

Beberapa metode dasar yang umum digunakan dalam laboratorium mikrobiologi meliputi teknik gores, teknik sebar, teknik tuang, serta metode khusus untuk isolasi mikroorganisme anaerob. Keberhasilan isolasi juga sangat dipengaruhi oleh pemilihan media pertumbuhan yang tepat.

#### 1) Teknik Gores (Streak Plate Method)

Teknik gores bertujuan untuk mengencerkan sampel mikroba secara bertahap pada permukaan media agar diperoleh koloni terpisah yang berasal dari satu sel mikroba. Umumnya digunakan untuk isolasi dari sampel padat atau cair. Metode ini sangat efektif dan sederhana dalam memperoleh kultur murni, terutama bila dilakukan dengan teknik aseptik yang ketat.



**Gambar 1.** Teknik Gores (Saraswati, 2020)

Berbagai metode goresan pada medium mikrobiologi adalah goresan T, goresan radian, goresan kuadran dan goresan sinambung.

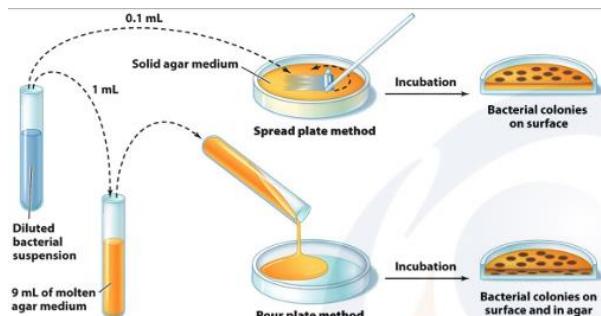
#### 2) Teknik Sebar (Spread Plate Method)

Metode ini digunakan dengan menyebarkan volume kecil suspensi mikroba yang telah

diencerkan ke permukaan media agar koloni tumbuh tersebar merata. Metode ini cocok untuk menghitung jumlah koloni mikroba (colony-forming units/CFU) serta mengisolasi mikroba dari campuran yang homogen.

### 3) Teknik Tuang (Pour Plate Method)

Dalam teknik ini, suspensi mikroba dicampurkan dengan media agar yang masih cair dan kemudian dituangkan ke dalam cawan Petri. Mikroorganisme akan tumbuh baik di permukaan maupun di dalam media. Metode ini juga dapat digunakan untuk menghitung jumlah total mikroba dan untuk isolasi bakteri aerob dan fakultatif anaerob.



**Gambar 2.** Beberapa metode Isolasi (Saraswati, 2020)

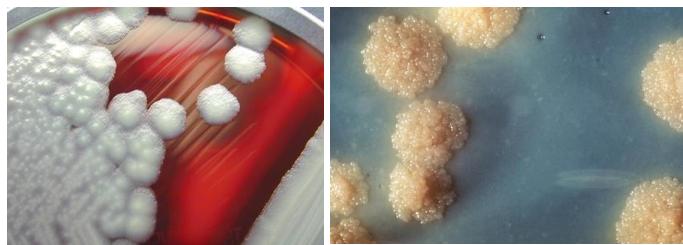
## 2. Identifikasi Mikroorganisme

### a. Identifikasi secara Makroskopis (Sousa et al., 2013)

Identifikasi awal bakteri secara makroskopis dilakukan dengan mengamati karakteristik koloni yang tumbuh di media padat seperti agar. Pengamatan ini memberikan informasi penting mengenai bentuk, warna, ukuran, dan tekstur koloni yang dapat menjadi indikator awal spesies mikroba yang tumbuh. Beberapa karakteristik koloni yang diamati meliputi:

- 1) Bentuk koloni (form): bulat, tidak beraturan (irregular), rhizoid, filamentous.

- 2) Tepi koloni (margin): entire (rata), undulate (bergelombang), lobate (berlekuk).
- 3) Elevasi koloni: flat, convex, raised, umbonate.
- 4) Warna koloni (pigmentasi): seperti hijau (*Pseudomonas aeruginosa*), kuning, merah, atau tidak berpigmen sama sekali.
- 5) Ukuran dan konsistensi: besar atau kecil, lembut atau keras.
- 6) Transparansi koloni: opaque, translucent, atau transparan.



**Gambar 3.** Penampakan secara makroskopis koloni bakteri (Adolph, 2016)

Meski metode ini bersifat kualitatif dan tidak sepenuhnya spesifik, namun tetap menjadi bagian penting dalam identifikasi mikroba sebelum dilakukan uji biokimia atau molekuler. Selain karakter visual, pengamatan organoleptik juga digunakan dalam identifikasi bakteri. Karakteristik ini mencakup bau koloni, tekstur permukaan, dan kekentalan koloni yang dapat diamati dengan indra peraba dan penciuman.

Contoh:

- 1) *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan bau khas seperti anggur atau tanah basah.
- 2) *Proteus spp.* memiliki bau menyengat seperti amonia atau busuk akibat senyawa volatil yang dihasilkannya.

Tekstur koloni juga bervariasi, misalnya berlendir, lengket, granular, atau kering. Meskipun pengamatan ini bersifat subjektif, tetap digunakan sebagai **indikator awal** sebelum pengujian lanjutan seperti biokimia atau molekuler.

- b. Identifikasi Bakteri Secara Mikroskopis (Madigan et al., 2021)

Identifikasi bakteri secara mikro dilakukan dengan pengamatan bentuk sel dan struktur eksternal bakteri menggunakan mikroskop, baik mikroskop cahaya maupun mikroskop elektron, untuk memahami morfologi dan karakteristik dasar bakteri

1) Bentuk Sel Bakteri

Pengamatan bentuk sel merupakan langkah awal yang penting dalam taksonomi bakteri, di mana bentuk umum yang diamati meliputi:

- a) Coccus (bulat) seperti pada *Staphylococcus aureus*
- b) Basil (batang) seperti pada *Escherichia coli*
- c) Spirillum (spiral) seperti pada *Spirillum minus*
- d) Vibrio (komma) seperti pada *Vibrio cholerae*
- e) Filamentous (berbentuk benang) seperti pada *Actinomyces spp.*

Common Prokaryotic Cell Arrangements		
Name	Description	Illustration
Coccus (pl. cocci)	Single coccus	
Diplococcus (pl. diplococci)	Pair of two cocci	
Tetrad (pl. tetrads)	Grouping of four cells arranged in a square	
Streptococcus (pl. streptococci)	Chain of cocci	
Staphylococcus (pl. staphylococci)	Cluster of cocci	
Bacillus (pl. bacilli)	Single rod	
Diplobacillus (pl. diplobacilli)	Pair of rods	
Streptobacillus (pl. streptobacilli)	Chain of rods	
Palisade (pl. palisades)	V- or L-shaped formations of rods	

**Gambar 4.** Bentuk Sel Bakteri (Adolph, 2016)

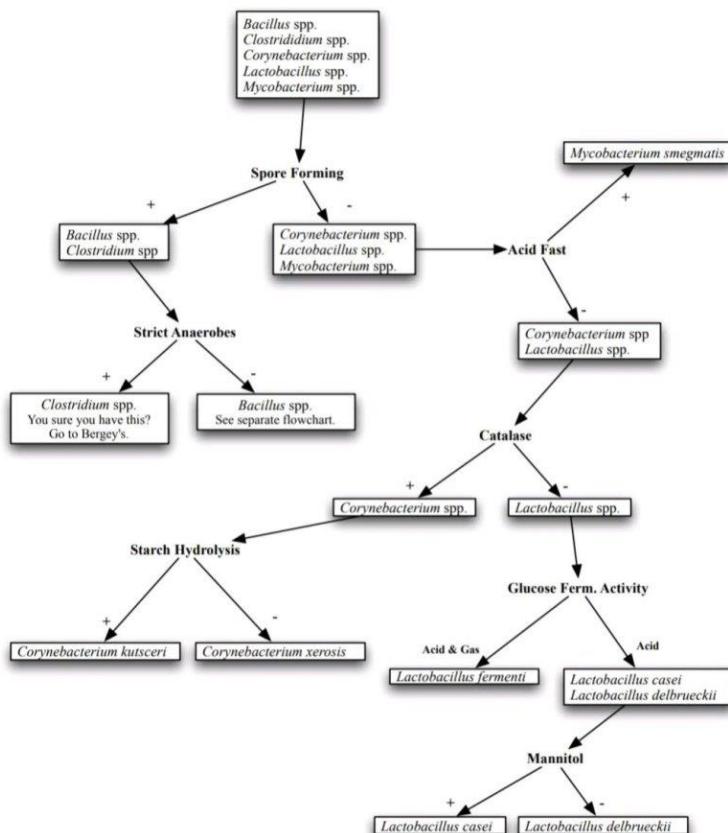
- 2) Struktur Eksternal / Organel Tambahan (Madigan et al., 2021; Willey et al., 2020)  
Pengamatan mikroskopis juga memungkinkan identifikasi struktur eksternal seperti:
  - a) Flagela (bulu cambuk) yang berfungsi sebagai alat gerak; susunan dan jumlahnya (monotrik, lofotrik, peritrik, dll.) digunakan untuk identifikasi spesies.
  - b) Fimbriae dan Pili, yang merupakan struktur berbentuk rambut halus, berfungsi dalam proses adhesi ke permukaan inang atau dalam transfer materi genetik melalui konjugasi.
  - c) Kapsul, yaitu lapisan pelindung polisakarida yang menyelubungi dinding sel beberapa

- bakteri; kapsul ini dapat diamati menggunakan teknik pewarnaan negatif seperti tinta India.
- 3) Pewarnaan Mikroskopis (Madigan et al., 2021; Willey et al., 2020)
- Untuk membantu pengamatan bentuk dan struktur sel, digunakan teknik pewarnaan khusus:
- Pewarnaan Gram, membedakan antara bakteri Gram-positif dan Gram-negatif berdasarkan komposisi peptidoglikan dalam dinding sel.
  - Pewarnaan Ziehl-Neelsen, digunakan untuk mendeteksi bakteri tahan asam seperti *Mycobacterium tuberculosis*.
  - Pewarnaan kapsul, flagela, dan endospora dilakukan dengan metode pewarnaan khusus agar struktur tersebut dapat diamati secara jelas di bawah mikroskop.
- 4) Identifikasi Berdasarkan Sifat Biokimia
- Identifikasi mikroorganisme berdasarkan uji biokimia merupakan pendekatan penting dalam mikrobiologi untuk mengetahui kemampuan metabolismik spesifik suatu mikroba. Setiap mikroorganisme memiliki enzim-enzim khas yang memungkinkan mereka memetabolisme zat tertentu, menghasilkan senyawa tertentu, atau menunjukkan reaksi khas terhadap substrat tertentu. Dengan melakukan serangkaian uji biokimia, kita dapat mengetahui karakteristik fisiologi dan metabolisme mikroba, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk mengidentifikasi genus bahkan spesies mikroba tersebut.
- Beberapa uji biokimia yang sering digunakan meliputi:
- Uji Katalase - Menguji kemampuan mikroba memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Jika terbentuk gelembung, menunjukkan hasil positif. Uji ini membedakan

- bakteri katalase positif (seperti *Staphylococcus*) dari katalase negatif (seperti *Streptococcus*).
- b) Uji Oksidase - Menguji keberadaan enzim sitokrom c oksidase. Perubahan warna menjadi ungu menunjukkan hasil positif. Biasanya digunakan untuk mengidentifikasi *Pseudomonas* atau *Neisseria*.
  - c) Uji Fermentasi Gula - Menguji kemampuan mikroba memfermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa) menjadi asam atau gas. Biasanya menggunakan indikator warna seperti phenol red.
  - d) Uji Indole - Menguji kemampuan mikroba memecah asam amino triptofan menjadi indole, yang dideteksi dengan reagen Kovac.
  - e) Uji Urease - Menilai apakah mikroba dapat memecah urea menjadi amonia, yang menyebabkan peningkatan pH dan perubahan warna media menjadi merah muda.
  - f) Uji TSI (Triple Sugar Iron) - Uji kompleks untuk mendeteksi fermentasi tiga jenis gula, produksi gas, dan produksi H<sub>2</sub>S.
  - g) Uji SIM (Sulfur, Indole, Motility) - Menguji produksi sulfur (H<sub>2</sub>S), kemampuan menghasilkan indole, dan motilitas bakteri.

## Gram Positive Rods ID Flowchart

### Gram Positive Rods



**Gambar 5.** Contoh alur identifikasi bakteri berdasarkan identifikasi makroskopis dan mikroskopis (Bergey, n.d.).

## DAFTAR PUSTAKA

- Adolph, R. (2016). *Microbiology*. ASM Press.  
<https://openstax.org/details/books/microbiology>
- Bergey. (n.d.). *Bergey's Manual - flow charts* « *Ginger Fingers*.  
<https://gingerfingers.wordpress.com/2021/02/11/bergeys-manual-flow-charts/>
- Ed-Har, A. A., Widyastuti, R., & Djajakirana, G. (2017). Isolasi dan Identifikasi Mikroba Tanah Pendegradasi Selulosa dan Pektin dari Rhizosfer Aquilaria malaccensis. *Buletin Tanah Dan Lahan*, 1(1), 58–64.
- Lamerhofer, M. (2022). *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology Sterilization methods and its applications*. 10(1), 7–008. <https://doi.org/10.15651/GJBB.22.10.37>
- Madigan, M., Blender, K., & Buckley, D. (2021). Edition Microorganisms. *Sixteenth Edition*, 1129.
- Pommerville, J. (2018). *Fundamentals of Microbiology - Jeffrey Pommerville - Google Books* (p. 588).  
[https://books.google.co.id/books?id=Cu3CDgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=twopage&q=f=false](https://books.google.co.id/books?id=Cu3CDgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=twopage&q=f=false)
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>
- Sabbathini, G. C., Pujiyanto, S., Wijanarka, & Lisdiyanti, P. (2017). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Genus *Sphingomonas* dari Daun Padi (*Oryza sativa*) di Area Persawahan Cibinong. *Jurnal Akademika Biologi*, 6(1), 59–64.  
<https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/biologi/article/view/19523>
- Saraswati, H. (Universitas E. U. (2020). 0 / 16. *Identifying and Selection System Development*, Nsa 637, 0–15.
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327–335.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>  
Willey, J. M. ., Sandman, K. M. ., & Wood, D. H. . (2020). *Prescott's microbiology (11th ed.)*.

## BIODATA PENULIS



**Yenti Purnamasari** lahir di Kendari, 04 Maret 1990. Menempuh pendidikan formal di Kota Kendari dan melanjutkan jenjang pendidikan Strata I pada Fakultas Farmasi Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan Universitas Hasanuddin pada tahun 2007 - 2011. Berselang setahun kemudian melanjutkan pendidikan di program Magister Ilmu Biomedik konsentrasi Mikrobiologi tahun 2012 - 2014. Sejak tahun 2015 - sekarang, Yenti Purnamasari tercatat sebagai staf Pengajar di Fakultas Kedokteran Universitas Halu Oleo, Program studi Kedokteran dan giat melakukan kegiatan penelitian di bidang mikrobiologi dengan topik biologi molekuler dan penyakit infeksi.

# BAB 4

## Kultur Mikroba dalam Skala Laboratorium dan Industri

\*Suwarja, S.Pd., M.Kes\*

### A. Pendahuluan

Kultur mikroba adalah proses menumbuhkan dan memperbanyak mikroorganisme di laboratorium menggunakan media yang mengandung nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba tersebut. Proses ini memungkinkan identifikasi jenis dan sifat mikroba melalui pengamatan pertumbuhan dan karakteristik koloninya. Kultur mikroba merupakan kunci penting dalam bidang mikrobiologi, sehingga diperlukan rekultur dan preservasi secara kontinu untuk menjaga viabilitas dan karakteristik mikroba (Rasyidah dan Fariani, 2021).

Kultur bakteri, atau proses menumbuhkan dan memperbanyak bakteri dalam kondisi terkontrol, memiliki peran penting baik dalam skala laboratorium maupun industri. Dalam skala laboratorium, teknik kultur bakteri digunakan untuk isolasi, identifikasi, dan penelitian karakteristik mikroorganisme. Misalnya, metode kultur murni memungkinkan peneliti memisahkan mikroba dari lingkungannya dan menumbuhkannya sebagai isolat tunggal, yang esensial untuk studi mendalam tentang spesies tersebut. Kultur mikroba adalah metode untuk menumbuhkan dan memperbanyak mikroorganisme, seperti bakteri, jamur, atau virus, dalam kondisi laboratorium yang terkendali. Proses kultur mikroba. Pada keadaan terkendali atau keadaan

laboratorium, dengan teknik inokulasi dapat dihasilkan kultur murni, kultur yang hanya terdiri atas satu tipe mikroorganisme. Organisme yang tidak diinginkan disebut kontaminan dan teknik mikrobiologi digunakan untuk mencegah kontaminasi tersebut (Erwin., et al, 2023).

## B. Konsep Kultur Mikroba

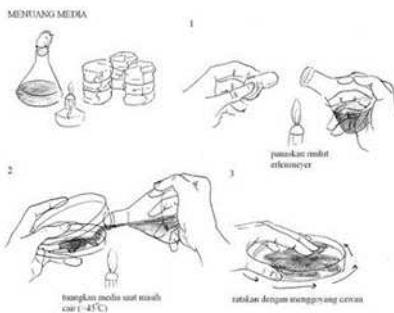
### 1. Teknik Kultur Mikroba di Laboratorium

#### a. Teknik Sterilisasi dan Teknik Aseptik

Teknik aseptis atau steril adalah suatu sistem cara bekerja (praktek) yang menjaga sterilitas ketika menangani pengkulturan mikroorganisme untuk mencegah kontaminasi terhadap kultur mikroorganisme yang diinginkan. Dasar digunakannya teknik aseptik adalah adanya banyak partikel debu yang mengandung mikroorganisme (bakteri atau spora) yang mungkin dapat masuk ke dalam cawan, mulut erlenmeyer, atau mengendap di area kerja. Pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan ini dapat mempengaruhi atau mengganggu hasil dari suatu percobaan. Mikroorganisme dapat juga "jatuh" dari tangan operator, sarung tangan atau jas laboratorium karena pergerakan lengan yang relatif cepat. Penggunaan teknik aseptik meminimalisir material yang digunakan terhadap agen pengontaminasi. Pada kenyataannya teknik aseptis tidak dapat melindungi secara sempurna dari bahaya kontaminan. Namun semakin banyak belajar dari pengalaman maka semakin mengurangi resiko yang ditimbulkan (Hafsan, 2014).

Teknik aseptik merupakan metode pertama yang dipelajari oleh orang-orang yang berkecimpung dalam bidang Mikrobiologi. Pada prinsipnya teknik aseptik adalah usaha menghindarkan setiap kontak antara kultur murni ("pure culture"), medium steril dan semua wadah steril serta permukaan meja kerja, dengan mikroorganisme kontaminan/ kompetitor (mikroorganisme yang tidak diinginkan). Teknik aseptik

dibutuhkan misalnya, pada saat melakukan kultivasi mikroorganisme dan pemindahan (transfer) kultur murni dari satu vessel (mis. tabung reaksi) ke tabung reaksi yang lain (Rakhmawati, 2013).



Gambar 1. Teknik Aseptis (MicrobeHolic, 2020)

### b. Metode Isolasi dan Inokulasi

Teknik isolasi mikroorganisme adalah suatu usaha untuk menumbuhkan mikroba di luar dari lingkungan alaminya. Pemisahan mikroorganisme dari lingkungannya ini bertujuan untuk memperoleh biakan bakteri yang sudah tidak bercampur lagi dengan bakteri lainnya dan ini disebut dengan biakan murni. Mikroorganisme dapat diperoleh dari lingkungan air, tanah, udara, substrat yang berupa bahan pangan, tanaman dan hewan. Jenis mikroorganismenya dapat berupa bakteri, khamir, kapang dan lain-lain. Populasi mikroba di lingkungan sangat beranekaragam sehingga dalam mengisolasi diperlukan beberapa tahap penanaman sehingga berhasil diperoleh koloni tunggal (Rasyid, 2012). Beberapa cara atau metode untuk memperoleh biakan murni dari suatu biakan campuran. Dua diantaranya yang paling sering digunakan adalah metode cawan gores dan metode cawan tuang. Yang didasarkan pada prinsip pengenceran dengan maksud untuk memperoleh spesies individu. Dengan anggapan

bahwa setiap koloni dapat terpisah dari satu jenis sel yang dapat diamati (Sabbathini., et al, 2017).

1) Metode Gores

*Streak plate technique* yaitu metode isolasi kualitatif dengan menggoreskan mikroorganisme yang tumbuh diatas permukaan media padat dengan menggunakan jarum inokulasi. Metode steak merupakan cara untuk mengisolasi bakteri dengan cara menggores permukaan medium dengan menggunakan jarum ose. Penggoresan bertujuan untuk membuat garis sebanyak mungkin pada permukaan medium agar bakteri tumbuh pada garis-garis terakhir berupa koloni yang terpisah-pisah (Irianto, 2012)

2) Metode Tabur

*Pour plate technique* yaitu teknik isolasi dengan cara membuat pengenceran secara berturut turut menggunakan jarum inokulasi dan pipet. Kemudian enceran tersebut dicampurkan dengan agarosa sampai memadat. Metode pour plate merupakan metode untuk memperoleh biakan murni dari populasi campuran mikroorganisme dengan cara mengencerkan specimen yang kemudian dituangkan kedalam cawan steril dan diikuti dengan menuangkan medium agar yang telah dicairkan dan didinginkan (pada suhu 50°C). Tujuan dan metode ini adalah untuk menentukan perkiraan jumlah bakteri hidup dalam cairan atau spesimen. Hasil perhitungan bakteri dinyatakan dalam koloni (Irianto, 2012)

3) Metode Sebar

*Spread plate technique* yaitu teknik isolasi dengan cara meratakan enceran campuran mikroorganisme diatas medium padat secara steril. Isolasi dengan penyebaran serupa dengan isolasi bakteri pada penuangan. Hal yang membedakan adalah pada

saat penuangan suspensi sampel kedalam medium Isolasi diawali dengan pengenceran sampel pada setiap penuangan. Medium yang telah dipersiapkan dituangkan kedalam cawan petri steril. Tunggu hingga medium memadat, setelah itu tuangkan suspense sampel kedalam cawan petri yang telah berisi medium yang memadat. Penyebaran suspensi sampel dilakukan dengan menyebarkan suspense dengan batang Drugalsky yang telah dipanaskan terlebih dahulu (Irianto, 2012).

## 2. Media Pertumbuhan Mikroba

Media kultur mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang digunakan oleh suatu mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi pada media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel nya. Mikroorganisme yang berbeda membutuhkan material nutrisi yang berbeda pula. Oleh karena itu, media kultur bervariasi dalam bentuk dan komposisi, tergantung pada jenis spesies yang dikembangbiakkan. Dari media kultur tersebut, maka dapat diidentifikasi mikroorganisme (Atmanto., *et al*, 2022).

Media merupakan faktor terpenting dalam pelaksanaan kultur jaringan. Media yang digunakan biasanya mengandung bahan-bahan pendukung seperti agar, hormon, garam mineral, vitamin, gula dan zat-zat yang diperlukan tanaman untuk tumbuh dan berkembang (zat pengatur tumbuh) (Basri, 2016). Media yang digunakan biasanya terdiri dari garam mineral, vitamin, dan hormone serta bahan tambahan seperti agar, gula, dan lain-lain. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan bervariasi, baik jenisnya maupun jumlahnya, tergantung dengan tujuan dari kultur jaringan yang dilakukan. Media yang sudah jadi ditempatkan pada tabung reaksi atau botol-botol kaca. Media yang digunakan juga harus disterilkan dengan cara memanaskannya dengan autoklaf (Ziraluo, 2021).

Berikut syarat media kultur (Varghese., *et al*, 2014):

- a. Mengandung sumber energi.

Untuk keperluan pertumbuhan bakteri pada media diperlukan energi, yang diperoleh dari oksidasi senyawa organik yang terkandung dalam media tersebut seperti karbohidrat dan protein.

- b. Mengandung sumber karbon (C).

Sumber C bisa diperoleh dari senyawa organik protein dan karbohidrat. Protein diperoleh misalnya dari ekstrak daging atau pepton, sedangkan karbohidrat misalnya glukosa, laktosa, dan sukrosa.

- c. Mengandung sumber nitrogen (N)

Sumber N untuk kebutuhan nutrisi ada 2 yaitu : N berasal dari nitrogen anorganik dan N dari nitrogen organik. Kebutuhan N dari nitrogen anorganik biasanya dipakai ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) atau ammonium sulfat ( $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ ), sedangkan N dari nitrogen organik diperoleh dari protein/ pepton atau asam-asam amino.

- d. Mengandung Garam.

- e. Memiliki pH yang sesuai. Derajat keasaman/ pH umumnya netral, tetapi ada juga yang alkali.

- f. Memiliki oksidasi yang cukup.

- g. Memiliki temperatur sesuai.

- h. Memiliki tekanan osmose sesuai (harus isotonik)

- i. Mengandung faktor pertumbuhan.

### **3. Proses dan Peralatan Kultur Skala Industri**

- a. Fermentasi

Fermentasi adalah proses oksidasi yang meliputi perombakan media organik pada mikroorganisme anaerob atau fakultatif anaerob dengan menggunakan senyawa organik sebagai aseptor elektron terakhir. Fermentasi karbohidrat oleh khamir merupakan proses penghasil etanol dan karbondioksida secara anaerob (Moede., *et al*. 2017). Fermentasi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu spontan dan tidak spontan.

Fermentasi spontan adalah yang tidak ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi dalam proses pembuatannya, sedangkan fermentasi tidak spontan adalah yang ditambahkan starter atau ragi dalam proses pembuatannya. Mikroorganisme tumbuh dan berkembang secara aktif merubah bahan yang diperlakukan menjadi produk yang diinginkan pada proses fermentasi (Nurhalimah., et al. 2015).

Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Dimana bahan baku energi yang paling banyak digunakan oleh mikroorganisme adalah glukosa. Pertumbuhan yang terjadi tanpa adanya oksigen sering dikenal sebagai fermentasi (Hidayanto, 2017). Proses fermentasi sederhana merupakan proses fermentasi yang berlangsung tanpa menggunakan oksigen atau dikenal fermentasi secara anaerob. Proses fermentasi anaerob memiliki keuntungan dibandingkan dengan fermentasi aerob (Wirajaya, 2016). Pada suatu proses fermentasi tentu saja memiliki faktor yang memengaruhi agar proses fermentasi tersebut berhasil. Faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah suhu, pH awal fermentasi, inokulum, substrat dan kandungan nutrisi medium. Banyak faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain substrat, suhu, pH, oksigen, dan mikroba yang digunakan. Perbedaan pada setiap faktor pada fermentasi yang berbeda membuat perbedaan hasil akhir pada fermentasi (Azizah., et al. 2012).

b. Fermentor

Fermentor merupakan alat yang digunakan dalam proses fermentasi yang memiliki fungsi dasar untuk menyediakan lingkungan dengan kondisi yang dapat dikontrol untuk pertumbuhan mikroorganisme. Untuk konstruksi fermentor, ukuran kecuali (skala

laboratorium), maka untuk ukuran 1-30 L dapat digunakan kaca atau stainless steel (Hidayanto, 2017). Fermentor adalah kapal yang mempertahankan lingkungan optimal untuk pengembangan mikroorganisme signifikan yang digunakan dalam proses fermentasi skala besar dan produksi komersial produk seperti minuman beralkohol, enzim, antibiotik, asam organik dll. Dimana fermentor ini juga dikenal sebagai bioreactor (Gaikwad, 2018).

Terdapat beberapa macam bioreaktor yaitu *fermentor batch*, fermentor sinambung dan fermentor semi sinambung (*Fed Batch*). Fermentor batch adalah fermentor yang sederhana, dimana pada saat proses berlangsung tidak ada bahan yang masuk maupun yang keluar dari fermentor. Fermentasi batch adalah teknik kultur tertutup di mana sejumlah kecil nutrisi diinokulasi dengan berbagai organisme untuk membiarkan fermentasi. Fermentasi batch adalah proses tradisional, selama proses fermentasi tidak ada bahan yang ditambahkan setelah inokulasi, kecuali basa atau asam dalam mengendalikan pH. Dalam proses fermentasi ini, efek organisme pada konsentrasi substrat menjadi yang paling utama dan konsentrasi produk yang tinggi paling terakhir (Riyadi, 2012).

#### 4. Aplikasi Kultur Mikroba

##### a. Produksi Antibiotik dan Vaksin

Antibiotik didefinisikan sebagai zat penghambat pertumbuhan bakteri yang dapat dihasilkan oleh mikroba (bakteri, jamur). Cara kerja antibiotik ini bisa membunuh bakteri (bakterisidal) atau menghambat pertumbuhan bakteri (bakterostatik). Cara kerja antibiotik bakterisidal adalah dengan merusak dinding sel bakteri, sedangkan antibiotik bakterostatik bekerja dengan cara menghambat pembentukan protein pada sel bakteri, juga mengganggu transkripsi dan replikasi DNA dan menghambat sintesis RNA pada bakteri.

Proses produksi antibiotik didahului dengan proses isolasi mikroba atau bahan alam lain yang dapat menghasilkan antibiotik, proses fermentasi hingga produk dipasarkan (Saraswati, 2020). Antibiotik merupakan zat kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang mempunyai kemampuan dalam larutan encer untuk menhambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme, contohnya penisilin, sefalosporin, kloramfenikol, tetrasiklin, dan lainlain. Antibiotik yang relatif non toksis bagi pejamunya digunakan sebagai agen kemoterapeutik dalam pengobatan penyakit infeksi pada manusia, hewan dan tanaman. Istilah ini sebelumnya digunakan terbatas pada zat yang dihasilkan oleh mikroorganisme, tetapi penggunaan istilah ini meluas meliputi senyawa sintetik dan semisintetik dengan aktivitas kimia yang mirip, contohnya sulfonamida, kuinolon dan fluorikuinolon (Dorland, 2010).

Vaksin adalah produk biologis yang mengandung antigen, berupa mikroorganisme yang telah dilemahkan atau dimatikan, atau komponen-komponennya, yang bila diberikan kepada individu sehat dapat memicu sistem imun untuk membentuk kekebalan spesifik terhadap penyakit tertentu. Tujuan utama pemberian vaksin adalah untuk merangsang produksi antibodi, sehingga tubuh mampu mengenali dan melawan patogen penyebab penyakit di masa mendatang (Syarifudin et al., 2022).

b. Produk Fermentasi

Mikroba merupakan unsur terpenting dalam industri fermentasi, yang berperan sebagai agen pengolah atau agen biotransformasi. Mikroba ialah salah satu organisme yang memiliki jumlah yang melimpah dan memiliki ukuran renik (Badaring, 2020). Mikroorganisme dalam pangan memiliki peranan penting, terutama pada proses pengolahan bahan

mentah menjadi produk setengah jadi dan produk jadi dikarenakan enzim yang terdapat dalam mikroorganisme tersebut. Banyak manfaat yang bisa kita peroleh dari pemanfaatan mikroorganisme ini, diantaranya sebagai starter produk pangan hingga fungsinya yang mampu menghambat kerusakan dan pembusukan bahan pangan. Namun, selain manfaat tersebut, mikroorganisme juga memiliki andil dalam terjadinya kerusakan dan proses pembusukan bahan pangan. Beberapa proses pengolahan yang kurang tepat malah dapat menimbulkan tumbuhnya mikroorganisme patogen. Mikroorganisme ini selanjutnya menyebabkan terjadinya cemaran mikroba dalam pangan (Yuniastri et al., 2018).

Salah satu produk olahan adalah produk fermentasi yaitu produk yang dihasilkan setelah melalui proses pertumbuhan mikroorganisme. Cara-cara fermentasi di Indonesia sangat beragam, mulai dari yang sederhana hingga penggunaan peralatan modern, dari yang dibuat secara alami hingga yang terkendali, dari yang aerob hingga anaerob dan sbagainya (Hidayat et al. 2020). Makanan fermentasi, adalah makanan yang diproses melalui bantuan mikroorganisme atau komponen biologis lain seperti enzim, sehingga memberikan produk sedemikian rupa yang menguntungkan bagi manusia dari sudut pandang kesehatan. Makanan fermentasi termasuk makanan tradisional, karena prosesnya merupakan warisan turun temurun hasil temuan nenek moyang. Di Indonesia, ada beberapa makanan fermentasi yang bertarap nasional maupun menuju sosialisasi ke taraf nasional bahkan internasional, seperti tempe, tapai, teh hijau, sayur asin, bekasam dan lain-lain (Masadarini. 2011).

c. Produksi Enzim

Enzim merupakan senyawa protein yang dibutuhkan makhluk hidup dimana enzim ini berfungsi sebagai biokatalisator pada reaksi-reaksi kimia secara biologis dalam tubuh. Enzim berperan untuk mempercepat reaksi kimia yang terjadi di dalam tubuh makhluk hidup, tetapi enzim itu sendiri tidak ikut bereaksi. Oleh sebab itu, enzim disebut sebagai salah satu katalisator alami (Astika, et al., 2020). Enzim merupakan biokatalisator yang sangat efektif meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik secara nyata, reaksi ini tanpa enzim akan berlangsung lambat. Sifat-sifat istimewa enzim adalah kapasitas katalitik dan spesifisitasnya yang sangat tinggi (Kasipah, et al., 2013).

Enzim merupakan biokatalisator dalam semua sistem kehidupan. Enzim berperan penting dalam semua reaksi biokimia yang berlangsung di dalam sel mikroorganisme, tanaman, hewan dan manusia. Sebagai biokatalisator, enzim mempercepat reaksi biokimia tanpa mengalami perubahan yang permanen. Enzim mengkatalisis semua reaksi yang berlangsung dalam sel makhluk hidup secara cepat, efisien, dan spesifik (Sutrisno, 2017). Enzim-enzim di dalam sel tidak tersebar secara merata, namun mengelompok di berbagai organel sel. Bergantung pada jenis dan fungsinya, enzim dapat berada pada dinding atau membran sel, sitoplasma, membran mitokondria, inti sel, retikulum endoplasma, dan lisosom. Enzim mengubah molekul substrat menjadi hasil reaksi (produk) yang molekulnya berbeda dengan substrat (Susanti dan Fibriana, 2017).

d. Pengolahan Limbah dan Bioremediasi

Pengolahan limbah dan bioremediasi menggunakan mikroorganisme adalah metode yang memanfaatkan kemampuan alami mikroba untuk

mendegradasi atau menetralkan polutan, sehingga mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan. Pengolahan limbah biologis menggunakan mikroorganisme untuk menguraikan bahan organik dalam limbah, sehingga mengurangi kandungan polutan. Metode ini sering diterapkan dalam pengolahan limbah cair industri dan domestik. Secara alami permurnian limbah dengan bantuan mikroba dapat berjalan walaupun tanpa adanya perlakuan secara khusus. Hal ini disebabkan di alam dan di dalam limbah itu sendiri telah mengandung mikroba pengurai yang baik. Tetapi pada lingkungan itu sendiri, proses penguraian seringkali terhambat oleh karena depresi oksigen. Hal ini disebabkan oleh debit limbah yang *over capacity* sehingga kemampuan *self purification* yang dimiliki lingkungan mencapai batasnya (Suardana et al., 2023).

Bioremediasi adalah proses penggunaan mikroorganisme untuk menghilangkan atau menetralkan polutan dari lingkungan yang tercemar, seperti tanah atau air. Mikroba dapat mendegradasi atau mengubah limbah beracun menjadi bentuk yang tidak berbahaya. Alih-alih hanya mengumpulkan polutan dan menyimpannya, bioremediasi merupakan aktivitas prosedural yang terorganisir dengan baik secara mikrobiologis yang diterapkan untuk memecah atau mengubah kontaminasi menjadi bentuk unsur dan senyawa yang kurang beracun atau tidak beracun (Quintella, Mata and Lima, 2019). Mikroorganisme bertindak sebagai alat penghilang polutan yang signifikan di tanah, air, dan sedimen; sebagian besar karena keunggulan mereka dibandingkan protokol prosedural remediasi lainnya. Mikroorganisme memulihkan lingkungan alami asli dan mencegah pencemaran lebih lanjut. Tujuan dari tinjauan untuk mengungkapkan tren saat ini berupa aplikasi atau

peran mikroorganisme pada bioremediasi dan untuk memberikan kontribusi latar belakang yang relevan yang mengidentifikasi celah dalam bidang tematik ini. Saat ini merupakan penelitian yang lagi membuming karena mikroorganisme merupakan salah satu treatment yang ramah lingkungan dan menjanjikan serta materi genetik yang berharga untuk mengatasi ancaman lingkungan (Evitasari et al., 2020).

## DAFTAR PUSTAKA

- Astika, E., Anggraeni, S., Supriatno, B. (2020). Analisis Komponen Penyusun Desain Kegiatan Laboratorium Enzim Katalase. *Biodik*, 6(3), 343–356.
- Atmanto, Y, K, A, A., Asri, L, A., Kadir, N, A. (2022). Media Pertumbuhan Kuman. *Jurnal Medika Hutama*, 4(1): 3069-3075.
- Azizah, N., et al. 2012. Pengaruh Lama Fermentas Terhadap Kadar Alkohol, Ph, dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol dari Whey dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 1(2):72-77.
- Badaring, D., R.Fiqriansyah, M. W., Bahri, A. (2020). Identifikasi Morfologi Mikroba Pada Ruangan Water Closet Jurusan Biologi Univeritas Negeri Makassar. *Seminar Nasional Biologi FMIPA UNM*, 161–168.
- Basri Arie Hapsani Hasan. (2016). Kajian Pemanfaatan Kultur Jaringan Dalam Perbanyak Tanaman Bebas Virus. *Agrica Ekstensia*, 10(1); 64-73.
- Dorland WA., Newman. (2010). *Kamus Kedokteran Dorland edisi 31*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. p. 702, 1003.
- Erwin., et al. (2023). Dasar-Dasar Mikrobiologi. Makassar: PT Masagena Mandiri Medica.
- Evitasari., Sukoni, G, A, B., Hikmawan, F. R., Satriawan, D. Karakter Organisme Biologis dalam Bioremediasi – review. *Jurnal Pengendalian Pencemaran Lingkungan*, 2(2): 33-39.
- Gaikwad, V., Panghal, A., Jadhav, S., Sharma, P., Bagal, A., Jadhav, A., & Chhikara, N. (2018). Designing of Fermenter and its utilization in food industries. *Preprints*, August, 1–24.
- Hafsan. (2014). *Mikrobiologi Analitik*. Alauddin University Press. ISBN : 978-602-237-889-1.
- Hidayanto Ariyo Prabowo. (2017). *Modul Mata Kuliah Teknologi Fermentasi*. Universitas Esa Unggul, Jakarta.
- Irianto, K. 2012. *Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganisme Jilid I*. Bandung: Yrama Widya.

- Kasipah C., Rismayani S., Ihsanawati., Nurrachman Z. (2013). Isolation And Characterization Of Bacteriaproducer Extracellular Lipase Enzime From An Activated Sludge Waste Water Treatmentplan Of Textile Industry. *Journal Textile Arena Scientific*, 28(1): 1 – 46.
- Masadarini Luh. (2011). Manfaat Dan Keamanan Makanan Fermentasi Untuk Kesehatan (Tinjauan Dari Aspek Ilmu Pangan). *JPTK, UNDIKSHA*, 8(1): 53 – 58.
- Moede., Fika Herlina., et al. 2017. The Influence of A Long Time Fermentation Against bioethanol levels of Starch Sweet Potato is Yellow (*Ipomea batatas L.*). *J. Akad. Kim*, 6(2): 86-91.
- Nurhalimah., Neneng., Sulistiyanto. 2015. Kandungan Bakteri Asam Laktat dan Bakteri Selulolitik pada Pollard yang difermentasi. *Undergraduate thesis*, Fakultas Peternakan Dan Pertanian Undip.
- Quintella, C. M., Mata, A. M. T. and Lima, L. C. P. (2019). Overview Of Bioremediation With Technology Assessment And Emphasis On Fungal Bioremediation Of Oil Contaminated Soils. *Journal of Environmental Management*, 241(April), pp. 156–166.
- Rakhmawati, A. (2013). *Praktik Layanan Kegiatan Praktikum Biologi*. Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY.
- Rasyidah., & Fariani, R. (2021). Perbandingan Penyimpanan Menggunakan Medium yang Berbeda Terhadap Viabilitas Kapang *Colletotrichum capsici* dan *Prycularia oryzae*. *Jurnal Pengelolaan laboratorium Pendidikan*, 3(2).
- Riyadi, A., Subekti, A. P., Hadi, F. R., & Widhiastuti, F. (2012). Pembuatan Fermentor Skala Laboratorium Untuk Fermentasi Bioetanol Secara Kontinyu Dengan Biokatalis Yeast Yang Ter-Imobilisasi Dalam Kalsium Alginat. Laporan Tugas Akhir.
- Sabbathini G, C., Pujiyanto S., Wijanarka., Lisdiyanti P. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Genus Sphingomonas Dari Daun Padi (*Oryza Sativa*) Di Area Persawahan Cibinong. *Jurnal Biologi*, 6(1), 59-64.

- Saraswati, H. (2020). *Industri Antibiotik*. Modul Bioindustri, Universitas Esa Unggul.
- Suardana, A, A, K., Wahyudi, I, W., Ryanita, P, K, Y. (2023). Pengolahan Limbah Cair Domestik dan Perhotelan Dengan Memanfaatkan *Effective Microorganism (EM)*. *Widya Biologi*, 13(2): 125-136.
- Susanti, R. dan Fibriana, Fidia. (2017). *Teknologi Enzim*. Yogyakarta: CV Andi Offset.
- Sutrisno, Aji. (2017). *Teknologi Enzim*. Malang: UB Press.
- Syarifudin, A., Widayastuti, H., Sari, R, P., Latifah, N, A. (2022). Sosialisasi dan Edukasi tentang Vaksinasi Covid-19 pada Masyarakat Desa Serdang Kecamatan Tanjung Bintang Kabupaten Lampung Selatan. *Jurnal Pengabdian Masyarakat*, 4(1): 1-10.
- Varghese., Navena., Joy, P, P. *Microbiology Laboratory Manual*. Kerala: Kerala Agricultural University; 2014.
- Yuniastri, R., Ismawati., Putri, R, D., (2018). Mikroorganisme Dalam Pangan. *CEMARA*, 15(2); 15-20.
- Ziraluo Yan Piter B. (2021). Metode Perbanyak Tanaman Ubi Jalar Ungu (*Ipomea Batatas Poiret*) Dengan Teknik Kultur Jaringan Atau Stek Planlet. *JIP*, 2(3); 1037-1046.

## BIODATA PENULIS



**Suwarja, S.Pd, M.Kes** lahir di Cijeruk , pada 19 April 1963. Menyelesaikan pendidikan Diploma 1 di Sekolah Pembantu Penilik Hygiene (SPPH) Manado, Diploma 3 di Akademi Kesehatan Lingkungan (AKL) Surabaya, S1 di Institut Keguruan dan Ilmu Pendidikan (IKIP) Manado Fakultas Pendidikan dan S2 di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Fakultas Kesehatan Masyarakat Program Studi Ilmu Kesehatan Kerja, peminatan Kesehatan Lingkungan. Sampai saat ini penulis sebagai dosen tetap di Jurusan Kesehatan Lingkungan Poltekkes Kemenkes Manado.

# BAB 5

## Konsep Dasar Rekayasa Genetika

\*apt. Asiska Permata Dewi, M.Farm.\*

### A. Pendahuluan

Rekayasa genetika adalah sebuah istilah yang diperkenalkan pertama kali pada tahun 1970-an untuk menggambarkan bidang teknologi DNA rekombinan. Beberapa istilah yang sering digunakan dalam teknologi rekayasa genetika adalah modifikasi gen, kloning gen, dan teknologi DNA rekombinan. Lahirnya bidang ilmu rekayasa genetika didorong oleh kebutuhan untuk menemukan metode yang dapat meningkatkan kemutakhiran sebuah eksperimen di bidang biologi molekuler dan bioteknologi (Sutrisno, 2023; Wasilah *et al.*, 2019)).

Rekayasa genetika merupakan teknik untuk menghasilkan molekul DNA yang berisi gen baru yang diinginkan atau kombinasi gen-gen baru atau dapat dikatakan sebagai manipulasi organisme oleh suatu makhluk hidup dikendalikan oleh gen-gen yang berada di dalam inti sel (nukleus). Teknologi rekayasa genetika telah dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti analisis forensik sampel di tempat kejadian perkara, penentuan orang tua biologis anak, diagnosa medis, pemetaan serta urutan genom, dan digunakan secara luas dalam industri bioteknologi (Fahmideh *et al.*, 2014).

### B. Konsep Rekayasa Genetika

Rekayasa genetika atau teknologi DNA rekombinan adalah teknologi manipulasi, modifikasi, dan rekombinasi DNA atau molekul asam nukleat lainnya untuk memodifikasi suatu organisme atau populasi organisme. Rekayasa genetika

telah membantu para peneliti dalam pengembangan penelitian dasar di bidang biokimia, biologi molekuler dan genetika. Rekayasa genetika telah menunjukkan manfaat dalam membawa kemajuan dalam kehidupan manusia. Teknologi ini memiliki penerapan multidisiplin dan telah menghasilkan produk-produk yang penting kehidupan manusia di bidang kesehatan, pertanian dan lingkungan (Muladno, 2002),

### **1. Prinsip Dasar Rekayasa Genetika**

Prinsip dasar rekayasa genetika pada dasarnya cukup sederhana, yaitu informasi genetika yang dikodekan oleh DNA dan tersusun dalam bentuk gen. DNA dapat dimodifikasi dengan berbagai cara untuk mencapai tujuan tertentu baik dalam bidang ilmu pengetahuan murni maupun ilmu terapan. Dengan berkembangnya teknologi molekuler, maka berkembang pula teknik-teknik untuk memanipulasi gen sehingga muncul teknik rekayasa genetika. Gen atau yang sering dikenal dengan istilah DNA, merupakan materi genetik yang bertanggung jawab terhadap semua sifat yang dimiliki oleh makhluk hidup (Sutarno, 2015). Genetika merupakan ilmu yang mempelajari bagaimana sifat-sifat suatu makhluk hidup ini diturunkan dari induk kepada keturunannya.

Ilmu rekayasa genetika dipelajari dalam Genetika Mendel (*Mendelian Genetics*). Prinsip dasar dari pola penurunan Mendel ini adalah bahwa suatu sifat yang diturunkan kepada keturunannya separoh (50%) berasal dari induk jantan dan separoh (50%) berasal dari induk betina. Namun demikian, adapula sifat-sifat makhluk hidup yang dikendalikan oleh DNA yang berada di luar inti (mitokondria, kloroplast), yang pola penurunannya tidak mengikuti pola Mendel, sehingga sering disebut sebagai Genetika non-Mendel (*Non-Mendelian Genetics*) (Sutarno, 2015). Pada genetika non-Mendel, sifat yang dimiliki keturunan secara keseluruhan (100%) berasal dari induk betina, sehingga pola penurunannya sering disebut dengan *maternally inherited*.

## **2. Langkah-langkah Dalam Rekayasa Genetika**

Berikut ini langkah-langkah yang dilakukan dalam rekayasa genetika meliputi:

a. Isolasi

Langkah pertama dalam manipulasi rekayasa genetika adalah menemukan satu gen dari antara ribuan gen yang menyusun genom. Untuk menyiapkan gen, DNA organisme dipotong menggunakan enzim restriksi terpilih yang mengenali urutan basa tertentu, lalu memotong untaian diantara basa tertentu. Serangkaian enzim restriksi yang berbeda dapat digunakan untuk memotong DNA hingga panjangnya berkurang menjadi sekitar satu hingga beberapa gen. Segmen yang lebih kecil ini disortir menggunakan proses yang disebut elektroforesis, lalu dikloning untuk menghasilkan sejumlah materi genetik yang cukup untuk analisis lebih lanjut.

Setiap segmen DNA ini, gen dapat dicari satu per satu untuk menemukan gen yang diinginkan. Alat yang digunakan untuk menentukan gen disebut probe. Probe adalah panjang DNA atau RNA, biasanya berisi tag radioaktif, yang memiliki urutan yang saling melengkapi dengan gen yang diinginkan. Tag radioaktif membuat probe mudah diidentifikasi setelah dipasangkan dengan basa nukleotida gen. Probe dapat dibuat ketika urutan protein diketahui – protein yang merupakan produk akhir dari gen tertentu. Bekerja mundur melalui langkah-langkah ekspresi gen, peneliti dapat menentukan urutan basa nukleotida gen dan kemudian mensintesis probe (Azadi, 2010).

b. Kloning

Setelah diisolasi, gen tersebut dikloning, atau diduplikasi, dan dimasukkan ke dalam sel inangnya yang baru. Hingga saat ini, metode yang paling sering digunakan untuk melakukan keduanya adalah penyisipan gen ke dalam plasmid bakteri. Plasmid

adalah lingkaran kecil DNA yang terpisah dari pelengkap kromosom utama suatu organisme. Plasmid membawa urutan replikasi DNA-nya sendiri dan biasanya mempertahankan dirinya dalam beberapa salinan di dalam sel.

Untuk mengkloning gen, plasmid berbentuk cincin dipotong dengan rapi menggunakan enzim restriksi. Enzim restriksi juga digunakan untuk menyiapkan potongan DNA yang mengandung gen yang diisolasi. Ketika plasmid yang dipotong dan gen yang diisolasi dicampur bersama dengan adanya DNA ligase – enzim yang menyambung kembali ujung-ujung molekul DNA yang dipotong – fragmen gen yang diisolasi tersebut dimasukkan ke dalam cincin plasmid. Sekarang, saat plasmid yang diperbaiki bereplikasi, gen yang dikloning juga direplikasi. Dengan cara ini, sejumlah besar gen yang dikloning dapat diproduksi di dalam sel inang bakteri (Azadi, 2010).

Gen yang dikloning memiliki empat kegunaan utama:

- 1) Sebagai alat penelitian untuk mempelajari struktur dan fungsi gen.
- 2) Dalam pembuatan produk protein yang dikodekan oleh gen.
- 3) Dalam produksi salinan gen untuk transfer sifat spesifik ke organisme baru.
- 4) Sebagai uji diagnostik untuk mendeteksi penyakit vital tertentu dalam pengobatan.

c. Transfer

Plasmid bukan satu-satunya vektor atau wahana yang digunakan untuk mengangkut gen ke organisme baru. Virus yang memiliki kemampuan transfer gen alami atau elemen transposabel (urutan DNA yang memiliki kemampuan untuk berpindah dari satu tempat ke tempat lain dalam genom dan memengaruhi ekspresi gen tetangga) juga dapat membawa gen hasil

rekayasa genetika ke inangnya. Selain itu, sistem vektor dapat didasarkan pada cara lain untuk memindahkan gen seperti mikroinjeksi DNA ke dalam inti sel atau penyerapan langsung DNA oleh sel dari media kulturnya (Azadi, 2010).

d. Ekspresi gen

Salah satu ketidakpastian utama dalam transfer gen adalah apakah gen asing akan ditranskripsi menjadi RNA dan RNA diterjemahkan menjadi produk protein di lingkungan barunya. Sasaran dari manipulasi ini, isolasi gen, kloning, dan transfer, adalah ekspresi gen. Agar berhasil, tingkat dan waktu ekspresi yang tepat harus dicapai selama masa hidup organisme penerima. Artinya, fungsi proses genetik yang mengatur periode saat gen mati (saat tidak ada protein yang diproduksi) dan saat aktif (saat protein diproduksi) sangat penting. Analisis *in vitro* dapat menghasilkan banyak informasi dasar tentang faktor-faktor yang berkontribusi terhadap keberhasilan manipulasi genetika, namun studi *in vivo* pada akhirnya harus dilakukan pada tanaman dan hewan serta pada mikroorganisme.

### 3. Teknik Dalam Rekayasa Genetika

Beberapa teknik yang dapat digunakan dalam rekayasa genetika adalah:

a. Fusi genetik

Proses fusi genetik adalah suatu proses memungkinkannya terjadi pemindahan gen (transposisi) dari satu lokasi dalam kromosom ke lokasi lain. Contoh : Rekayasa bakteri *Pseudomonas syringae* yang menyebabkan tanaman tomat dan kentang tahan terhadap suhu beku di bawah -5°C.

b. Fusi Protoplasma

Proses fusi protoplasma adalah proses penyatuan dua protoplasma (penggabungan dua sel) dan diikuti penggabungan materi genetiknya. Penggabungan protoplasma dua jenis sel yang berbeda akan

menghasilkan individu baru yang memiliki sifat gabungan kedua sel induk. Contoh: Fusi protoplasma pada bakteri *Nocardia lactamurans* yang menghasilkan antibiotik cephalomycin.

c. Amplifikasi gen

Amplifikasi gen yaitu proses dimana plasmid atau bakteriofag (virus penyerang bakteri) yang diinduksikan ke dalam sel dan kemudian berkembang dengan cepat. Amplifikasi gen sering dilakukan pada sel-sel yang berfungsi untuk menghasilkan suatu senyawa seperti enzim, asam amino, vitamin, dan antibiotik.

d. Rekombinasi gen

Rekombinasi gen dilakukan dengan memotong DNA dan kemudian disambung dengan DNA baru yang membawa sifat unggul. Teknologi DNA rekombinan merupakan teknik penggabungan DNA dari spesies yang berbeda sehingga akan diperoleh organisme baru dengan sifat-sifat yang diinginkan. Adapun tahapan dalam menghasilkan DNA rekombinan adalah:

- 1) Pencarian DNA unggul
- 2) Menyiapkan vektor (wahana/perantara), untuk memasukan DNA unggul ke dalam makhluk hidup yang akan diubah sifatnya. Vektor biasanya berupa virus atau plasmid dari bakteri. Plasmid adalah DNA yang bentuknya melingkar, terdapat di luar DNA inti bakteri. DNA plasmid ini mampu keluar masuk sel dan dapat bergabung dengan kromosom sel organisme lain.
- 3) Memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel.
- 4) Kloning (Perbanyak) DNA rekombinan

e. Hibridoma

Hibridoma yaitu fusi sel pada organisme tingkat tinggi yang bertujuan untuk mendapatkan gabungan sifat kedua sel induk. Contoh: Fusi sel tomat dan kentang menghasilkan tanaman baru Pomato (PotatoTomato) yang berbuah tomat dan berumbi kentang (Retroningrum *et al.*, 2005).

#### **4. Mutagenesis dalam Rekayasa Genetika**

Secara umum prosedur rekayasa genetika meliputi isolasi gen, modifikasi gen sehingga fungsi biologisnya lebih baik, mentransfer gen tersebut ke organisme baru, dan membentuk produk organisme transgenik. Pembentukan organisme transgenik terdiri atas dua cara yaitu:

a. Proses introduksi gen

Proses ini meliputi beberapa langkah dasar yaitu:

- 1) Membentuk sekuen gen yang diinginkan yang ditandai dengan penanda yang spesifik.
- 2) Mentransformasi sekuen gen yang sudah ditandai ke jaringan.
- 3) Mengkultur jaringan yang sudah mengandung gen yang ditransformasikan.
- 4) Uji coba kultur tersebut di lapangan.

b. Mutagenesis

Mutagenesis adalah proses memodifikasi gen pada organisme dengan mengganti sekuen basa nitrogen pada DNA yang ada untuk diganti dengan basa nitrogen lain sehingga terjadi perubahan sulfat pada organisme tersebut. Contoh, tanaman yang semula memiliki sifat tidak tahan hama menjadi tanaman tahan hama (Mahrus, 2014).

#### **5. Penerapan Teknologi Rekayasa Genetika**

Rekayasa genetika dapat diterapkan dalam berbagai bidang, antara lain:

a. Dalam Bidang Peternakan

1) Transplantasi Nukleus (Kloning)

Teknologi ini lebih dikenal dengan teknologi kloning yaitu teknologi yang digunakan untuk menghasilkan individu duplikasi (mirip dengan induknya). Teknologi kloning telah berhasil dilakukan pada beberapa jenis hewan. Salah satunya adalah pengkloningan domba yang dikenal dengan domba Dolly. Melalui kloning hewan, beberapa organ manusia untuk keperluan transplantasi

penyembuhan suatu penyakit berhasil dibentuk (Sutarno, 2016).

2) Inseminasi Buatan

Teknik ini dikenal dengan nama kawin suntik, suatu teknik untuk memasukkan sperma yang telah dicairkan dan diproses terlebih dahulu yang berasal dari ternak jantan ke dalam saluran alat kelamin betina dengan menggunakan metode dan alat khusus (Sutarno, 2016)

3) Transfer Embrio

Apabila kawin suntik memfokuskan pada sperma jantan, maka transfer embrio tidak hanya potensi dari jantan saja yang dioptimalkan, melainkan potensi betina berkualitas unggul juga dapat dimanfaatkan secara optimal. Teknik TE ini, betina unggul tidak perlu bunting tetapi hanya berfungsi menghasilkan embrio yang untuk selanjutnya bisa ditransfer pada induk titipan dengan kualitas yang tidak perlu bagus tetapi memiliki kemampuan untuk bunting. Embrio yang didapat dapat langsung di transfer ke dalam sapi resipien atau dibekukan untuk disimpan dan di transfer pada waktu lain (Kwon *et al.*, 2024).

4) *Genetic engineering* (Rekayasa Genetik)

Rekayasa genetik atau rekombinan DNA merupakan kumpulan teknik-teknik eksperimental yang memungkinkan peneliti untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan melipatgandakan suatu fragmen dari materi genetika (DNA) dalam bentuk murninya.

5) Hewan Transgenik

Transfer materi genetik dengan teknologi rekombinan DNA merupakan suatu metode penemuan baru ternak transgenik. Ternak transgenik dihasilkan dengan injeksi mikro gen ke dalam pronukleus sesaat setelah fertilisasi dan sebelum terjadi pembelahan pertama zigot, selanjutnya

ditanam di dalam rahim induk pengganti. Transfer gen (transgenik) artinya penyatuhan stabil dari suatu gen dari spesies lain atau bangsa ternak lain dalam satu spesies, sehingga gen itu berfungsi pada ternak penerima dan diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya sehingga keturunannya telah ditingkatkan melalui penambahan atau penggantian DNA dari sumber lain melalui rekombinan DNA.

- 6) Pemanfaatan Hormon bST (bovine somatotrophine hormone). Dengan rekayasa genetik dihasilkan hormon pertumbuhan hewan yaitu bST, melalui teknik:
  - a) Plasmid bakteri E.Coli dipotong dengan enzim endonuklease.
  - b) Gen somatotropin sapi diisolasi dari sel sapi
  - c) Gen somatotropin disisipkan ke plasmid bakteri
  - d) Bakteri yang menghasilkan bovine somatotrophine ditumbuhkan dalam tangki fermentasi
  - e) Bovine somatotrophine diambil dari bakteri dan dimurnikan. Hormon ini dapat memicu pertumbuhan dan meningkatkan produksi susu. bST mengontrol laktasi (pengeluaran susu) pada sapi dengan meningkatkan jumlah sel-sel kelenjar susu. Jika hormon yang dibuat dengan rekayasa genetika ini disuntikkan pada hewan, maka produksi susu akan meningkat hingga 20%.

b. Bidang Pertanian

Dampak positif adanya bioteknologi di bidang pertanian diantaranya yaitu perbaikan kualitas tanaman, yaitu tanaman memiliki sifat-sifat unggul sesuai yang diinginkan. Contoh produk bioteknologi dalam bidang pertanian adalah tanaman transgenic (Bahagiawati, 2020). Tanaman transgenik ini merupakan tanaman hasil rekayasa genetika (Genetically modified Organism /GMO). Produk tanaman transgenik dilengkapi dengan sifat-sifat yang berkualitas seperti tahan terhadap

herbisida, tahan terhadap hama dan penyakit yang disebabkan virus tertentu (Sunarlim, 2003). Adapun contoh tanaman transgenik sebagai berikut:

- 1) Kedelai tahan herbisida
- 2) Jagung tahan herbisida dan penggerek batang
- 3) Kapas tahan ulat buah
- 4) Kentang tahan kumbang daun
- 5) Pepaya tahan virus
- 6) Tomat tahan penyimpanan
- 7) Kedelai dengan perbaikan mutu minyak
- 8) Kentang tahan virus
- 9) Pepaya mengandung gen delay ripening
- 10) Padi yang mengandung gen BT (*Bacillus thuringiensis*) yang menyebabkan padi tahan penggerek batang
- 11) Golden rice mengandung provitamin A (Herman, 2010).

c. Bidang kesehatan

Penerapan rekayasa genetika dalam bidang kesehatan/bidang kedokteran adalah dengan penggunaan organisme hasil rekayasa genetika (GMO) dalam kesehatan manusia meliputi:

- 1) Memproduksi vaksin atau obat-obatan  
Saat ini ada 2 jenis obat yang menggunakan teknologi gen yaitu:
  - a) Obat-obatan yang terbuat dari GMO, misalnya, menggunakan bakteri hasil rekayasa genetika (GM) untuk memproduksi insulin
  - b) GMO digunakan sebagai obat-obatan misalnya : vaksin influenza, vaksin kolera, beberapa vaksin untuk mencegah demam berdarah (Mielief *et al.*, 2015)
- 2) Mengobati penyakit genetik menggunakan terapi gen  
Contoh penggunaan GMO sebagai obat adalah terapi gen. Penelitian sedang menjajaki terapi gen untuk mengobati penyakit genetik, kanker, penyakit

menular, dan untuk memproduksi vaksin. Secara sederhana, terapi gen melibatkan penyisipan DNA atau RNA ke dalam sel untuk mengobati atau mencegah penyakit yang tidak dapat diobati dengan obat-obatan. Hal ini dilakukan dengan cara:

- a) mengganti gen yang rusak dengan gen yang sehat
- b) 'mematikan' gen yang rusak yang menyebabkan suatu penyakit atau kondisi
- c) menambahkan gen baru untuk mengobati penyakit atau gejala suatu kondisi, baik gen yang hilang atau gen yang memperkenalkan fungsi baru (Widyastuti, 2017).

## 6. Dampak positif dan dampak negatif dari proses rekayasa genetika

Produk yang diperoleh dari hasil rekayasa genetika memberikan dampak yang cukup besar dalam berbagai bidang. Namun, hal tersebut tentu memiliki dampak yang menguntungkan dan merugikan dari proses tersebut.

### a. Dampak positif

- 1) Mengurangi biaya dan meningkatkan penyediaan sejumlah besar bahan yang sekarang digunakan dalam pengobatan, pertanian dan industri.
- 2) Mengembangkan tanaman – tanaman pertanian yang bersifat unggul
- 3) Menukar gen dari satu organisme kepada organisme lainnya sesuai dengan keinginan manusia, menginduksi sel untuk membuat bahan-bahan yang sebelumnya tidak pernah dibuat.
- 4) Mampu memindahkan materi genetik dari sumber yang sangat beragam dengan ketepatan tinggi dan terkontrol dalam waktu yang lebih singkat. Melalui proses rekayasa genetika ini, telah berhasil dikembangkan berbagai organisme maupun produk yang menguntungkan bagi kehidupan manusia.

- 5) Teknologi khusus yang digunakan dalam rekayasa genetik meliputi teknologi DNA Rekombinan yaitu pembentukan kombinasi materi genetik yang baru dengan cara penyisipan molekul DNA ke dalam suatu vektor sehingga memungkinkannya untuk terintegrasi dan mengalami perbanyakannya dalam suatu sel organisme lain yang berperan sebagai sel inang.
- b. Dampak negatif  
Kekhawatiran terhadap pangan produk rekayasa genetika mencakup berbagai aspek, 3 isu yang sering dipermasalahkan adalah :
  - 1) Kecenderungan untuk menyebabkan reaksi alergi (alergenitas)  
Pada prinsipnya transfer gen dari pangan yang menyebabkan alergi tidak diinginkan kecuali jika terbukti bahwa protein hasil transfer gen tidak bersifat alergenik. Walaupun pangan yang diproduksi secara tradisional umumnya tidak diuji alergenitasnya, akan tetapi untuk pangan produk rekayasa genetika protokol untuk pengujian tersebut telah disiapkan dan dievaluasi oleh FAO dan WHO.
  - 2) Transfer gen. Transfer gen dari pangan produk rekayasa genetika ke dalam sel tubuh atau ke bakteri di dalam sistem pencernaan menimbulkan kekhawatiran jika material genetika yang ditransfer tersebut dapat merugikan kesehatan manusia.
  - 3) Tanaman transgenik hasil rekayasa genetik memiliki beberapa resiko, diantaranya:
    - a) Berdampak pada keanekaragaman hayati
    - b) Timbulnya biotipe serangga atau ras patogen baru
    - c) Berdampak pada hewan atau organisme bukan sasaran
    - d) Kemungkinan berdampak pada manusia

- e) Kemungkinan menimbulkan keracunan, alergi, dan menyebabkan bakteri dalam tubuh manusia tahan antibiotik

- f) Kemungkinan adanya perbedaan nutrisi

Sesuai dengan pernyataan WHO, pangan produk rekayasa genetika yang tersedia di pasaran internasional saat ini telah melewati kajian risiko dan kemungkinan besar tidak mungkin menimbulkan risiko terhadap kesehatan manusia. Disamping itu, belum ditemukan efek terhadap kesehatan manusia yang terjadi pada masyarakat yang mengkonsumsi pangan tersebut di negara-negara dimana pangan tersebut telah diizinkan. Meskipun WHO menyebutkan sampai kini belum ada bukti bahwa pangan hasil rekayasa genetika merugikan kesehatan, tetapi prinsip kehati-hatian tetap diperlukan dan hal ini sama dengan kehati-hatian terhadap produk yang mengandung allergen (Estianti, 2015).

## DAFTAR PUSTAKA

- Azadi, H. & Peter, H. (2010). Genetically Modified and Organic Crop in Developing Countries: A Review of Option for Food Security. *Biotechnology Advances*, 28, 160-168. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.003)
- Bahagiawati, B., & Hadiarto, T. (2020). Perkembangan Pemanfaatan, Regulasi, dan Metode Deteksi Produk Rekayasa Genetika Pertanian di Indonesia. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 39(1), 61-71. DOI: [10.21082/jp3.v39n1.2020.p61-71](https://doi.org/10.21082/jp3.v39n1.2020.p61-71)
- Estianti, A. & Herman, M. (2015). Regulasi Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik di Indonesia. *Analisis Kebijakan Pertanian*, 13(2), 129-146. DOI: [10.21082/akp.v22n1.2024.151-167](https://doi.org/10.21082/akp.v22n1.2024.151-167)
- Fahmideh, L, Khodadadi, E., & Khodadadi, E. (2014). A Review of Applications of Biotechnology in the Environment. *International Journal of Farming and Allied Science*, 3(12), 1319-1325.
- Herman, M. (2010). Aplikasi Teknik Rekayasa Genetik Dalam Perbaikan Sumber Daya Genetik Tanaman Untuk Ketahanan Cekaman Biotik. *Buletin Plasma Nufyah*, 16(1), 72-84. DOI: [10.21082/blpn.v16n1.2010.p72-84](https://doi.org/10.21082/blpn.v16n1.2010.p72-84)
- Kwon, D.H,
- Muladno. (2002). *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Mahrus. (2014). Kontroversi Produk Rekayasa Genetika Yang Dikonsumsi Masyarakat. *Jurnal Biologi Tropis*. 14(2), 108-119.  
DOI: [10.29303/jbt.v14i2.138](https://doi.org/10.29303/jbt.v14i2.138)
- Melief, C. J. M., Hall, T. V., Arens, R., Ossendorp, F., Van Der Burg, S. H. (2015). Therapeutic cancer, Faccines. *J Clin invest*. 125(9), 3401-3412. DOI: [10.1172/JCI80009](https://doi.org/10.1172/JCI80009)
- Retnoningrum, D. S., Kardena, E., & Noer. A. S. (2005). Indonesia Biotechnology Consortium: Present and Future. Workshop on the Establishment of Biotechnology Information Network Asia (BINASIA) Nodal in

Indonesia. July 27-28, Jakarta. DOI  
[10.21107/rekayasa.v12i2.5469](https://doi.org/10.21107/rekayasa.v12i2.5469)

- Sunarlim, N. & Sutrisno. (2003). Perkembangan Penelitian Bioteknologi Pertanian di Indonesia. *Buletin Agrobio*. 6(1) 1-7.
- Sutarno (2015). *Genetika Non-Mendel. DNA mitokondria dan perannya dalam produksi hewan dan kelainan pada manusia*. UNS Press: Solo
- Sutarno (2016). Rekayasa Genetik Dan Perkembangan Bioteknologi Di Bidang Peternakan. *Proceeding Biology Education Conference*, Vol 13(1) 2016: 23-27
- Sutrisno, A dan Agustin K.W. (2023). *Pengantar Rekayasa Genetika*. Universitas Brawijaya Press: Malang
- Wasilah U. Siri, R. Mukhamad S. (2019). Perkembangan Bioteknologi di Indonesia. *Journal of Science and Technology*. 2019; 12(2): 85-90. DOI. [10.21107/rekayasa.v12i2.5469](https://doi.org/10.21107/rekayasa.v12i2.5469)
- Widyastuti, D. A. (2017). Terapi Gen: Dari Bioteknologi Untuk Kesehatan. Al-Kauniyah. *Journal of Biology*. 10(1), 60-72. DOI: [10.15408/kauniyah.v10i1.4864](https://doi.org/10.15408/kauniyah.v10i1.4864)

## BIODATA PENULIS



**Apt. Asiska Permata Dewi, M.Farm** lahir di Bukittinggi, pada 27 Oktober 1988. Menyelesaikan pendidikan S1, profesi apoteker dan S2 di Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Padang. Sampai saat ini penulis sebagai Dosen di program studi DIII Analis Kesehatan Fakultas Farmasi dan Ilmu Kesehatan Universitas Abdurrah.

# BAB 6

## Teknik transformasi genetik: konjugasi, transduksi, dan transformasi

\*Dr. Siti Hamidatul 'Aliyah, S.Pd, M.Sc.\*

### A. Pendahuluan

Transformasi genetik, yang juga dikenal sebagai transfer gen lateral, merupakan mekanisme di mana suatu organisme memindahkan materi genetik ke organisme lain yang bukan merupakan keturunannya. Dalam konteks evolusi bakteri, adaptasi terhadap lingkungan baru lebih sering terjadi melalui perolehan gen baru melalui transfer gen horizontal dibandingkan dengan perubahan fungsi gen akibat mutasi. Bahkan, diperkirakan bahwa sekitar 20% dari genom *Escherichia coli* berasal dari transfer gen horizontal (Soucy *et al.*, 2015). Teknik transformasi genetik ini memiliki peran penting dalam bioteknologi, kedokteran, dan penelitian biologi molekuler. Buku ini akan membahas tiga mekanisme utama transformasi genetik pada bakteri: konjugasi, transduksi, dan transformasi.

### B. Konjugasi

#### 1. Pengertian konjugasi

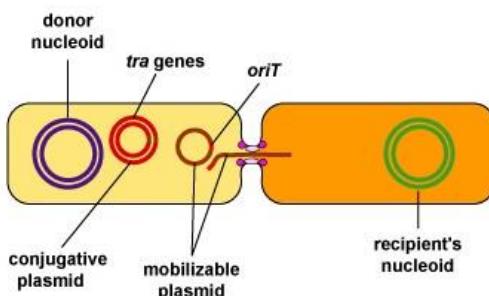
Konjugasi merupakan salah satu mekanisme rekombinasi genetik yang melibatkan transfer DNA dari bakteri donor yang hidup ke bakteri penerima yang juga hidup, melalui kontak sel-ke-sel. Pada bakteri Gram-negatif, proses ini umumnya melibatkan pilus konjugasi atau *sex pilus* (Virolle *et al.*, 2020).

#### 2. Mekanisme konjugasi dan Peran Plasmid Konjugatif

Konjugasi dikendalikan oleh plasmid atau transposon tertentu. Proses ini melibatkan bakteri donor yang memiliki

plasmid konjugatif dan bakteri penerima yang tidak memilikinya. Plasmid konjugatif bersifat *self-transmissible*, artinya mengandung seluruh gen yang diperlukan untuk mentransfer dirinya sendiri ke bakteri lain melalui konjugasi.

Gen konjugasi yang dikenal sebagai *tra genes* memungkinkan bakteri membentuk pasangan kawin (*mating pair*) dengan organisme lain, sedangkan urutan *origin of transfer* (*oriT*) menentukan lokasi awal transfer DNA dengan menjadi titik awal replikasi, tempat enzim-enzim replikasi akan memotong DNA untuk memulai replikasi dan transfer. Selain itu, terdapat plasmid *mobilizable* yang tidak memiliki *tra genes* untuk melakukan transfer secara mandiri, tetapi tetap memiliki *oriT* sehingga dapat ditransfer jika terdapat plasmid konjugatif dalam sel yang sama. Dalam hal ini, *tra genes* dari plasmid konjugatif memungkinkan terbentuknya pasangan kawin, sementara *oriT* dari plasmid *mobilizable* memungkinkan perpindahan DNA melalui jembatan konjugatif (Grohmann *et al.*, 2003)(Gambar 1).



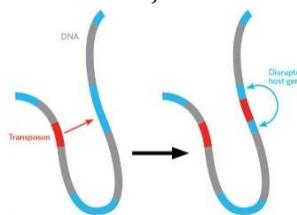
**Gambar 1.** Mekanisme transfer plasmid yang dapat dimobilisasi melalui konjugasi  
(sumber gambar: bio.libretexts.org)

Transposon atau yang sering disebut sebagai *jumping genes* merupakan segmen kecil DNA yang mengkode enzim transposase, yang memungkinkan transposon berpindah dari satu lokasi DNA ke lokasi lain, baik pada molekul DNA yang sama maupun berbeda (Gambar 2). Transposon dapat

ditemukan dalam kromosom bakteri (*conjugative transposons*) maupun dalam plasmid, dengan ukuran umumnya berkisar antara satu hingga dua belas gen. Transposon sering kali mengandung gen-gen yang mengkode resistansi antibiotik atau sifat lain, yang dikelilingi oleh *insertion sequences* yang mengkode enzim transposase. Enzim transposase bertanggung jawab untuk memotong dan menyambung kembali DNA selama proses transposisi (Scott & Churchward, 1995).

Transposon konjugatif, seperti halnya plasmid konjugatif, membawa gen yang memungkinkan terbentuknya pasangan kawin untuk konjugasi. Dengan demikian, transposon konjugatif juga memungkinkan transfer plasmid *mobilizable* dan transposon non-konjugatif ke bakteri penerima selama proses konjugasi.

Banyak plasmid konjugatif dan transposon konjugatif memiliki sistem transfer yang sangat luas (*promiscuous transfer systems*), yang memungkinkan mereka untuk mentransfer DNA tidak hanya ke spesies yang sama, tetapi juga ke spesies yang tidak berkerabat dekat. Proses ini berperan penting dalam adaptasi bakteri terhadap lingkungan baru dan evolusi bakteri, karena memungkinkan akuisisi segmen DNA dalam jumlah besar melalui konjugasi.



**Gambar 2.** Mekanisme perpindahan *jumping gene* atau transposons

(Sumber gambar: [www.ucsfnano.org](http://www.ucsfnano.org))

### 3. Mekanisme Umum Transfer Plasmid Konjugatif pada Bakteri Gram-Negatif

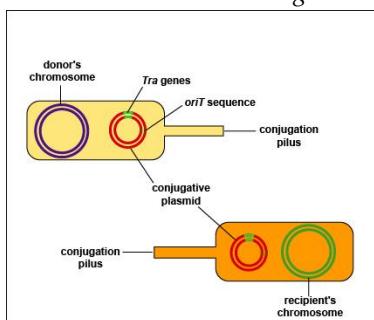
Pada bakteri Gram-negatif, tahap awal konjugasi dimulai dengan perlekatan *pilus konjugasi* (*sex pilus* atau *F pilus*) dari bakteri donor ke bakteri penerima yang tidak

memiliki pilus konjugasi. Setelah terjadi perlekatan, pilus konjugasi mengalami retraksi atau depolimerisasi sehingga menarik kedua bakteri menjadi lebih dekat. Selanjutnya, serangkaian protein membran yang dikode oleh plasmid konjugatif membentuk jembatan dan celah antara kedua bakteri yang kini disebut sebagai pasangan kawin (*mating pair*).

Menggunakan model replikasi *rolling circle*, enzim nuklease memutus salah satu untai DNA plasmid di titik *origin of transfer (oriT)*, yang juga berfungsi sebagai titik awal replikasi. Salah satu untai DNA plasmid yang terpotong mulai masuk ke dalam bakteri penerima, sementara untai lainnya tetap berada di dalam sel donor.

Sebagai hasilnya, kedua bakteri kini memiliki plasmid konjugatif dan mampu membentuk pilus konjugasi sendiri (Gambar 3).

Mekanisme ini menjadi dasar bagi penyebaran plasmid resistansi (*R-plasmids*), yang mengandung gen-gen yang mengkode resistansi terhadap berbagai antibiotik sekaligus. Penyebaran *R-plasmids* melalui konjugasi menjadi tantangan besar dalam pengobatan oportunistik yang disebabkan oleh bakteri Gram-negatif seperti *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, dan *Pseudomonas*, serta infeksi usus oleh *Salmonella* dan *Shigella*.

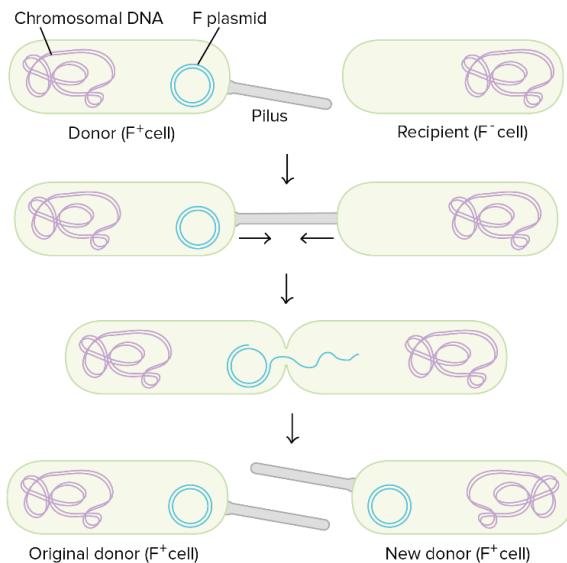


**Gambar 3.** Mekanisme Transfer Plasmid Konjugatif pada Bakteri Gram-Negatif  
(sumber gambar : [bio.libretexts.org](http://bio.libretexts.org))

Selain itu, terdapat bukti bahwa pilus konjugasi juga dapat berfungsi sebagai saluran langsung untuk mentransfer DNA untai tunggal selama konjugasi.

#### 4. Konjugasi F+

Konjugasi F+ merupakan proses transfer plasmid F+ yang mengandung gen *tra*, yang hanya berfungsi dalam pembentukan pilus konjugasi dan pasangan kawin (*mating pair*), dari bakteri donor ke bakteri penerima. Dalam proses ini, salah satu untai DNA plasmid F+ akan diputus oleh enzim nuklease pada urutan *origin of transfer* (oriT). OriT berfungsi sebagai titik awal replikasi, di mana enzim replikasi DNA akan membuat sayatan (*nick*) untuk memulai replikasi sekaligus transfer DNA (Gambar 4) (Firth *et al.*, 1996).



**Gambar 4.** Mekanisme Konjugasi F+  
(sumber gambar: [www.jackwestin.com](http://www.jackwestin.com))

Untai DNA yang telah diputus akan masuk ke dalam sel penerima, sedangkan untai lainnya tetap berada dalam sel donor. Setelah masuk, baik untai DNA di donor maupun di penerima akan mengalami replikasi untuk membentuk

salinan komplemennya. Sebagai hasilnya, bakteri penerima akan berubah menjadi F+ dan dapat membentuk pilus seks, sehingga mampu berperan sebagai donor dalam siklus konjugasi berikutnya.

Selain itu, plasmid yang dapat dipindahkan (*mobilizable plasmids*), yang tidak memiliki gen *tra* untuk melakukan transmisi sendiri tetapi mengandung urutan oriT untuk inisiasi transfer DNA, juga dapat ditransfer melalui konjugasi. Dalam hal ini, gen *tra* dari plasmid F+ memungkinkan terbentuknya pasangan kawin, sementara oriT dari plasmid yang dapat dipindahkan memungkinkan DNA melewati jembatan konjugatif menuju bakteri penerima.

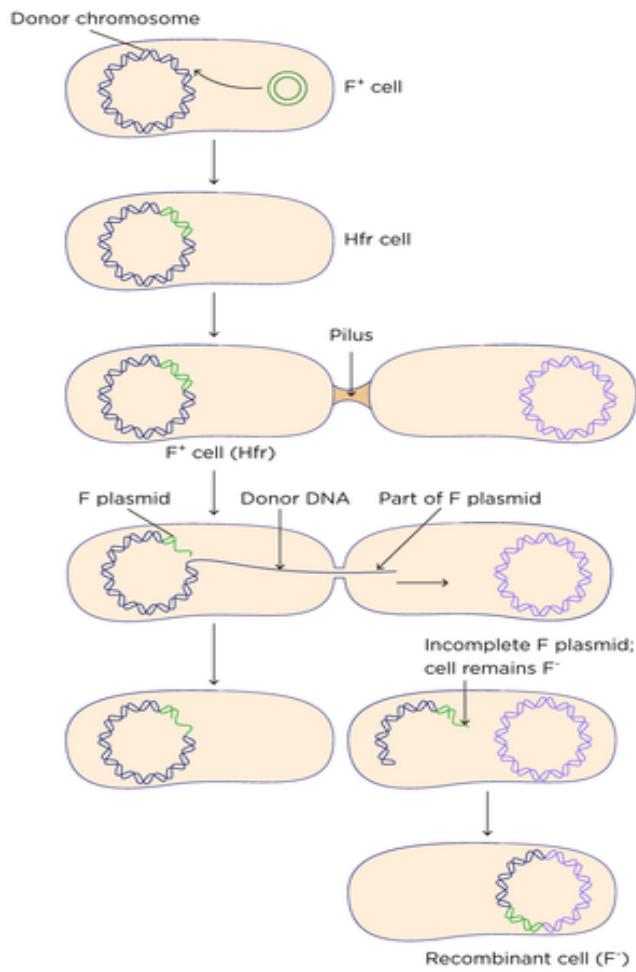
##### 5. Konjugasi Hfr (*High-Frequency Recombinant*)

Konjugasi Hfr terjadi ketika plasmid F+, yang mengandung gen *tra* untuk pembentukan pasangan kawin, berintegrasi ke dalam kromosom bakteri dan membentuk bakteri Hfr. Plasmid yang mampu berintegrasi ke dalam nukleoid inang ini disebut *episom*.

Dalam proses ini, enzim nuklease akan memutus salah satu untai DNA donor di lokasi *origin of transfer* (oriT) dari plasmid F+ yang telah berintegrasi. Setelah itu, untai DNA yang telah diputus mulai masuk ke dalam sel penerima. Sementara itu, untai DNA yang tersisa di dalam sel donor tetap bertahan dan mengalami replikasi untuk membentuk salinan komplemennya.

Namun, koneksi antara kedua bakteri biasanya terputus sebelum seluruh kromosom dapat ditransfer. Akibatnya, hanya sebagian DNA kromosom yang berhasil berpindah ke sel penerima. DNA kromosom yang masuk ini dapat mengalami rekombinasi homolog dengan DNA penerima, tetapi tidak menyertakan keseluruhan plasmid F+. Oleh karena itu, bakteri penerima tidak memperoleh kemampuan untuk membentuk pilus konjugasi dan pasangan kawin seperti pada konjugasi F+ (Lloyd & Buckman, 1995) (Gambar 5).

### Hfr conjugation



Jack Westin

**Gambar 5.** Mekanisme Konjugasi Hfr  
(sumber gambar: [www.jackwestin.com](http://www.jackwestin.com))

## C. Transduksi

### 1. Pengertian Transduksi

Transduksi adalah salah satu metode transfer genetik dari satu bakteri ke bakteri lain melalui perantara virus. Proses ini tidak memerlukan kontak langsung antara sel bakteri. Dalam proses ini, bakteriofaga (virus yang menginfeksi bakteri) menggunakan sel inang untuk bereplikasi. Selama proses perkaitan virus baru, terkadang bakteriofaga secara tidak sengaja mengemas DNA bakteri inang ke dalam kapsidnya. Ketika virus ini menginfeksi bakteri lain, DNA bakteri yang terbawa dapat dimasukkan ke dalam genom bakteri penerima (Chiang *et al.*, 2019).

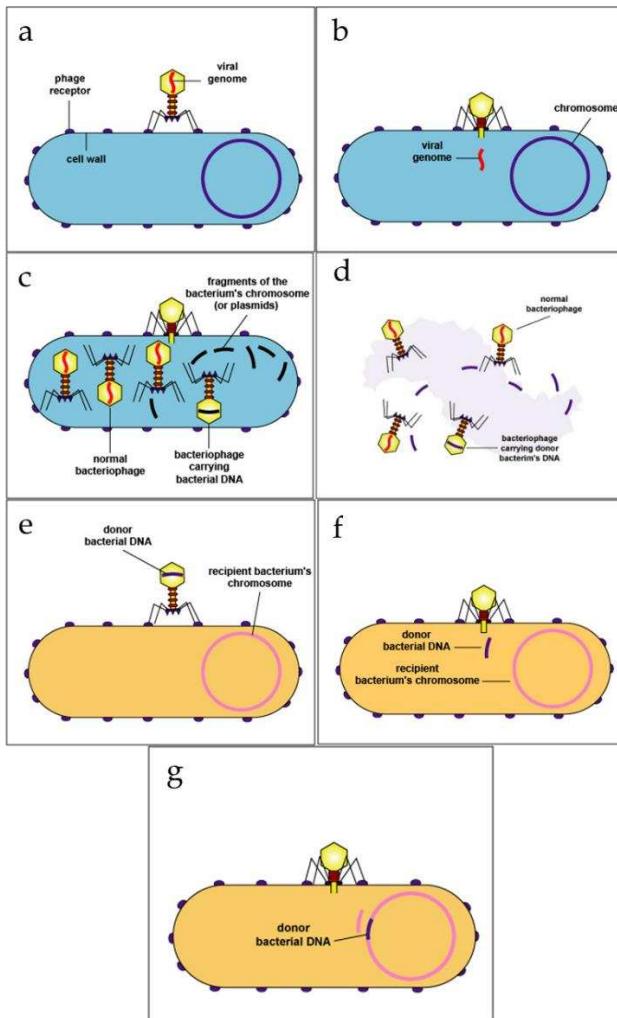
Transduksi sering digunakan dalam rekayasa genetika untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel inang. Transduksi pertama kali ditemukan oleh Zinder dan Lederberg pada penelitian mereka terhadap *Salmonella*. Hershey dan Chase menggunakan transduksi sebagai alat untuk membuktikan bahwa DNA adalah materi genetik.

### 2. Mekanisme Transduksi

Transfer DNA bakteri pada proses transduksi bergantung pada infeksi virus (Gambar 6). Langkah-langkahnya meliputi:

- a. Bakteriofaga menempel pada bakteri yang rentan.
- b. Genom bakteriofaga masuk ke dalam bakteri. Genom ini mengarahkan mesin metabolisme bakteri untuk membuat komponen dan enzim bakteriofaga. Enzim yang dikodekan oleh bakteriofaga juga akan memecah kromosom bakteri.
- c. Kapsid bakteriofaga secara tidak sengaja mengemas fragmen kromosom bakteri donor atau plasmid, bukan genom bakteriofaga.
- d. Bakteriofaga dilepaskan saat bakteri mengalami lisis. Salah satu bakteriofaga membawa fragmen DNA bakteri donor, bukan genom bakteriofaga.
- e. Bakteriofaga yang membawa DNA bakteri donor menempel pada bakteri penerima.

- f. Bakteriofaga menyuntikkan DNA bakteri donor ke dalam bakteri penerima.
- g. Terjadi rekombinasi homolog, dan DNA bakteri donor ditukar dengan sebagian DNA bakteri penerima.



**Gambar 6.** Mekanisme transduksi secara umum  
(sumber gambar : bio.libretexts.org)

### 3. Jenis Transduksi

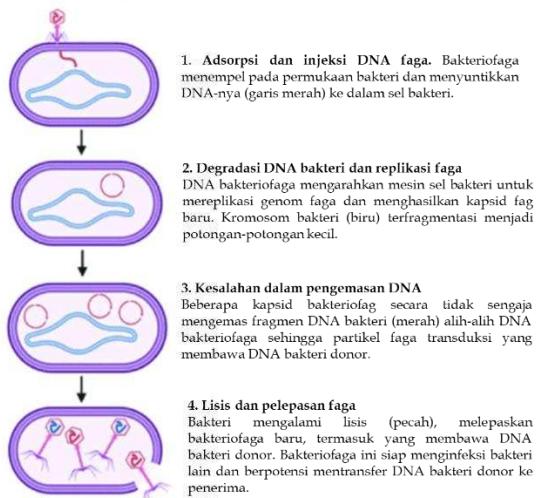
Transduksi dapat terjadi baik pada bakteriofaga virulen maupun temperat, yaitu melalui siklus litik atau lisogenik. Transduksi terdiri dari dua jenis:

#### a. Transduksi Generalisasi

Transduksi generalisasi yaitu bakteriofaga dapat membawa bagian DNA bakteri mana pun secara acak. Transduksi generalisasi dapat terjadi melalui siklus litik maupun lisogenik. Pada proses ini, bagian DNA bakteri mana pun dapat terbawa secara acak ke dalam bakteriofaga bersamaan dengan genom virus. Ini terjadi pada tahap litik dari siklus hidup bakteriofaga (Lederberg & Zinder, 1952). Ketika virus yang membawa DNA bakteri ini menginfeksi sel bakteri lain, DNA yang ditransfer dapat:

- 1) Berintegrasi ke dalam genom bakteri penerima.
- 2) Jika DNA tersebut berbentuk plasmid, maka plasmid dapat tetap eksis sebagai elemen ekstrakromosomal (Gambar 7).

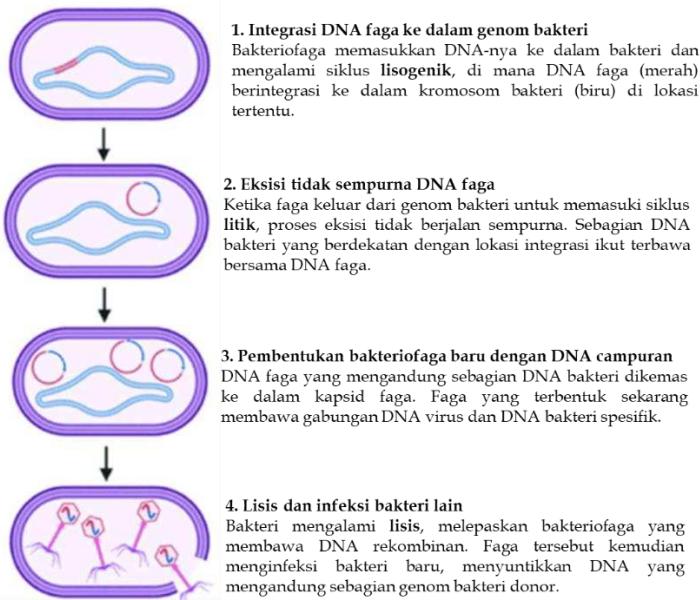
Transduksi generalisasi dapat digunakan untuk mempelajari hubungan genetik (linkage information), pemetaan gen (*gene mapping*), membandingkan genom dari dua jenis bakteri yang berbeda dan studi mutagenesis. Contoh transduksi generalisasi yaitu transduksi *E. coli* oleh fag P1.



**Gambar 7.** Mekanisme transduksi general pada bakteri  
(sumber gambar: <https://mehlmanmedical.com>)

b. Transduksi Spesialisasi

Transduksi spesialisasi yaitu bakteriofaga hanya membawa bagian tertentu dari DNA bakteri. Transduksi spesialisasi hanya terjadi melalui siklus lisogenik, yang melibatkan bakteriofaga temperat (Gambar 8). Dalam proses ini, hanya bagian spesifik dari DNA bakteri yang terbawa ke dalam virus.



**Gambar 8.** Mekanisme transduksi spesialisasi  
(sumber gambar: <https://mehlmanmedical.com>)

#### Mekanisme Transduksi Spesialisasi diantaranya:

- 1) Profaga (DNA virus yang terintegrasi dalam genom bakteri) terpotong dari DNA bakteri.
- 2) Sebagian DNA bakteri yang berdekatan dengan profaga juga ikut terpotong dan masuk ke dalam kepala bakteriofaga yang baru dirakit.
- 3) Virus yang membawa DNA bakteri ini kemudian menginfeksi sel bakteri lain.
- 4) DNA bakteri yang terbawa dapat berintegrasi ke dalam genom bakteri penerima melalui **lisogeni**.
- 5) Bakteri penerima kini memiliki sifat genetik baru yang diperoleh dari bakteri donor.

Transduksi spesialisasi dapat digunakan untuk isolasi dan penyisipan gen tertentu. Contoh transduksi spesialisasi yaitu Transduksi *E. coli* oleh *fag λ (lambda)*.

## D. Transformasi

### 1. Pengertian transformasi

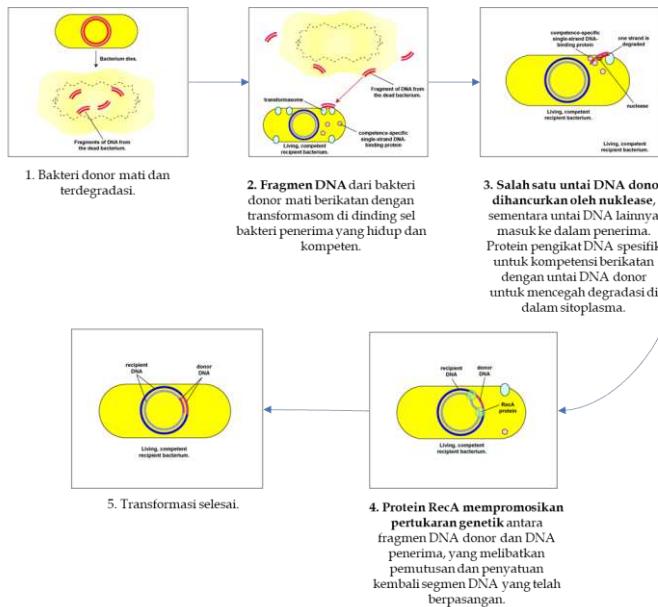
Transformasi adalah proses pengambilan materi genetik dari lingkungan oleh sel bakteri. Secara alami, materi genetik ini sering berasal dari bakteri yang mengalami lisis di sekitarnya dan dapat berupa DNA plasmid atau fragmen DNA yang dilepaskan ke lingkungan. Berbagai faktor dapat mendorong transformasi alami pada bakteri tertentu, seperti fase pertumbuhan sel atau keberadaan zat tertentu (Baltrus & Guillemin, 2006; Meibom *et al.*, 2005). Transformasi biasanya melibatkan rekombinasi homolog, yaitu rekombinasi antara wilayah DNA homolog yang memiliki urutan nukleotida yang hampir sama. Proses ini umumnya terjadi di antara strain bakteri yang serupa atau dalam spesies bakteri yang sama.

Beberapa bakteri, seperti *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, dan *Helicobacter pylori*, cenderung secara alami bersifat kompeten dan dapat mengalami transformasi. Bakteri kompeten mampu mengikat lebih banyak DNA dibandingkan bakteri yang tidak kompeten. Beberapa dari bakteri ini juga mengalami autolisis, yang kemudian menyediakan DNA untuk rekombinasi homolog. Selain itu, beberapa bakteri kompeten dapat membunuh sel non-kompeten untuk melepaskan DNA yang dapat digunakan dalam transformasi (Johnston *et al.*, 2014).

### 2. Mekanisme transformasi

Selama transformasi, fragmen DNA (biasanya sekitar 10 gen panjangnya) dilepaskan dari bakteri mati yang terdegradasi dan berikatan dengan protein pengikat DNA di permukaan bakteri penerima yang hidup dan kompeten. Bergantung pada jenis bakterinya, baik kedua untai DNA masuk ke dalam penerima, atau satu untai DNA dipecah oleh nuklease sementara untai DNA yang

tersisa masuk ke dalam bakteri penerima. Fragmen DNA donor ini kemudian ditukar dengan sebagian DNA penerima melalui protein RecA dan molekul lainnya, yang melibatkan pemutusan dan penyatuan kembali segmen DNA yang telah berpasangan (Gambar 9).



**Gambar 9.** Mekanisme Transformasi pada sel bakteri  
(sumber gambar : [bio.libretexts.org](http://bio.libretexts.org))

## DAFTAR PUSTAKA

- Baltrus, D. A., & Guillemin, K. (2006). Multiple phases of competence occur during the Helicobacter pylori growth cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 255(1). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00066.x>
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathogens*, 15(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>
- Firth, N., Ippen-ihler, K., & Skurray, R. a. (1996). Structure and Function of the F Factor and Mechanism of Conjugation. *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*.
- Grohmann, E., Muth, G., & Espinosa, M. (2003). Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2). <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.2.277-301.2003>
- [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_\(Kaiser\)/Unit\\_2%3A\\_Bacterial\\_Genetics\\_and\\_the\\_Chemical\\_Control\\_of\\_Bacteria/3%3A\\_Bacterial\\_Genetics/3.1%3A\\_Horizontal\\_Gene\\_Transfer\\_in\\_Bacteria](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Kaiser)/Unit_2%3A_Bacterial_Genetics_and_the_Chemical_Control_of_Bacteria/3%3A_Bacterial_Genetics/3.1%3A_Horizontal_Gene_Transfer_in_Bacteria)
- <https://mehlmanmedical.com/conjugation-transduction-transformation/>
- <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/genetics-of-prokaryotic-cells/conjugation>
- <https://www.ucsf.edu/news/2013/02/104508/gene-invaders-are-stymied-cells-genome-defense>
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J. P. (2014). Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- Lederberg, J., & Zinder, N. D. (1952). Genetic exchange in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 64(5).
- Lloyd, R. G., & Buckman, C. (1995). Conjugational recombination in *Escherichia coli*: Genetic analysis of recombinant

- formation in Hfr x F- crosses. *Genetics*, 139(3).  
<https://doi.org/10.1093/genetics/139.3.1123>
- Meibom, K. L., Blokesch, M., Dolganov, N. A., Wu, C. Y., & Schoolnik, G. K. (2005). Microbiology: Chitin induces natural competence in vibrio cholerae. *Science*, 310(5755).  
<https://doi.org/10.1126/science.1120096>
- Scott, R., & Churchward, G. G. (1995). Conjugative transposition. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 49).  
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.002055>
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Issue 8).  
<https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: From the cellular to the community level. In *Genes* (Vol. 11, Issue 11).  
<https://doi.org/10.3390/genes11111239>

## BIODATA PENULIS



**Dr. Siti Hamidatul 'Aliyah, S.Pd, M.Sc** lahir di Jember, pada 5 April 1987. Menyelesaikan pendidikan S1 di FKIP Biologi Universitas Jember, S2 dan S3 di Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Sampai saat ini penulis sebagai peneliti di Pusat Riset Biomedis, Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN).

# BAB 7

## Aplikasi CRISPR-Cas dalam Modifikasi Mikroorganisme

\*Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes.\*

### A. Pendahuluan

Pengembangan metode pengeditan genom berdasarkan teknologi CRISPR-Cas telah dianugerahi Penghargaan Nobel dalam bidang Kimia pada tahun 2020. Pertama kalinya dalam sejarah, hadiah Nobel diberikan kepada dua wanita, Emmanuelle Charpentier dan Jennifer Doudna yang membuat penemuan penting dalam bidang manipulasi DNA dengan sistem CRISPR-Cas, yang disebut "gunting genetik". Teknik ini tidak hanya untuk memanipulasi genom organisme model dalam eksperimen ilmiah, dan memodifikasi karakteristik tanaman dan hewan, tetapi juga berpotensi memperkenalkan perubahan revolusioner dalam bidang kedokteran, terutama dalam pengobatan penyakit genetik. Saat ini, CRISPR-Cas telah berhasil digunakan untuk menyembuhkan penyakit yang mengancam jiwa, dan terapi gen untuk berbagai penyakit (Gostimskaya, 2022; Shmakova et al., 2022; Zhang et al., 2021).

### B. Aplikasi CRISPR-Cas dalam Modifikasi Mikroorganisme

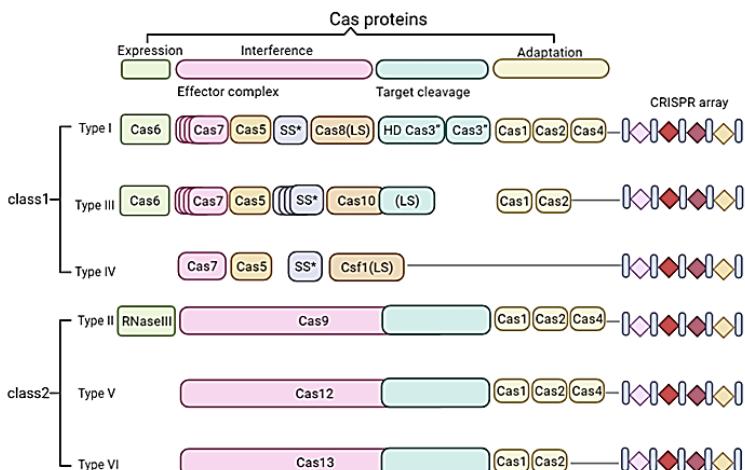
#### 1. Definisi CRISPR-Cas

CRISPR (*Clustered Regularly Inter Spaced Short Palindromic Repeats*) adalah urutan DNA yang terdiri dari potongan-potongan pendek yang teratur dan diulang dengan ukuran 30-40 bp. Setiap urutan ini diikuti oleh "spacer" yang merupakan potongan DNA dari virus atau plasmid yang pernah menyerang bakteri. Cas (CRISPR-associated system) adalah protein yang berfungsi dalam

pengenalan dan pemotongan DNA asing. Wilayah CRISPR ditemukan dalam genom bakteri sekitar 50% dan sekitar 90% dalam genom archaea (Shmakova et al., 2022).

## 2. Klasifikasi CRISPR-Cas

Banyak protein Cas yang terlibat dalam berbagai langkah pemrosesan transkrip lokus CRISPR, pemotongan DNA atau RNA target, dan integrasi *spacer* baru (Makarova & Koonin, 2015). Berdasarkan struktur dan fungsi protein Cas, sistem CRISPR-Cas dapat dibagi menjadi Kelas I (tipe I, III, dan IV) dan Kelas II (tipe II, V, dan VI) (Gambar 9.1). Sistem kelas I terdiri dari kompleks protein Cas multi-subunit, sedangkan sistem kelas II menggunakan satu protein Cas. Sistem CRISPR-Cas Kelas I memerlukan kompleks protein efektor yang besar. Sistem Kelas II hanya memerlukan endositase yang diarahkan RNA untuk memotong komponen genetik yang menyerang. Kesederhanaan dan efisiensi sistem Kelas II membuatnya berfungsi sebagai alat penyuntingan genom yang banyak digunakan. Sistem CRISPR-Cas Tipe II telah digunakan dalam berbagai organisme, termasuk mikroba, jamur, hewan, dan tanaman (X. Ding et al., 2022; Mengstie & Wondimu, 2021).



**Gambar 1. Klasifikasi CRISPR-Cas**

(Sumber: Ding et al., 2022)

### 3. Komponen CRISPR-Cas

Pada struktur CRISPR-Cas9 tipe II relatif sederhana, struktur ini telah digunakan secara luas dalam rekayasa genetika. Komponen dalam CRISPR-Cas9 yaitu Protein Guide RNA (gRNA) dan protein terkait CRISPR (Cas-9) adalah dua komponen penting dalam sistem CRISPR-Cas9. Protein Cas-9 adalah protein Cas pertama yang digunakan dalam penyuntingan genom, diekstraksi dari *Streptococcus pyogenes* (SpCas-9). Protein ini adalah endonuklease DNA multidomain besar (1368 asam amino) yang bertanggung jawab dalam memotong DNA target untuk membentuk pemutusan untai ganda (DSB/*Double strand breaks*) dan disebut gunting genetik. Cas-9 terdiri dari dua daerah, yang disebut lobus pengenalan (REC) dan lobus nuklease (NUC). Lobus REC terdiri dari domain REC1 dan REC2 yang bertanggung jawab untuk mengikat gRNA, sedangkan lobus NUC terdiri dari domain interaksi RuvC, HNH, dan *Protospacer Adjacent Motif* (PAM). HNH berfungsi sebagai pemotong untai DNA komplementer, sementara domain RuvC memotong untai non-komplementer. PAM adalah urutan DNA pendek (panjang 2–5 pasangan basa) yang dileistarikan di hilir ke situs pemotongan dan ukurannya bervariasi tergantung pada spesies bakteri. (Mengstie & Wondimu, 2021).

Domain RuvC dan HNH digunakan untuk memotong setiap DNA untai tunggal, sementara domain interaksi PAM memberikan spesifikasi PAM dan bertanggung jawab untuk memulai pengikatan ke DNA target. gRNA terdiri dari dua bagian, CRISPR RNA (crRNA) dan *trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA). CrRNA adalah pasangan basa sepanjang 18–20 yang menentukan DNA target komplementer dengan urutan target, sedangkan tracrRNA berfungsi sebagai pengikat untuk nuklease Cas-9. Pada prokariota, gRNA digunakan untuk menargetkan DNA virus, tetapi dalam alat penyuntingan gen, gRNA dapat dirancang secara sintetis

dengan menggabungkan crRNA dan tracrRNA untuk membentuk satu RNA pemandu (sgRNA) untuk menargetkan hampir semua urutan gen yang seharusnya disunting (Mengstie & Wondimu, 2021).

#### 4. Mekanisme CRISPR-Cas

Mekanisme penyuntingan genom khususnya CRISPR-Cas secara umum dapat dibagi menjadi tiga langkah: pengenalan dan penyisipan, penargetan dan pemotongan, serta perbaikan. Sebagai contoh yang diulas pada mekanisme ini adalah CRISPR-Cas9.

##### a. Pengenalan dan Penyisipan DNA Asing

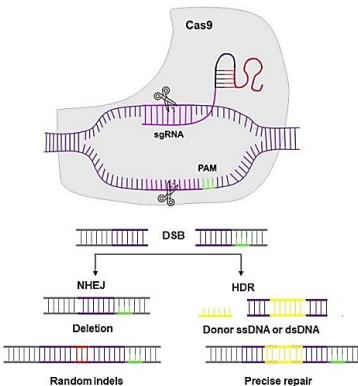
Bakteri mengintegrasikan fragmen plasmid asing ke dalam lokus CRISPR sebagai *spacer* di antara repetisi palindromik. Proses ini melibatkan protein Cas-9 yang membentuk kompleks untuk mengenali dan memotong DNA asing.

##### b. Penargetan dan Pemotongan DNA

SgRNA (*single guide RNA*) yang dirancang mengarahkan protein Cas-9 dan mengenali urutan target pada gen yang diinginkan melalui komponen pasangan basa komplementer 5'crRNA (CRISPR RNA). Protein Cas-9 tetap tidak aktif jika tidak ada sgRNA. Nuklease Cas-9 membuat DBS pada situs 3 pasangan basa di hulu PAM. Protein Cas-9 mengenali urutan PAM pada 5'-NGG-3' (N dapat berupa basa nukleotida apa pun). Setelah Cas-9 menemukan lokasi target dengan PAM yang sesuai, ia memicu peleburan DNA lokal yang diikuti oleh pembentukan hibrida RNA-DNA. Setelah terjadi pembentukan hibrida RNA-DNA, protein Cas-9 diaktifkan untuk pemotongan DNA. Domain HNH memotong untai komplementer, sementara domain RuvC memotong untai non-komplementer dari DNA target sehingga menghasilkan DSB. DSB kemudian diperbaiki oleh sel inang.

c. Perbaikan DNA

Jalur yaitu *Non-Homologous End Merged* (NHEJ) dan *Homology Directed Repair* (HDR) adalah dua mekanisme untuk memperbaiki DSB yang dipotong oleh protein Cas-9 dalam mekanisme CRISPR-Cas9. NHEJ memfasilitasi perbaikan DSB dengan menggabungkan fragmen DNA melalui proses enzimatik tanpa adanya DNA homolog eksogen dan aktif dalam semua fase siklus sel. HDR menjadi mekanisme yang sangat tepat dan memerlukan penggunaan template DNA homolog. Hal ini paling aktif dalam fase S dan G2 akhir dari siklus sel. Saat penyuntingan gen CRISPR, HDR memerlukan sejumlah besar template DNA donor (eksogen) yang berisi urutan yang diinginkan. HDR melakukan penyisipan atau penggantian gen yang tepat dengan menambahkan templat DNA donor dengan homologi urutan di situs DSB yang diinginkan (Gambar 9.2) (Mengstie & Wondimu, 2021).



**Gambar 2.** Mekanisme CRISPR-Cas9

(Sumber: Kaupbayeva et al., 2024)

## 5. CRISPR-Cas dalam Resistensi Antibiotik

Teknologi CRISPR-Cas telah menjadi revolusioner dalam modifikasi genetik mikroorganisme. CRISPR-Cas memungkinkan dalam pengeditan atau penyuntingan

genom yang presisi dan efisien. Salah satu aplikasi utamanya adalah dalam mengatasi resistensi antibiotik pada bakteri patogen. Teknologi ini menargetkan dan memotong gen yang bertanggung jawab atas resistensi, seperti gen bla, sul2, dan mcr-1. CRISPR-Cas dapat mengeliminasi gen yang menyebabkan bakteri resisten terhadap antibiotik serta dapat mengembalikan sensitivitas terhadap antibiotik. Pendekatan dengan teknologi ini menawarkan solusi spesifik tanpa mempengaruhi flora normal lainnya, sehingga berpotensi menjadi alternatif utama dalam terapi infeksi akibat bakteri resisten yang semakin meningkat (De La Fuente-Núñez & Lu, 2017; W. Ding et al., 2020).

## 6. Tantangan dalam CRISPR-Cas

CRISPR-Cas meskipun merupakan teknologi yang sangat inovatif dalam pengeditan gen. CRISPR-Cas juga menghadapi sejumlah tantangan yang signifikan. Berikut adalah beberapa tantangan utama yang dihadapi dalam penerapan teknologi ini:

### a. Efek Off-Target

Salah satu tantangan terbesar adalah potensi efek off-target, sistem CRISPR-Cas dapat secara tidak sengaja memotong dan mempengaruhi sekuen DNA yang tidak diinginkan. Hal ini dapat menyebabkan mutasi yang tidak diinginkan dan berpotensi menimbulkan risiko bagi kesehatan seluruh organisme.

### b. Masalah Etika

Penggunaan CRISPR-Cas untuk mengedit genom khususnya genom manusia menimbulkan pertanyaan etis yang kompleks. Kemampuan untuk memodifikasi genetik membuka kemungkinan penciptaan bayi dengan sifat-sifat yang diinginkan, yang dapat menciptakan ketidakadilan sosial dan memperlebar kesenjangan antara mereka yang mampu mengakses teknologi ini dan yang tidak.

c. Keamanan Jangka Panjang

Ada kekhawatiran tentang keamanan jangka panjang dari terapi genetik menggunakan CRISPR-Cas. Meskipun upaya dilakukan untuk meningkatkan spesifitas dan akurasi, potensi efek samping yang mungkin muncul pada organisme yang telah mengalami terapi genetik tetap menjadi perhatian utama.

d. Pengembangan Metode Pengiriman

Tantangan teknis lainnya adalah pengembangan metode penghantaran (*delivery*) CRISPR-Cas ke sel target dengan cara yang aman dan efisien. Metode penghantaran yang efektif masih menjadi fokus penelitian untuk memastikan bahwa teknologi ini dapat mencapai sasaran dengan presisi.

e. Risiko Penyalahgunaan

Ada kekhawatiran bahwa teknologi ini bisa disalahgunakan untuk tujuan yang merugikan, seperti penciptaan patogen berbahaya atau senjata biologis. Ini menimbulkan kebutuhan mendesak untuk regulasi yang ketat dalam penggunaan CRISPR-Cas.

f. Dampak Terhadap Keanekaragaman Genetik

Penggunaan luas CRISPR-Cas dapat mengurangi keanekaragaman genetik, membuat populasi lebih rentan terhadap penyakit baru. Ini menjadi perhatian terutama dalam konteks ekosistem dan keberlanjutan jangka panjang (Aubry, 2025; Islami et al., 2024; Kristianti Angeline, 2020; Siswanto & Kartiko, 2017).

## DAFTAR PUSTAKA

- Aubry, J. (2025). Teknologi CRISPR/Cas9 Sebagai Masa Depan Terapi. *Journal of Therapeutic*, 1(2).
- De La Fuente-Núñez, C., & Lu, T. K. (2017). CRISPR-Cas9 Technology: Applications in Genome Engineering, Development of Sequence-Specific Antimicrobials, and Future Prospects. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 9(2), 109–122. <https://doi.org/10.1039/c6ib00140h>
- Ding, W., Zhang, Y., & Shi, S. (2020). Development and Application of CRISPR/Cas in Microbial Biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(June), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00711>
- Ding, X., Yu, L., Chen, L., Li, Y., Zhang, J., Sheng, H., Ren, Z., Li, Y., Yu, X., Jin, S., & Cao, J. (2022). Recent Progress and Future Prospect of CRISPR/Cas-Derived Transcription Activation (CRISPRa) System in Plants. *Cells*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/cells11193045>
- Gostimskaya, I. (2022). CRISPR-Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Moscow)*, 87(8), 777–788. <https://doi.org/10.1134/S0006297922080090>
- Islami, S., Haq, R. A., Arianto, N. N., Sabina, D. L., Kedokteran, F., & Lampung, U. (2024). Teknik Penyuntingan Gen Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9 ( CRISPR-Cas9 ) sebagai Terapi Penyakit Genetik Bawaan. *Medula*, 14(2), 334–343.
- Kaupbayeva, B., Tsoy, A., Safarova, Y., Nurmagambetova, A., Murata, H., Matyjaszewski, K., & Askarova, S. (2024). Unlocking Genome Editing: Advances and Obstacles in CRISPR/Cas Delivery Technologies. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/jfb15110324>
- Kristianti Angeline, W. (2020). CRISPR-Inovasi Biologi Molekuler dan Medis yang Kontroversial. *Cdk-284*, 47(3), 218–284. <https://www.>
- Makarova, K. ., & Koonin, E. . (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol*,

- 47–75. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9>
- Mengstie, M. A., & Wondimu, B. Z. (2021). Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics: Targets and Therapy*, 15, 353–361.
- Shmakova, A. A., Shmakova, O. P., Karpukhina, A. A., & Vassetzky, Y. S. (2022). CRISPR/Cas: History and Perspectives. *Russian Journal of Developmental Biology*, 53(4), 272–282.  
<https://doi.org/10.1134/s1062360422040075>
- Siswanto, F. M., & Kartiko, B. H. (2017). Aplikasi Teknologi CRISPR/Cas9 dalam Anti-Aging Medicine. *Jurnal Media Sains*, 1(2), 50–56.
- Zhang, D., Zhang, Z., Unver, T., & Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *Journal of Advanced Research*, 29, 207–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.10.003>

## BIODATA PENULIS



**Rima Agnes Widya Astuti, S.Tr.AK., M.Kes.** lahir di Pangkalan Bun, Kalimantan Tengah pada tanggal 11 September 1995. Pada tahun 2017 lulus Diploma IV Analis Kesehatan dari Poltekkes Banjarmasin. Melanjutkan magister pada Program Studi Sains Laboratorium Medis atau Ilmu Laboratorium Klinis di Universitas Muhammadiyah Semarang dan lulus pada tahun 2023. Saat ini aktif menjadi dosen pada Program Studi Diploma III Analis Kesehatan di Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Cendekia Medika, Pangakalan Bun dari tahun 2023. Penulis juga telah pengalaman menulis buku yang telah diterbitkan yaitu buku "Gut Microbiota Revolusi Kesehatan dari dalam Tubuh" dan "Bakteriologi 1 Teknologi Laboratorium Medis".

Email : [rimaagnes60@gmail.com](mailto:rimaagnes60@gmail.com)

# BAB 8

## Produksi Protein Rekombinan dan Vaksin Berbasis Mikroba

\*Nurina Tahta Afwi Maulina, S.Si., M.Biotech.\*

### A. Pendahuluan

Protein Rekombinan adalah polipeptida yang diproduksi dari hasil kloning gen melalui teknologi DNA rekombinan, yaitu suatu teknik penyisipan (insersi) gen yang telah dimodifikasi secara genetik ke dalam suatu sel inang organisme. Protein rekombinan secara umum dihasilkan melalui sistem ekspresi heterogen. Proses produksi protein rekombinan dilakukan dengan cara menyiapkan suatu fragmen DNA yang telah mengandung gen yang diharapkan (*gene of interest*). Setelah gen tersebut diidentifikasi, diisolasi, dan dikarakterisasi, kemudian dimasukkan ke dalam suatu vektor. Vektor dapat berupa plasmid, bakteriofage, *artificial chromosome*, dsb. yang mampu menerima *gene of interest* pada bagian situs tertentu melalui bantuan enzim retraksi dan pengikatan. Vektor tersebut kemudian dimasukkan ke dalam sel inang (khususnya mikroba seperti *Escherichia coli* atau *Saccharomyces cerevisiae*) dan akan melakukan *self-replicate* bersamaan dengan proses replikasi dari sel inang tersebut (Morbioli et al., 2016).

Protein rekombinan digunakan dalam berbagai bidang termasuk industri makanan, *genetically modified organism* (GMO), ataupun sebagai reagen dalam bidang medis, seperti produksi obat terbaru, pengembangan kit diagnosis dengan antibodi atau antigen rekombinan, terapi gen, ataupun vaksin. Beberapa obat rekombinan saat ini diproduksi dengan

menggunakan teknologi DNA rekombinan, contohnya adalah hormon seperti insulin, *human growth hormone* (hGH), eritropoietin (EPO) (Delanghe et al., 2008; Seresht et al., 2013). Selain itu produksi antibodi monoklonal (mAb) dan vaksin yang diproduksi melalui teknik rekombinan saat ini sedang meningkat dan memiliki potensi besar dalam berbagai aplikasi klinis dibandingkan dengan obat sintesis. Beberapa vaksin seperti vaksin untuk mengatasi infeksi SARS-CoV-2 penyebab Covid-19, banyak diproduksi dengan berbasis mikroba dan memanfaatkan teknik rekombinan (Islam, 2023).

Produksi protein rekombinan menggunakan mikroba memiliki beberapa keunggulan dan tantangan yang perlu untuk dipertimbangkan dalam aplikasi baik industri maupun medis. Produksi protein rekombinan dipilih karena memungkinkan produksi dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat, karena waktu generasi yang singkat dari mikroba seperti *E. coli* (Rosano & Ceccarelli, 2014). Pemanfaatan obat maupun vaksin rekombinan ini semakin diminati akibat spesifitas yang lebih tinggi, sehingga mengurangi efek samping pada sistem biologi. Obat dan vaksin rekombinan cenderung tidak merangsang respons imun dari suatu organisme, karena kemiripannya dengan protein yang disintesis oleh tubuh (Morbioli et al., 2016).

Pada bab ini digambarkan bagaimana mekanisme produksi protein rekombinan serta peran mikroba dalam produksi protein rekombinan dan vaksin.

## B. Produksi Protein Rekombinan dan Vaksin Berbasis Mikroba

### 1. Prinsip dasar produksi protein rekombinan

Protein merupakan molekul yang penting dalam berbagai bidang termasuk produksi enzim, penelitian biologi, industri pangan maupun farmasi. Protein terapeutik seperti insulin, hormon pertumbuhan, dan antibodi monoklonal telah menjadi komponen utama dalam pengobatan berbagai macam penyakit termasuk diabetes, gangguan imunologi, hingga kanker. Kebutuhan protein dalam jumlah besar dengan kualitas tinggi tidak

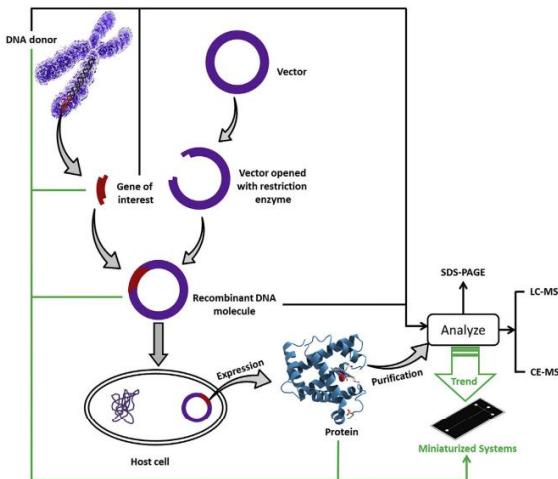
dapat terpenuhi hanya melalui ekstraksi dari sumber alami baik jaringan hewan dan tumbuhan. Teknologi rekayasa genetika yang diperkenalkan sejak 1972 (Cohen et al., 1973), menawarkan solusi produksi protein pada sel inang heterogen.

Keuntungan memproduksi protein menggunakan teknologi DNA rekombinan adalah (Gupta et al., 2016):

- a. Protein dapat dihasilkan melalui kloning dan ekspresi gen-gen manusia, sehingga meminimalkan resiko reaksi imun. Selain itu, aktivitas protein yang dihasilkan juga tinggi.
- b. Protein terapeutik dapat diproduksi secara efisien, dengan tetap menjaga efektivitas biaya.
- c. Protein rekombinan memimalisir risiko penularan pathogen yang tidak diketahui yang terdapat pada sumber hewan dan manusia.
- d. Protein dapat dimodifikasi dengan tepat untuk mendapatkan spesifitas yang lebih tinggi, waktu paruh yang lebih lama, fungsionalitas yang lebih baik.
- e. Teknologi DNA rekombinan memungkinkan terciptanya perubahan kritis agar mendapat protein dengan spesifitas dan aktivitas yang lebih baik.

Proses produksi protein rekombinan menggunakan rekayasa genetika mencakup beberapa tahapan mulai dari isolasi gen yang akan diinginkan hingga ekspresi protein pada sistem ekspresi heterogen yang sesuai. Gen yang telah diidentifikasi dan dikarakterisasi kemudian diisoasi dari organisme asal menggunakan teknik seperti *Polymerase Chain Reactin* (PCR) ataupun diproduksi melalui teknik sintesis gen buatan (Sambrook, 2001). Gen yang diharapkan tersebut atau disebut dengan *gene of interest* (GOI), kemudian dikloning dengan memasukkan ke dalam vektor ekspresi pada bagian situs restriksi (*multiple cloning site*/ MCS) menggunakan bantuan enzim restriksi dan enzim ligase, membentuk molekul DNA rekombinan (konstruk)ge. Insersi *gene of interest* pada

vektor menggunakan enzim restriksi (digesti), dapat dilakukan pada dua situs restriksi dengan menggunakan dua enzim yang berbeda atau disebut dengan *double digestion*. *Double digestion* memberikan keuntungan kesesuaian arah transkripsi gen, sehingga mengurangi kesalahan penyusunan polipeptida. Konstruk kemudian ditransformasikan ke dalam strain sel inang yang sesuai, setelah itu diinduksi agar dapat mengekspresikan protein yang diharapkan. Protein yang dihasilkan pada umumnya akan disimpan pada sitoplasma sebagai *inclusion bodies*, (khususnya pada *E. coli*). Pada beberapa kasus, protein tersebut diarahkan pada ruang perisplasma atau dalam beberapa kejadian langka diarahkan ke matriks ekstraseluler. Protein selanjutnya perlu dipurifikasi dan dikarakterisasi (meliputi sekruensi, kemurnian protein, integritas struktural, stabilitas, dan aktivitas protein) (Gambar 1) (Ahmad et al., 2018; Morbioli et al., 2016).



**Gambar 1.** Skema produksi protein rekombinan  
(Morbioli et al., 2016)

Pemilihan vektor ekspresi merupakan faktor kunci dalam keberhasilan ekspresi amplifikasi protein target. Banyak vektor ekspresi yang teredia, tetapi vektor ekspresi

yang paling umum digunakan adalah plasmid yang menganjumumlah elemen sekuen termasuk (i) *origin of replication* (ORI), (ii) promoter, (iii) *multiple cloning site*, (iv) tag afinitas, (v) terminator, dan (vi) penanda seleksi (seperti gen resistensi antibiotik). Pemilihan vektor memerlukan pemahaman yang baik mengenai fitur dan kegunaannya sesuai dengan karakteristik dari protein target. Salah satu parameter yang perlu dipertimbangkan adalah jumlah salinan (*copy number*). Vektor dengan *copy number* yang tinggi dapat menghasilkan banyak protein rekombinan di dalam sel, namun terkadang jumlah *copy number* yang tinggi tersebut dalam menurunkan laju pertumbuhan bakteri dengan memaksakan beban metabolisme pada bakteri tersebut (Ahmad et al., 2018).

## 2. Produksi vaksin berbasis mikroba

Teknologi protein rekombinan saat ini banyak dikembangkan untuk memproduksi berbagai jenis vaksin yang berbasis mikroba. Vaksin berbasis mikroba dapat diklasifikasikan menjadi beberapa jenis, salah satunya adalah vaksin protein rekombinan. Vaksin ini dibuat dengan mengekspresikan antigen pathogen dalam sistem ekspresi mikroba. Teknologi ini memungkinkan produksi antigen yang aman karena tidak mengandung materi genetik virus atau bakteri penyebab penyakit secara utuh, sehingga lebih aman dibandingkan dengan vaksin konvensional yang menggunakan virus atau bakteri yang dilemahkan (*attenuated vaccine*) (Roldão et al., 2010).

Vaksin protein rekombinan menggunakan fragmen protein spesifik (subunit protein) dari patogen (virus atau bakteri) yang telah direkayasa secara genetik. Sekuen dari fragmen tersebut dapat diproduksi secara sintetik tanpa mengambil dari patogen secara langsung. Mikroba sebagai sel inang digunakan sebagai pabrik produksi untuk menghasilkan antigen dalam jumlah besar. Contoh vaksin berbasis protein rekombinan yang telah digunakan secara luas antara lain:

- a. Vaksin Hepatitis B:  
Vaksin Hepatitis B menggunakan antigen *HBsAg* yang diproduksi dalam sistem eksresi *S. cerevisiae* (Mahmood et al., 2023).
  - b. Vaksin HPV (*Human Papilovirus*)  
Vaksin HPV seperti *Gardasil* dan *Cervarix*, memanfaatkan protein capsid L1 yang diekspresikan dalam sistem ekspresi yeast *S. cerevisiae* (Schiller & Lowy, 2012).
  - c. Vaksin Novavax untuk Covid-19  
Salah satu vaksin untuk Covid-19 yang mendapat persetujuan WHO adalah Novavax. Vaksin ini menggunakan sekuen subunit protein *spike* virus SARS-CoV-2 yang diproduksi dalam sistem ekspresi serangga menggunakan sel Sf9 (Funk et al., 2020; Islam, 2023).
3. Organisme sel inang yang digunakan
- Beberapa mikroorganisme yang dapat digunakan sebagai sistem inang/host antara lain bakteri, yeast, jamur berfilamen, dan alga uniseluler. Pemilihan organisme bergantung pada protein yang diinginkan, dengan keunggulan dan kelemahannya masing-masing. Misalnya, pada produksi protein yang membutuhkan modifikasi pasca-translasi (seperti glikosilasi protein), maka sistem ekspresi prokariotik menjadi tidak cocok (Sahdev et al., 2008).
- Host paling sederhana digunakan untuk sistem rekombinan adalah sistem bakteri prokariotik. Pada tahun 1980-an, obat rekombinan pertama yang disetujui oleh FDA adalah human insulin (Humulin-US). Protein ini diperoleh melalui proses rekayasa secara genetik untuk mengobati diabetes. Protein rekombinan yang disetujui FDA diperoleh dari *E. coli* atau prokariota lainnya, seperti *S. cerevicease* (Gupta et al., 2016).

Keuntungan dalam menggunakan *E. coli* sebagai sel inang sudah banyak diketahui dengan baik, antara lain (Ahmad et al., 2018; Rosano & Ceccarelli, 2014):

- a. Bakteri *E. coli* memiliki kinetika pertumbuhan yang baik. Pada media glukosa-garam dan dengan kondisi lingkungan yang optimal, waktu penggadaan yang dibutuhkan oleh bakteri ini adalah sekitar 20 menit. Hal ini menunjukkan bahwa kultur yang diinokulasikan dengan pengenceran 1/100 kultur starter jenuh dapat mencapai fase stasioner hanya dalam beberapa jam. Namun perlu dipahami, bahwa ekspresi protein rekombinan dapat memberikan beban metabolismis pada mikroba, yang dapat menyebabkan penurunan waktu generasi yang cukup besar.
- b. Kultur dengan kepadatan sel yang tinggi mudah dicapai.
- c. Media kompleks yang kaya (*rich complex media*) dapat dibuat dari komponen yang tersedia dan murah.
- d. Transformasi menggunakan DNA eksogen relatif mudah dan cepat. Transformasi plasmid pada *E. coli* dapat dilakukan dalam waktu hanya 5 menit.
- e. Secara genetik, fisiologis dan metabolisme telah dikarakterisasi dengan baik, mengasilkan sejumlah besar strain yang tersedia sebagai vektor kloning maupun ekspresi.

Terdapat puluhan kandidat strain *E. coli* yang tersedia dan cocok untuk digunakan sebagai sel host. Semuanya memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing, dimana strain tertentu mungkin hanya dapat digunakan pada situasi yang spesifik. Namun, dalam percobaan pertama ekspresi protein, strain *E. coli* BL21(DE3) dan beberapa turunan K-12 menjadi strain yang sangat direkomendasikan. Strain BL21 dan turunannya masih menjadi strain yang paling banyak digunakan hingga saat ini. Strain BL21 merupakan strain dengan defisiensi Lon protease, yang mampu mendegradasi banyak protein asing. Selain itu, pada strain ini tidak memiliki gen

yang mengkode protease membran luar OmpT, yang berfungsi mendegradasi protein ekstraseluler. Strain BL21 berasal dari turunan *E. coli*. B yang mengalami mutasi *hsdSB*. Mutasi ini menyebabkan tidak adanya aktivitas restriksi DNA asing pada strain ini, sehingga kemungkinan hilangnya plasmid setelah transformasi (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Strain AD494 dan OrigamiTM yang mengalami mutasi *trxB* (*thioredoxin reductase*), sehingga pembentukan ikatan disulfide pada sitoplasma dapat ditingkatkan. Strain OrigamiTM juga kekurangan gen glutathione reductase. Strain lain yang banyak digunakan adalah dari repertoire K-12 yaitu HMS174, yang memiki mutasi *recA*, yang menjaga stabilitas plasmid (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Selain *E. coli*, terdapat beberapa mikroba lain yang dilaporkan mampu digunakan dalam sistem ekspresi protein rekombinan seperti *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., dan *Brevibacillus chosinensis*. Perkembangan sistem ekspresi dengan *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* sp. dan *Halomonas* sp. juga banyak dikembangkan. Pada sistem eukariotik selain *S. cereviciae*, *Pichia pastoris* ataupun *Aspergillus* cocok digunakan dalam memproduksi protein yang sekresi. Sebagai host yeast nonkonvensional *Yellowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, dan *Hansenula polymorpha* juga dianggap sebagai kerangka mikroba yang potensial dalam industri, karena pertumbuhan yang cepat pada kondisi kultur yang sederhana (Ojima-Kato, 2024).

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., ur Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., & Patching, S. G. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 144, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240–3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>
- Delanghe, J. R., Bollen, M., & Beullens, M. (2008). Testing for recombinant erythropoietin. *American Journal of Hematology*, 83(3), 237–241. <https://doi.org/10.1002/ajh.21081>
- Funk, C. D., Laferrière, C., & Ardakani, A. (2020). A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 937. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00937>
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2016). Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 77–101. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_4)
- Islam, Md. A. (2023). A review of SARS-CoV-2 variants and vaccines: Viral properties, mutations, vaccine efficacy, and safety. *Infectious Medicine*, 2(4), 247–261. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2023.08.005>
- Mahmood, F., Xu, R., Awan, M. U. N., Song, Y., Han, Q., Xia, X., Wei, J., Xu, J., Peng, J., & Zhang, J. (2023). HBV Vaccines: Advances and Development. *Vaccines*, 11(12), 1862. <https://doi.org/10.3390/vaccines11121862>
- Morbioli, G. G., Mazzu-Nascimento, T., Aquino, A., Cervantes, C., & Carrilho, E. (2016). Recombinant drugs-on-a-chip: The usage of capillary electrophoresis and trends in miniaturized

- systems – A review. *Analytica Chimica Acta*, 935, 44–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.019>
- Ojima-Kato, T. (2024). Advances in recombinant protein production in microorganisms and functional peptide tags. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 89(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1093/bbb/zbae147>
- Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176.  
<https://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1), 249–264.  
<https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>
- Sambrook, J. (with Internet Archive). (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.  
[http://archive.org/details/molecularcloning0000samb\\_p7p5](http://archive.org/details/molecularcloning0000samb_p7p5)
- Schiller, J. T., & Lowy, D. R. (2012). Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 681–692.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2872>
- Seresht, A. K., Cruz, A. L., de Hulster, E., Hebly, M., Palmqvist, E. A., van Gulik, W., Daran, J.-M., Pronk, J., & Olsson, L. (2013). Long-term adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the burden of recombinant insulin production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(10), 2749–2763.  
<https://doi.org/10.1002/bit.24927>

## BIODATA PENULIS



**Nurina Tahta Afwi Maulina, S.Si., M.Biotech.** lahir di Temanggung, pada 04 November 1997, menempuh pendidikan S1 di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada dan pendidikan S2 di Program Studi Bioteknologi Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Saat ini penulis bekerja sebagai Dosen di Program Studi S1 Bioteknologi, Fakultas Sains dan Matematika di Universitas Diponegoro.

# BAB 9

## Produksi Asam Organik, Enzim, dan Antibiotik

\*Siti Roswiyah Yulyani, S.Si., M.Biotech\*

### A. Pendahuluan

Mikroorganisme memiliki peran krusial dalam menghasilkan berbagai metabolit yang bermanfaat di berbagai sektor, termasuk industri, pangan, farmasi dan kesehatan dan lingkungan. Pemanfaatan mikroorganisme sebagai sumber produksi metabolit telah berkembang pesat karena menawarkan berbagai keunggulan dibandingkan metode sintesis kimia atau ekstraksi dari sumber alami lainnya. Beberapa keunggulan utama dalam produksi metabolit berbasis mikroorganisme antara lain:

1. Kemampuan menghasilkan metabolit dalam jumlah besar dalam waktu relatif singkat.
2. Pemanfaatan substrat murah, seperti limbah industri atau pertanian, sehingga lebih ekonomis dan berkelanjutan.
3. Kontrol proses produksi yang lebih mudah, memungkinkan produksi skala industri dengan kualitas yang konsisten.
4. Kemampuan menghasilkan beragam metabolit sekunder melalui rekayasa genetika, yang membuka peluang untuk meningkatkan efisiensi dan spesifisitas produk.
5. Mengurangi ketergantungan pada sumber daya alam yang terbatas, sehingga lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan.

Metabolit yang dihasilkan melalui bioteknologi mikroba meliputi asam organik, asam amino, enzim, vitamin, serta protein sel tunggal. Bab ini akan membahas produksi tiga

metabolit melalui pendekatan bioteknologi mikroba yaitu asam organik, enzim dan antibiotik.

## B. Produksi Asam Organik, Enzim, dan Antibiotik

### 1. Produksi Asam Organik

#### a. Jenis Asam Organik

Asam organik merupakan senyawa organik yang mengandung gugus karboksil (-COOH) yang memberikan sifat keasaman pada senyawa tersebut. Berbagai jenis asam organik telah banyak diproduksi melalui bioteknologi mikroba karena permintaannya yang tinggi di berbagai industri. Beberapa jenis asam organic yang umum dihasilkan melalui fermentasi mikroba meliputi asam sitrat, asam laktat, asam fumarat, dan asam glukonat (Yadav *et al.*, 2022).

Asam sitrat ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) pertama kali ditemukan oleh Carl Wilhelm Scheele pada tahun 1874. Senyawa ini bersifat tidak berwarna, tidak berbau, memiliki rasa asam, serta mudah larut dalam air. Secara alami, asam sitrat ditemukan sebagai metabolit dalam berbagai organisme, termasuk tumbuhan, hewan, dan beberapa jenis bakteri. Saat ini, produksi asam sitrat secara industri banyak dilakukan melalui fermentasi menggunakan mikroorganisme seperti *Aspergillus niger*.

Asam laktat ( $C_3H_6O_3$ ) pertama kali diidentifikasi oleh Carl Willhelm Scheele pada tahun 1780 dari susu asam. Asam laktat memiliki kelarutan tinggi dalam air, tidak berwarna dalam bentuk larutan, serta berbentuk tepung putih dalam bentuk padatan. Senyawa ini memiliki rasa asam yang khas dan hampir tidak berbau. Dalam industri, asam laktat diproduksi oleh bakteri asam laktat dan digunakan dalam berbagai aplikasi, termasuk industri pangan, farmasi, dan bioplastik.

Asam fumarat ( $C_4H_4O_4$ ) pertama kali diisolasi dari tanaman *Fumaria officinalis* dan dikenal sebagai kristal tidak berwarna dengan sifat mudah terbakar. Secara konvensional, asam fumarat diproduksi melalui proses

petrokimia, tetapi produksi berbasis mikroorganisme menggunakan *Rhizopus oryzae* semakin dikembangkan untuk mendukung proses yang lebih ramah lingkungan.

Asam glukonat ( $C_6H_{12}O_7$ ) pertama kali ditemukan oleh Hlasiwetz dan Haberman pada tahun 1870. Senyawa ini merupakan asam karbosiklik yang dihasilkan melalui oksidasi karbon pertama dari glukosa. Asam glukonat berbentuk padatan putih, bersifat larut dalam air, dan memiliki tingkat keasaman sedang (Ghai *et al.*, 2022). Produksi asam glukonat secara industri umumnya menggunakan fermentasi mikroorganisme dengan *A. niger* atau *Gluconobacter* sp., yang banyak dimanfaatkan dalam industri pangan, farmasi, dan tekstil.

b. Mikroorganisme penghasil asam organik

Berbagai jenis mikroorganisme, termasuk bakteri, kapang, dan khamir, telah banyak dimanfaatkan dalam produksi asam organik secara bioteknologi. Diantara banyak mikroorganisme yang mampu menghasilkan asam organik, *Aspergillus niger* dan khamir *Saccharomyces* sp. merupakan dua spesies utama yang digunakan dalam produksi asam sitrat secara komersil. *A. niger*, kapang hitam yang umum digunakan dalam fermentasi industri, menjadi pilihan utama karena kemampuannya dalam mengonversi bahan organik menjadi asam sitrat dengan efisiensi tinggi. Beberapa faktor yang menjadikan *A. niger* unggul dalam produksi asam sitrat meliputi kemudahan pengendalian proses fermentasi, tingginya hasil produksi, serta kemungkinan peningkatan produktivitas melalui seleksi strain dan mutagenesis. Selain itu, sumber karbon yang digunakan dalam fermentasi oleh kapang ini mudah diperoleh dan relatif ekonomis. Molase, terutama yang berasal dari bit atau tebu dengan kandungan sukrosa tinggi, merupakan substrat utama dalam produksi asam sitrat (Ghai *et al.*, 2022).

Dalam produksi asam laktat, baik bakteri maupun kapang dapat digunakan sebagai agen fermentasi, masing-masing dengan kelebihan dan kekurangannya. Bakteri utama yang digunakan dalam produksi asam laktat adalah kelompok bakteri asam laktat (BAL), yang merupakan bakteri Gram-positif. Namun, salah satu tantangan dalam produksi asam laktat menggunakan BAL adalah meningkatnya biaya produksi, karena bakteri ini membutuhkan sumber nutrisi kompleks untuk pertumbuhan optimal. Beberapa strain bakteri yang memiliki keunggulan dalam menekan biaya produksi asam laktat berasal dari genus *Bacillus* seperti *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, dan *Bacillus* sp. Selain bakteri, kapang dari genus *Rhizopus*, khususnya *Rhizopus oryzae*, juga digunakan dalam produksi asam laktat. *R. oryzae* memiliki beberapa keunggulan dibandingkan BAL, termasuk kemampuan katalitik yang tinggi, produksi biomassa kapang yang dapat dimanfaatkan sebagai produk sampingan fermentasi, serta biaya produksi dan kebutuhan nutrisi yang lebih rendah (Bai *et al.*, 2008).

Produksi asam fumarat umumnya menggunakan kapang dari genus *Rhizopus*, yang mampu menghasilkan asam fumarat baik dalam kondisi aerob maupun anaerob. Sementara itu, produksi asam glukonat dapat dilakukan oleh berbagai kelompok mikroorganisme, termasuk bakteri seperti *Acetobacter aceti*, *Pseudomonas* sp., dan *Gluconobacter* sp., serta kapang seperti *A. niger*, *A. foetidus*, *Candida tenuis*, *Tricholoma robustum*, *Talaromyces flavus*, dan *Penicillium notatum*.

c. Metode fermentasi dalam produksi asam organik

Proses fermentasi dalam produksi asam organik dapat dilakukan melalui beberapa metode, yaitu fermentasi permukaan (*surface fermentation*), fermentasi terendam (*submerged fermentation*), dan fermentasi padat (*solid-state fermentation*). Pemilihan metode fermentasi

bergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan, sifat substrat, serta efisiensi produk yang diinginkan.

1) Fermentasi Permukaan (*Surface fermentation*)

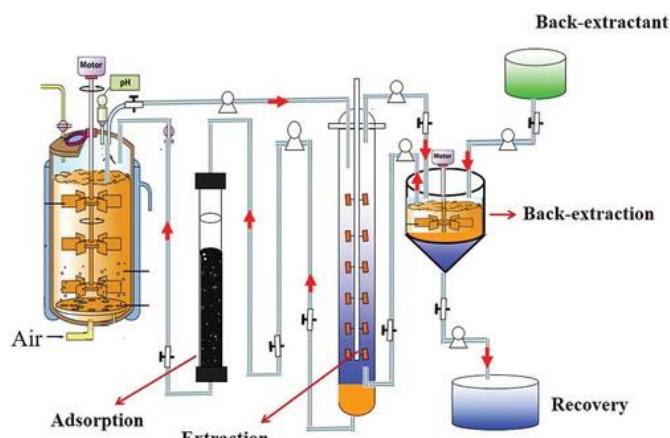
Fermentasi permukaan merupakan metode dimana larutan kultur ditempatkan dalam wadah dengan kapasitas 50-100liter, yang terbuat dari aluminium berkualitas tinggi atau baja tahan karat. Wadah-wadah ini disusun dalam rak kokoh untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Sumber karbon yang umum digunakan dalam metode ini meliputi sukrosa murni, sirup tebu, atau molase dari bit.

Pada fermentasi ini, *A. niger* akan tumbuh di permukaan medium dan membentuk miselium. Proses fermentasi berlangsung dalam ruang dengan sirkulasi udara yang optimal untuk menjaga suhu dan kelembaban tetap stabil. Selain itu, kondisi lingkungan harus dipertahankan dalam keadaan aseptik, terutama selama dua hari pertama ketika spora mulai berkecambah (Yadav *et al.*, 2022). Ketepatan dalam pengendalian kondisi ini sangat penting untuk memastikan keberhasilan fermentasi.

2) Fermentasi Terendam (*Submerged Fermentation* atau SmF)

SmF merupakan metode yang paling umum digunakan dalam produksi asam sitrat secara industri (Gambar 11.1). Diperkirakan sekitar 80% dari total produksi asam sitrat global dihasilkan melalui metode ini, karena keunggulannya dalam efisiensi produksi yang lebih tinggi serta biaya tenaga kerja yang lebih rendah dibandingkan metode lainnya.

Dalam fermentasi terendam, mikroorganisme tumbuh dan menghasilkan metabolit dalam medium air yang teraduk secara konstan. Dua jenis fermentor utama yang digunakan dalam metode ini adalah fermentor berpengaduk konvensional dan fermentor menara. Fermentor berpengaduk dilengkapi dengan sistem pengadukan untuk memastikan homogenitas medium, sementara fermentor menara memiliki sistem aerasi yang dirancang untuk mempertahankan kadar oksigen terlarut tetap optimal selama fermentasi berlangsung. Pengendalian parameter fermentasi, seperti kadar oksigen, suhu, dan pH, sangat penting untuk memastikan produksi asam organik yang maksimal (Yadav *et al.*, 2022)



Gambar 11.1. Produksi asam organik dengan metode SmF (Qing Xu *et al.*, 2016)

3) Fermentasi Padat (*Solid-State Fermentation* atau SSF)

Fermentasi padat merupakan metode yang memanfaatkan substrat padat sebagai medium pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini sering menggunakan bahan baku dari limbah agroindustry sebagai substrat fermentasi, menjadikannya lebih ramah lingkungan dan ekonomis.

Dalam fermentasi padat, substrat biasanya dilembabkan hingga kadar air sekitar 70%, tergantung pada kemampuan substrat dalam menyerap air. Proses fermentasi berlangsung dalam kisaran pH awal yaitu 4,5 - 6 dengan suhu inkubasi antara 28 - 30°C (Yadav *et al.*, 2022). Salah satu keunggulan utama metode SSF adalah tidak memerlukan praperlakuan, sehingga proses produksi menjadi lebih efisien dan sederhana dibandingkan metode fermentasi lainnya.

d. Aplikasi Asam Organik

Asam organik digunakan di banyak bidang termasuk di bidang pangan, farmasi dan kesehatan serta lingkungan. Asam sitrat, asam laktat, dan asam asetat sering digunakan sebagai pengawet alami untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dalam makanan (Kumar *et al.*, 2020), memberikan rasa asam yang menyegarkan serta mengatur pH produk dalam industri minuman ringan, produk susu, dan permen (Pundir and Jain, 2021). Selain itu, asam laktat berperan penting dalam fermentasi produk seperti yogurt, keju, asinan, dan roti, yang meningkatkan umur simpan serta manfaat kesehatan produk (Liu *et al.*, 2018). Dalam industri farmasi dan kesehatan, asam glukonat dan asam sitrat digunakan sebagai bahan tambahan dalam formulasi obat untuk meningkatkan penyerapan mineral seperti kalsium dan zat besi (Gupta *et al.*, 2017), selain itu asam sitrat juga digunakan sebagai agen penyanga dalam formulasi berbagai obat untuk menstabilkan pH dan meningkatkan kelarutan zat aktif (Jiang *et al.*, 2019). Dalam industri pertanian, asam fumarat dan asam laktat memiliki sifat antimikroba yang dapat digunakan dalam perlindungan tanaman terhadap patogen (Palaniyandi *et al.*, 2020). Adapun di bidang lingkungan, asam organik berperan sebagai biosurfaktan dalam pembersih industri dan deterjen ramah lingkungan (Singh *et al.*, 2017).

## 2. Produksi Enzim

### a. Jenis enzim industri dari mikrobia

Enzim merupakan biomolekul berbasis protein yang disintesis dalam bentuk intraseluler maupun ekstraseluler oleh berbagai organisme, termasuk mikroorganisme. Enzim memiliki peran utama sebagai biokatalis yang mempercepat reaksi biokimia dengan tingkat spesifitas yang tinggi, sehingga mampu meningkatkan efisiensi reaksi secara signifikan.

Dalam industri, mayoritas enzim diperoleh dari mikroorganisme karena beberapa keunggulan, antara lain: a) dapat diproduksi dalam skala besar dengan biaya produksi yang lebih rendah dibandingkan sumber lainnya, b) proses ekstraksi dan pemurnian lebih sederhana dibandingkan dengan enzim dari tumbuhan atau hewan, c) memiliki tingkat produksi yang lebih tinggi sehingga lebih efisien untuk kebutuhan industri, dan d) dapat dimodifikasi secara genetik untuk meningkatkan hasil produksi dan stabilitas enzim (Sikdar *et al.*, 2023).

Beberapa jenis enzim mikrobia yang telah banyak digunakan dalam skala industri meliputi amilase, lipase, xilanase, katalase, pektinase, protease, ligninase, dan esterase. Enzim-enzim ini memiliki aplikasi luas dalam berbagai sektor, termasuk industri pangan, farmasi, tekstil dan bioremediasi.

### b. Mikroorganisme penghasil enzim

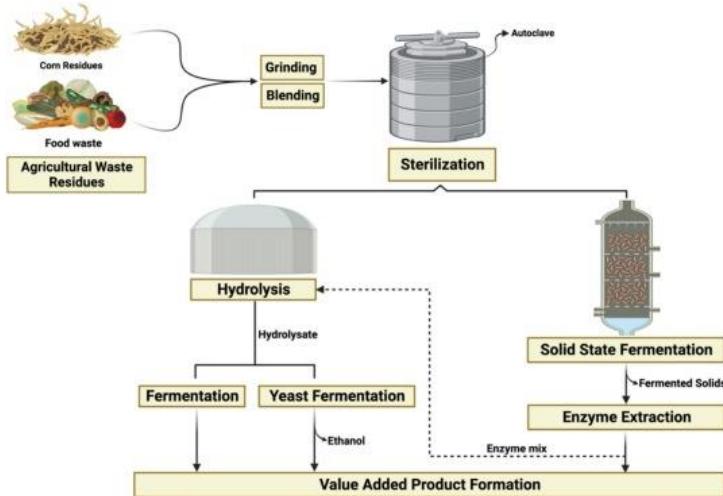
Mikroba seperti bakteri, kapang, dan khamir banyak digunakan karena pertumbuhannya yang cepat, kemampuan menghasilkan enzim dalam jumlah besar, serta kemudahan manipulasi genetik untuk meningkatkan hasil produksi (Sikdar *et al.*, 2023). Bakteri penghasil enzim meliputi *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp. dan *Lactobacillus* spp. Sementara itu kapang penghasil enzim meliputi: *A. niger*, *R. oryzae*, *Trichoderma reesei*, dan *Penicillium* spp. Selain itu, khamir

juga menjadi sumber enzim industri yang meliputi: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, dan *Yarrowia lipolytica* (Cavalcante *et al.*, 2021)

c. Proses produksi enzim

Dalam industri bioteknologi, fermentasi terendam (*submerged fermentation, SmF*) lebih banyak digunakan dibandingkan dengan fermentasi substrat padat (*solid-state fermentation, SSF*) karena menghasilkan produktivitas enzim yang lebih tinggi serta memiliki tingkat kontaminasi yang lebih rendah (Gambar 11.2). SmF memungkinkan kontrol proses yang lebih baik, termasuk parameter seperti pH, suhu, kadar oksigen terlarut, serta kesediaan nutrisi, sehingga meningkatkan efisiensi produksi enzim.

Enzim yang dihasilkan dari fermentasi dapat berupa enzim intraseluler maupun enzim ekstraseluler, tergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan. Umumnya, bakteri menghasilkan enzim intraseluler yang tersimpan di dalam sel, sehingga proses ekstraksi memerlukan tahap tambahan seperti lisis sel untuk memperoleh enzim. Sebaliknya, kapang lebih sering menghasilkan enzim ekstraseluler yang diselekresikan ke dalam medium fermentasi, sehingga pemulihannya lebih mudah karena dapat langsung diisolasi dari cairan kultur tanpa menghancurkan sel mikroorganisme. Pendekatan ini menjadikan enzim ekstraseluler lebih disukai dalam berbagai aplikasi industri karena kemudahan dalam pemurnian dan pemanfaatannya.



Gambar 11.2 Produksi enzim mikroba dengan metode SSF (Khaswal *et al.*, 2024)

d. Aplikasi enzim dari mikroba

Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki peran penting dalam berbagai sektor industri. Berikut adalah beberapa aplikasi utama enzim mikroba dalam berbagai bidang:

- 1) Pengolahan limbah industri: Enzim mikroba berperan dalam menurunkan BOD (*biochemical oxygen demand*) dan COD (*chemical oxygen demand*) pada limbah cair, mengurangi bau, serta mendegradasi polutan beracun dalam pengelolaan limbah dan air limbah.
- 2) Industri tekstil: Enzim seperti selulase, pektinase, esterase, dan lipase digunakan dalam proses *biopolishing* dan *bioscouring*, penyempurnaan denim, pelunakan kapas, penyelesaian wol, penghilangan kanji, serta modifikasi serat sintetis untuk meningkatkan kualitas tekstil.
- 3) Industri kertas dan pulp: Enzim xilanase, selulase, dan ligninase membantu meningkatkan kelembutan kertas, mempercepat proses pemisahan tinta

(deinking), serta mengurangi jumlah limbah dalam produksi pulp dan kertas.

- 4) Industri kulit: Enzim lipase dan protease digunakan dalam proses perendaman, pembersihan, penghilangan rambut, pelunakan, dan penghilangan lemak untuk meningkatkan kualitas kulit.
- 5) Industri roti: enzim seperti lipase, xilanase, dan amilase berperan dalam meningkatkan kualitas tekstur, kelembaban, dan kelembutan roti.
- 6) Industri minuman: Enzim katalase, amilase, dan pektinase digunakan dalam meningkatkan hasil produksi jus, memperjelas tampilan minuman, serta meningkatkan efisiensi produksi, menjadikannya lebih ekonomis.
- 7) Industri produk olahan susu: enzim seperti lipase, laktase, esterase dan katalase dimanfaatkan untuk meningkatkan karakteristik sensorik, hasil produksi, masa simpan, dan keamanan produk olahan susu.

### 3. Produksi Antibiotik

- a. Jenis antibiotik dan mikroorganisme penghasilnya  
Antibiotik merupakan metabolit sekunder dengan berat molekul rendah yang diproduksi oleh mikroorganisme dan berfungsi untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Antibiotik yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki berbagai jenis dan mekanisme kerja yang berbeda.

Berikut adalah beberapa jenis antibiotic yang dihasilkan oleh mikroorganisme berdasarkan mekanisme kerjanya:

- 1) Inhibitor sintesis dinding sel: penisilin (dihasilkan oleh *Penicillium* spp), sefalosporin (dihasilkan oleh *Acremonium* spp.), dan basilisin (dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*).
- 2) Penghambat sintesis protein: streptomisin (dihasilkan oleh *Streptomyces griseus*), tetrasiiklin (dihasilkan oleh *Streptomyces aureofaciens*), kloramfenikol (dihasilkan

- oleh *Streptomyces venezuelae*), da eritromisin (dihasilkan oleh *Saccharopolyspora erythraea*)
- 3) Penghambat sintesis asam nukleat: rifampisin (dihasilkan oleh *Amycolatopsis rifamycinica*), dan actinomycin D (dihasilkan oleh *Streptomyces spp.*)
  - 4) Pengganggu membran sel: polimiksin (dihasilkan oleh *Bacillus polymyxa*) dan daptomisin (dihasilkan oleh *Streptomyces roseosporus*)

Mikroorganisme seperti *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium*, dan *Acremonium* menjadi sumber utama produksi antibiotik alami yang telah banyak dimanfaatkan dalam bidang medis dan industri farmasi.

b. Proses produksi antibiotik

Dalam skala industri, antibiotik diproduksi melalui fermentasi padat (*solid state fermentation, SSF*) dengan bantuan mikroorganisme atau fermentasi terendam (*submerged fermentation, SmF*). Proses produksi antibiotik terdiri dari beberapa tahapan utama (gambar 11.3) meliputi:

- 1) Isolasi dan seleksi mikroorganisme target.  
Mikroorganisme penghasil antibiotik diisolasi dari lingkungan atau diperoleh dari koleksi kultur mikroba. Seleksi dilakukan berdasarkan kapasitas produksi antibiotik yang tinggi dan kestabilan strain dalam kondisi fermentasi industri.
- 2) Penyediaan media fermentasi  
Media fermentasi diformulasikan untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme dan biosintesis antibiotik. Komponen utama media meliputi sumber karbon, sumber nitrogen, dan faktor pertumbuhan serta mineral.
- 3) Fermentasi dan produksi antibiotik  
Sebelum fermentasi utama, suspensi mikroorganisme penghasil antibiotik dipersiapkan di laboratorium dengan menambahkan faktor pertumbuhan dalam jumlah kecil. Kultur kemudian dipindahkan ke tangki

pemula (seed tank), yang dilengkapi dengan sistem pencampur dan suplai udara steril untuk meningkatkan pertumbuhan mikroba. Setelah satu hari, kultur ini dipindahkan ke tangki fermentasi utama, yang terbuat dari stainless steel dan dilengkapi dengan motor, aerator, pengaduk, serta sistem kontrol pH dan suhu untuk mempertahankan kondisi optimal selama proses fermentasi.

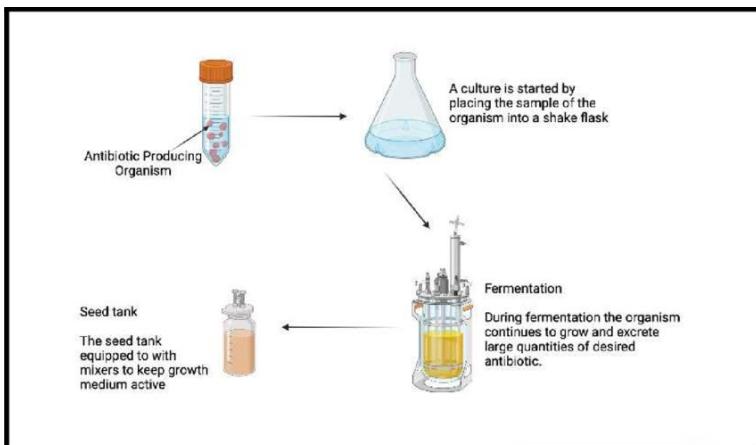
4) Isolasi dan pemurniaan antibiotik

Antibiotik yang dihasilkan selama fermentasi dapat diekstraksi dari medium menggunakan teknik pertukaran ion atau ekstraksi pelarut. Produk yang telah diekstraksi kemudian dikristalkan menjadi bentuk bubuk dengan bantuan agen kimia organik. Tahapan pemurnian lanjutan dilakukan untuk memperoleh antibiotik dengan tingkat kemurnian yang tinggi.

5) Pengujian dan kontrol kualitas

Pada setiap tahap produksi, dilakukan pengujian kualitas antibiotik untuk memastikan kemurnian, potensi aktivitas antimikroba, dan keamanan produk akhir sebelum digunakan dalam industri farmasi.

Dalam keseluruhan proses, glukosa memainkan peran penting sebagai sumber karbon utama. Glukosa dikonsumsi terlebih dahulu untuk mempercepat pertumbuhan sel, sementara produksi antibiotik terjadi setelah glukosa habis dan mikroorganisme mulai menggunakan sumber karbon alternatif. Oleh karena itu, pengaturan kadar glukosa dalam medium fermentasi sangat penting untuk mengoptimalkan produksi antibiotik oleh mikroorganisme.



Gambar 3. Produksi antibiotik (Snape, 2023)

c. Aplikasi antibiotik dari mikroba

Antibiotik memiliki peran penting dalam berbagai bidang, tidak hanya dalam kesehatan manusia tetapi juga dalam industri pangan, pertanian, dan lingkungan. Berikut adalah beberapa aplikasi utama antibiotik:

1) Bidang Kesehatan dan kedokteran.

Antibiotik seperti penisilin, sefalosporin, dan makrolida digunakan untuk mengobati berbagai infeksi, seperti pneumonia, meningitis, dan infeksi saluran kemih (Ventola, 2015) dan antibiotik profilaksis untuk mencegah infeksi bakteri pada pasien yang menjalani operasi besar sering (Bratzler *et al.*, 2013). Selain itu, antibiotik digunakan dalam kombinasi untuk mengobati penyakit kompleks seperti tuberculosis dan infeksi akibat bakteri multi-resisten (Fair and Tor, 2014).

2) Industri pangan dan peternakan

Antibiotik seperti nisin digunakan dalam industri makanan untuk mencegah pertumbuhan bakteri patogen dalam produk olahan susu dan daging (Cotter *et al.*, 2013). Selain itu, beberapa antibiotik digunakan sebagai promotor pertumbuhan dalam pakan ternak untuk meningkatkan efisiensi

pencernaan dan produksi daging, meskipun penggunaannya mulai dibatasi karena risiko resistensi antibiotik (Van Boeckel *et al.*, 2015).

3) Bidang pertanian

Antibiotik seperti streptomisin dan tetrasiklin digunakan untuk melawan infeksi bakteri yang menyerang tanaman hortikultura dan pertanian (McManus *et al.*, 2002).

4) Bidang lingkungan dan bioteknologi

Antibiotik dapat digunakan dalam proses bioremediasi untuk mengontrol mikroorganisme patogen dalam air limbah dan tanah yang terkontaminasi (Davies and Davies, 2010). Selain itu, beberapa antibiotik telah dimanfaatkan dalam teknologi biosensor untuk mendeteksi keberadaan bakteri patogen dalam sampel lingkungan (Rhouma *et al.*, 2016).

## DAFTAR PUSTAKA

- Ashutosh Khaswal, S. K. (2024). Microbial enzyme production: Unlocking the potential of agricultural and food waste through solid-state fermentation. *Bioresource Technology Reports*.
- Bratzler, D. W. (2013). Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 70(3), 195-283.
- Cavalcante, F. T. (2021). Yarrowia lipolytica as a source of industrial enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2), 567-583.
- Cotter, P. D. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? . *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105.
- Debosmita Sikdar, I. K. (2022). Microbial Enzymes: A Summary Focusing on Biotechnology Prospective for Combating Industrial Pollutants. *BIOSANGAM*, 70-76.
- Fair, R. J. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 25-64.
- Gupta, S. T. (2017). Role of citric and gluconic acid in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(10), 853-3861.
- Jiang, L. W. (2019). Citric acid as a pharmaceutical buffer: Mechanism and applications. . *Pharmaceutical Research*, 36(2), 76-83.
- Kumar, P. M. (2020). Organic acids as natural food preservatives: Mechanisms and applications. *Food Chemistry*, 330.
- Liu, S. Q. (2018). Lactic acid in fermented food and its health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(7), 1152-1161.
- McManus, P. S. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 443-465.
- Poonam Yadav, A. K. (2022). Organic acids: microbial sources, production, and applications. In S. W. ram B. Sigh,

- Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-communicable Diseases* (pp. 325 - 337). India: Elsevier.
- Qing Xu, S. H. (2017). Extractive fermentation for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Separation Science and Technology*.
- Rhouma, M. B. (2016). Biosensors as an alternative for the screening of antibiotic residues in meat and milk products: A review. . *Food Control*, 70, 174-184.
- singh, A. (2021). Antibiotic Production From Lignocellulose Waste Materials. *International Journal of Innovations in Engineering Research and Technology*.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.

## BIODATA PENULIS



**Siti Roswiyah Yulyani, S.Si., M.Biotech** lahir di Tanjung pandan, pada 3 Juli 1993. Menyelesaikan pendidikan S1 Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada dan Pendidikan S2 di program studi Magister Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Sampai saat ini penulis sebagai dosen tetap di Program Studi S1-Bioteknologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

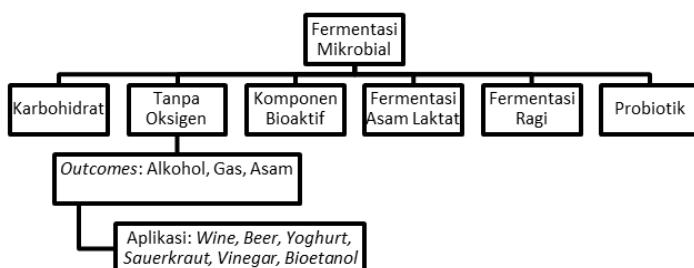
# BAB 10

## Fermentasi Alkohol dan Asam Laktat

\* Dra. Elisabeth Natalia Barung, M.Kes., Apt.\*

### A. Pendahuluan

Fermentasi merupakan proses alami yang telah dikenal dan telah digunakan oleh manusia selama ribuan tahun dengan tujuan utama membuat minuman beralkohol, roti dan produk sampingannya (Maicas, 2020). Fermentasi mikrobial merupakan proses metabolisme karbohidrat, misalnya yang berasal dari gula,ereal, atau makanan apapun yang terbuat dari karbohidrat menjadi alkohol, gas, atau asam pada lingkungan tanpa adanya oksigen. Fermentasi digunakan untuk produksi berbagai makanan dan minuman, pengawetan makanan, meningkatkan rasa, meningkatkan tekstur, serta menyediakan keragaman nutrisi (Praveen & Brogi, 2025), termasuk produksi bahan bakar (biomassa/bioethanol) (Eliodório et al., 2019; Moede et al., 2017). Contoh proses fermentasi dan produk yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 1.



**Gambar 1.** Bagan alir fermentasi microbial  
(diadaptasi dari Eliodório et al., 2019; Praveen & Brogi, 2025)

Selama proses fermentasi, terbentuk berbagai metabolit hasil fermentasi seperti asam organic, aldehid, alcohol dan ester. Pada produk makanan hasil fermentasi, metabolit ini memberikan cita rasa dan aroma yang luas (Praveen & Brogi, 2025). Pada bab ini pembahasan dititik beratkan pada fermentasi alkohol dan asam laktat.

## B. Fermentasi Alkohol dan Asam Laktat

### 1. Fermentasi Alkohol

#### a. Pengertian dan mekanisme

Fermentasi berasal dari Bahasa Latin "fervere" atau mendidih. Istilah ini menunjukkan aktivitas *yeast* pada biji-bijian atau ekstrak buah (Fatimah et al., 2013). Fermentasi merupakan proses oksidasi yang di dalamnya termasuk perombakan media organik oleh mikroorganisme anaerob atau anaerob fakultatif yang menggunakan senyawa organik sebagai aseptor elektron terakhir (Moede et al., 2017). Fermentasi dalam mikrobiologi industri diartikan sebagai suatu proses perubahan bahan baku oleh mikroba menjadi suatu produk (Fatimah et al., 2013).

Persamaan kimia produksi etanol dari glukosa adalah sebagai berikut (Maicas, 2020):



Pada kondisi anaerob atau anaerob fakultatif, etanol dan 2 mol ATP dihasilkan dari asetaldehid. Dalam kondisi ini, sel mikroorganisme harus mengkonsumsi glukosa dalam jumlah besar untuk menghasilkan ATP yang cukup dalam sistem. Akibatnya, terjadi akumulasi etanol dan proses fermentasi dihentikan (Maicas, 2020).

Proses fermentasi secara garis besar berlangsung dalam dua tingkat (Frazier dan Westhoff, 1978 dalam Widiyanti & Moehadi, 2016) :

- 1) Peragian tingkat pertama, berlangsung di permukaan dan dalam suasana adanya oksigen

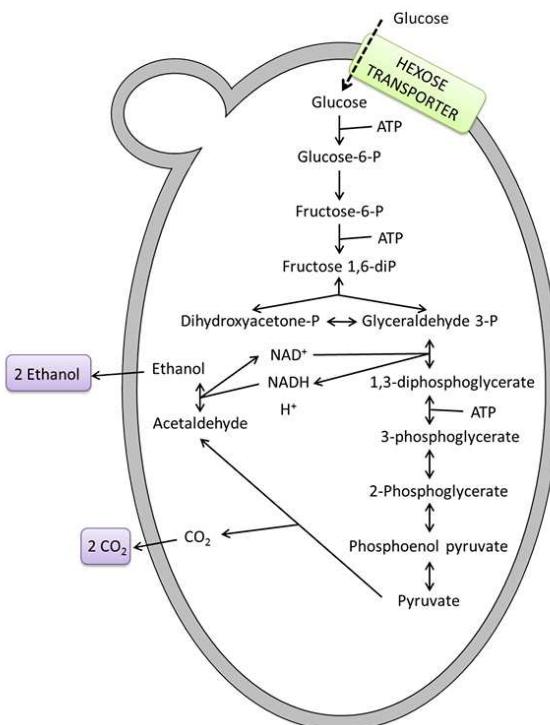
(aerob) terlarut. Proses ini bertujuan memperbanyak *yeast* yang ditandai dengan terbentuknya gas CO<sub>2</sub>. Pada proses ini tidak atau menghasilkan sedikit etanol. Persamaan reaksi tingkat pertama, sebagai berikut:



- 2) Proses fermentasi tingkat dua berlangsung tanpa adanya oksigen (anaerob). Pada tingkat ini *yeast* dan enzim yang dihasilkan cukup banyak sehingga proses fermentasi berlangsung sampai sebagian atau seluruh gula diubah menjadi etanol. Persamaan reaksinya sebagai berikut:



Proses fermentasi dalam *yeast* dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Proses fermentasi dalam sel *yeast*  
(Maicas, 2020)

b. Organisme yang terlibat

Pada umumnya proses fermentasi mikrobial alcohol menggunakan *yeast Saccharomyces cerevisiae* (Moede et al., 2017). Berdasarkan teknologi yang digunakan, *yeast* dapat digolongkan menjadi dua tipe yaitu *Saccharomyces* and *non-Saccharomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* adalah spesies yang paling banyak paling banyak digunakan dalam fermentasi anggur dan bir karena kapasitas fermentasinya yang memuaskan, pertumbuhan yang cepat, dan adaptasi yang mudah. Beberapa *yeast non-Saccharomyces* yang paling banyak teliti termasuk *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Lachancea* dan *Kluyveromyces* yang dimanfaatkan dalam proses fermentasi (Maicas, 2020).

c. Faktor yang mempengaruhi

Laju fermentasi alcohol dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu jenis substrat, laju pemakaian nutrisi, aktivitas enzim glikolisis jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), dan faktor *yeast* yang digunakan (inokulasi, fisiologis, toleransi terhadap gula dan alcohol, kondisi fermentasi) (Fatimah et al., 2013; Moede et al., 2017). Tipikal proses fermentasi dapat dilihat pada Gambar 3.

1) Substrat

Secara umum bahan organik yang mengandung pati dan glukosa dapat dijadikan substrat. Jumlah substrat yang terlalu sedikit menurunkan produktivitas *yeast* dalam proses fermentasi. Umumnya kecepatan fermentasi meningkat dengan pertambahan konsentrasi substrat, akan tetapi konsentrasi substrat yang berlebih dapat membunuh mikroorganisme.

2) Suhu

Suhu berperan penting dalam fermentasi, karena secara langsung mempengaruhi aktivitas *yeast*.

*Saccharomyces cerevisiae* umumnya tumbuh optimum pada suhu 23-35°C.

3) Nutrisi

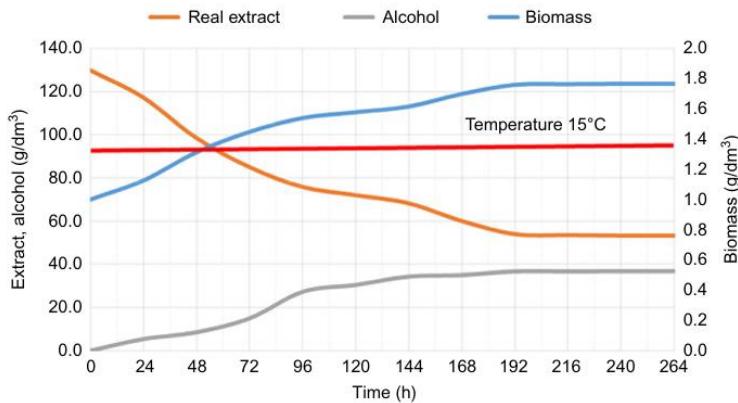
*Saccharomyces cerevisiae* membutuhkan sumber karbon dan nitrogen dalam pertumbuhannya. Sebagian besar yeast ini membutuhkan vitamin (tiamin dan biothin) dan mineral (fosfat, kalium, belerang, serta besi dan tembaga dalam jumlah kecil).

4) pH

pH pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* adalah 4-6

5) Waktu

Proses fermentasi yang menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* umumnya berlangsung selama 3-14 hari. Apabila waktu fermentasi terlalu cepat pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* belum optimal, sedangkan apabila waktunya terlalu lama maka yeast akan mati dan produksi alkoholnya tidak maksimal.



**Gambar 3.** Tipikal proses fermentasi  
(Shopska et al., 2019)

d. Produk dan aplikasi

1) Bioetanol

Bioetanol dapat digunakan sebagai alternatif bahan bakar tergantung pada tingkat kemurniannya (etanol 95-99% dapat dipakai sebagai substitusi bensin) (Moede et al., 2017). Bioethanol terutama diproduksi oleh mikroorganisme melalui proses fermentasi dengan tumbuhan (seperti jagung, tebu, bit, sorgum) sebagai bahan baku. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan *yeast* yang paling umum digunakan dalam fermentasi bioethanol (Eliodório et al., 2019).

2) Produk minuman beralkohol

Produksi minuman beralkohol hasil fermentasi dari sumber karbon merupakan bioteknologi tertua dan penting secara ekonomi. *Yeast* memegang peranan penting dalam produksi semua minuman beralkohol. Pemilihan strain *yeast* sangat penting untuk memaksimalkan hasil alkohol serta menjaga kulitas sensori minuman. *Wine*, *Bir*, dan *Cider* adalah beberapa contoh minuman beralkohol hasil fermentasi (Maicas, 2020).

3) Aplikasi lain

*Yeast* dapat dimanfaatkan dalam produk non-alcoholic lainnya seperti roti, coklat atau kopi, minuman seperti kefir, soda, limun, cuka dan bahan kimia lainnya (Maicas, 2020).

2. Asam Laktat

a. Pengertian dan mekanisme

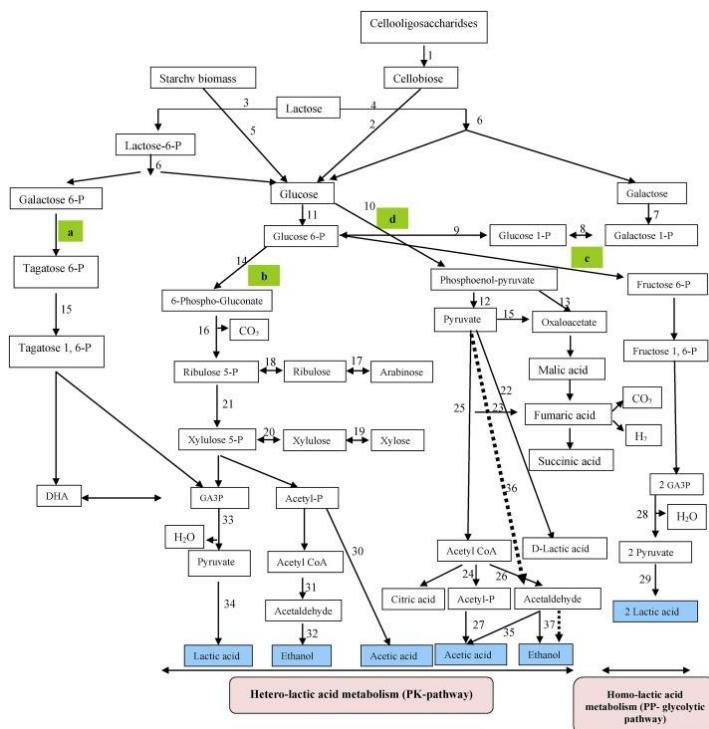
Asam laktat merupakan asam organik essensial yang dapat dimanfaatkan dalam makanan, produk farmasi dan kosmetik. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa asam laktat merupakan monomer untuk sintesis plastik *polylactic acid* (PLA) yang dapat diserap

secara biologis dan dapat dijadikan kompos (Huang et al., 2023).

Asam laktat dapat diproduksi melalui sintesis kimia atau fermentasi mikroorganisme. Asam laktat hasil fermentasi memiliki beberapa keunggulan yaitu memiliki tingkat kemurnian yang tinggi, kristalinitas dan titik leleh yang tinggi (Nurfuzianti et al., 2021). Asam laktat hasil sisntesis kimia dapat menghasilkan campuran rasematis yang berbahaya pada tubuh (Li et al., 2021). Fermentasi asam laktat dibagi dua yaitu homofermentatif (menghasilkan asam laktat sampai dengan 90%) dan heterofermentatif (menghasilkan asam laktat sampai 50%) (Babich et al., 2024). Jalur produksi asam laktat dapat dilihat pada Gambar 4.

b. Organisme yang terlibat

Fermentasi asam laktat dapat dilakukan oleh berbagai mikroorganisme, termasuk fungi dan bakteri asam laktat (BAL). Genus bakteri asam laktat yang paling banyak adalah *Lactobacillus*, dengan 80 spesies (Babich et al., 2024). Strain *Bacillus* seperti *B. coagulans* dan *B. licheniformis*; *Escherichia coli*; *Corynebacteria glutamicum*; jamur seperti *Rhizopus sp.* (contoh *R. oryzae*); *Candida sp.* (contoh *C. utilis*); yeast seperti *Saccharomyces cerevisiae*; *Kluyveromyces marxianus*; dan *Schizosaccharomyces pombe* merupakan contoh mikroorganisme yang dapat menghasilkan asam laktat (Abedi & Hashemi, 2020). Beberapa tipe BAL dan aplikasi pemanfaatannya dapat dilihat pada Tabel 1.



**Gambar 4.** Jalur produksi asam laktat secara agro-industri  
(Abedi & Hashemi, 2020)

**Tabel 1. Beberapa tipe BAL dan aplikasinya**  
 (Anumudu et al., 2024)

Type of LAB	Scope of Application
<i>Lactobacillus</i>	Dairy fermentation (yogurt, cheese, kefir), probiotic supplementation, and fermentation of vegetables.
<i>Lactococcus</i>	Development of flavor and texture in fermented foods, fermentation of dairy-based products, and biopreservative constituents.
<i>Leuconostoc</i>	Improvement of flavor and aroma in fermented vegetables
<i>Pediococcus</i>	Fermentation of beer and wine, improvement of taste in fermented beverages, and inhibition of pathogenic microorganisms in fermented food products.
<i>Streptococcus</i>	Production of yogurt and cheese
<i>Oenococcus</i>	Malolactic fermentation in wine, improving flavor and stability
<i>Weissella</i>	Fermentation of vegetables, fish, and other traditional foods
<i>Enterococcus</i>	Improvement in the aroma, texture, and flavor of fermented dairy products

c. Faktor yang mempengaruhi

Proses fermentasi asam laktat menggunakan BAL dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu:

1) Mikroorganisme

Jenis BAL memiliki berbagai variasi dalam efisiensi dan laju fermentasi. Umumnya BAL yang digunakan adalah *Lactobacillus*, *Streptococcus*, dan *Leuconostoc*. Kesehatan dan aktivitas kultur mikroorganisme berpengaruh pada laju fermentasi, umumnya kultur yang segar dan aktif menghasilkan hasil yang baik.

2) Substrat

Bahan baku yang mengandung jenis gula yang berbeda seperti glukosa, laktosa, sukrosa dapat mempengaruhi laju fermentasi. Umumnya glukosa merupakan gula yang paling mudah difermentasi. Konsentrasi gula yang tinggi dapat meningkatkan laju fermentasi sampai titik tertentu, dan apabila melebihi titik tersebut proses fermentasi akan terhambat.

3) Suhu

Temperatur optimal fermentasi asam laktat berkisar antara 30-40°C

4) pH

Bakteri asam laktat tumbuh optimum pada pH asam, sekitar 5,5-6,5. Mempertahankan pH optimum sangat penting untuk memaksimalkan efisiensi fermentasi.

5) Oksigen

Fermentasi asam laktat berlangsung dalam kondisi anaerob. Adanya oksigen dapat menyebabkan respirasi aerobik yang tidak menghasilkan asam laktat dan menghambat pertumbuhan bakteri.

Nutrisi

Sumber nitrogen (asam amino dan peptide) serta vitamin penting dalam pertumbuhan dan aktivitas metabolisme BAL. Beberapa mineral tertentu seperti magnesium dan kalsium berperan dalam pertumbuhan dan aktivitas enzimatis BAL.

6) Waktu

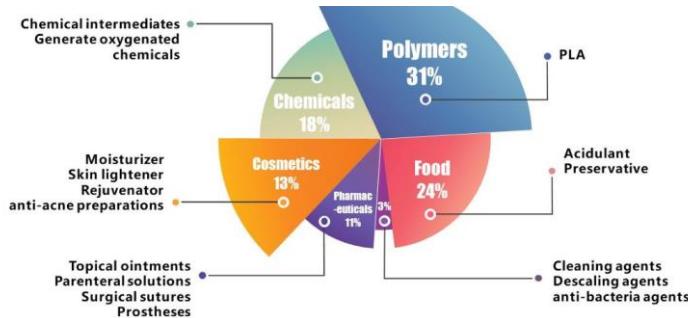
Waktu fermentasi yang lebih lama umumnya menghasilkan produksi asam laktat yang lebih tinggi, tetapi dapat juga mengakibatkan akumulasi produk sampingan yang menghambat fermentasi.

d. Produk dan aplikasi

Asam laktat berperan baik dalam industri makanan maupun non makanan. Dalam produk makanan dan minuman asam laktat dimanfaatkan sebagai pengawet, *acidifier*, penambah rasa, dekontaminan, antioksidan, prebiotik, krioprotektan, *viskosifier*. Dalam bidang industri dimanfaatkan senagai *repellent*, pengatur pH, *green solvent*, pembersih dan substitusi plastic sintetik. Dalam bidang farmasi dan kosmetik sebagai pelembab, pencerah kulit, *skin rejuvenating*

*agents*, humektan dan lain sebagainya (Abedi & Hashemi, 2020).

Aplikasi pemanfaatan asam laktat dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Aplikasi asam laktat dalam berbagai bidang  
(Huang et al., 2023)

## DAFTAR PUSTAKA

- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic Acid Production – Producing Microorganisms and Substrates Sources-State of Art. *Heliyon*, 6(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Anumudu, C. K., Miri, T., & Onyeaka, H. (2024). Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. *Foods*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/foods13233714>
- Babich, O., Ivanova, S., Michaud, P., Budenkova, E., Kashirskikh, E., Anokhova, V., & Sukhikh, S. (2024). Fermentation of Micro- and Macroalgae as a Way to Produce Value-Added Products. *Biotechnology Reports*, 41, e00827. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2023.E00827>
- Eliodório, K. P., Cunha, G. C. de G. e., Müller, C., Lucaroni, A. C., Giudici, R., Walker, G. M., Alves, S. L., & Basso, T. O. (2019). Advances in Yeast Alcoholic Fermentations for the Production of Bioethanol, Beer and Wine. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 109, pp. 61–119). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.10.002>
- Fatimah, Lia, F. G., & Rahmasari, L. G. (2013). Kinetika Reaksi Fermentasi Alkohol dari Buah Salak. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 2(2), 16–20.
- Huang, Y., Wang, Y., Shang, N., & Li, P. (2023). Microbial Fermentation Processes of Lactic Acid: Challenges, Solutions, and Future Prospects. *Foods*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/foods12122311>
- Li, C., Gao, M., Zhu, W., Wang, N., Ma, X., Wu, C., & Wang, Q. (2021). Recent Advances in the Separation and Purification of Lactic Acid from Fermentation Broth. *Process Biochemistry*, 104, 142–151. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2021.03.011>
- Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1–8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

- Moede, F. H., Gonggo, S. T., & Ratman. (2017). Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Terehadap Kadar Bioetanol dari Pati Ibu Jalar Kuning. *J. Akad. Kim*, 6(2), 8691.
- Nurfuzianti, R., Lubis, N., & Cahyati J, E. (2021). Review: Pengaruh Proses Fermentasi Terhadap Kandungan Asam Laktat pada Makanan Fermentasi. *Parapemikir : Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10(2), 1–6.  
<https://doi.org/10.30591/pjif.v10i2.2098>
- Praveen, M., & Brogi, S. (2025). Microbial Fermentation in Food and Beverage Industries: Innovations, Challenges, and Opportunities. *Foods*, 14(1).  
<https://doi.org/10.3390/foods14010114>
- Shopska, V., Denkova, R., Lyubenova, V., & Kostov, G. (2019). Kinetic Characteristics of Alcohol Fermentation in Brewing: State of Art and Control of the Fermentation Process. In *Fermented Beverages: Volume 5. The Science of Beverages* (pp. 529–575). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00013-0>
- Widyanti, E. M., & Moehadi, B. I. (2016). Proses Pembuatan Etanol Dari Gula Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae* Amobil. *Metana*, 12(2), 31–38.  
<http://ejournal.undip.ac.id/index.php/metana>

## BIODATA PENULIS



**Dra. Elisabeth Natalia Barung, M.Kes., Apt** lahir di Tana Toraja. 25 Desember 1967. Penulis menyelesaikan pendidikan Sarjana Farmasi (Dra) dan Apoteker pada Jurusan Farmasi - FMIPA Universitas Hasanuddin serta Program Magister Ilmu Kedokteran Dasar peminentan Farmakologi (M.Kes) di Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penulis aktif mengajar pada Politeknik Kesehatan Kemenkes Manado. Mengampu mata kuliah Farmakologi pada Prodi DIII Farmasi.

# BAB 11

## Bioteknologi pangan: probiotik, prebiotik, dan fermentasi pangan

\*Nisrina Fitri Nurjannah, S.Si., M.Si.\*

### A. Pendahuluan

Bioteknologi pangan telah berkembang pesat dalam meningkatkan kualitas dan manfaat pangan, terutama melalui pemanfaatan probiotik, prebiotik, dan proses fermentasi. Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang memberikan manfaat kesehatan saat dikonsumsi dalam jumlah cukup (Hill et al., 2014), sementara prebiotik merupakan senyawa yang tidak dapat dicerna oleh tubuh tetapi berfungsi sebagai makanan bagi bakteri baik di saluran pencernaan (Gibson et al., 2017). Kombinasi keduanya mendukung keseimbangan mikrobiota usus, yang berperan dalam meningkatkan sistem imun dan kesehatan pencernaan (Sanders et al., 2019). Sementara itu, fermentasi pangan merupakan teknik pemanfaatan mikroorganisme yang memperkaya nilai gizi dan rasa sekaligus masa penyimpanan dari pangan (Marco et al., 2017). Pembuatan makanan fermentasi sendiri umumnya melibatkan bakteri probiotik sehingga sangat bermanfaat bagi kesehatan. Penerapan ketiga konsep ini dalam industri pangan modern dapat berkontribusi terhadap inovasi produk makanan fungsional yang mampu meningkatkan kesehatan masyarakat (Rezac et al., 2018).

### B. Prebiotik, Probiotik, dan Fermentasi Pangan

#### 1. Pengertian probiotik

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya ketika

dikonsumsi dalam jumlah yang cukup (FAO/WHO, 2001). Mikroorganisme ini biasanya berupa bakteri baik yang secara alami terdapat dalam sistem pencernaan manusia dan dapat ditemukan dalam berbagai produk pangan fermentasi, seperti yogurt, kefir, tempe, kimchi, dan miso (Anandharaj et al., 2014; Jain et al., 2014).

Secara umum, probiotik berperan dalam menjaga keseimbangan mikrobiota usus, yang terdiri dari berbagai jenis bakteri baik yang membantu pencernaan manusia, serta bakteri pathogen ataupun pathogen oportunistik yang dapat menyebabkan penyakit. Dengan meningkatkan populasi bakteri baik, probiotik dapat membantu menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen, memperbaiki sistem pencernaan, serta memperkuat sistem kekebalan tubuh (Sanders et al., 2019). Beberapa *strain* bakteri yang umum digunakan sebagai probiotik antara lain adalah *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Jain et al., 2014).

Selain berperan dalam kesehatan pencernaan secara umum, probiotik juga dikaitkan dengan berbagai manfaat lain, seperti mengurangi risiko diare akibat penggunaan antibiotik, meningkatkan penyerapan nutrisi, mengurangi peradangan, serta berpotensi berkontribusi terhadap kesehatan mental melalui hubungan antara usus dan otak (Heuvelin et al., 2009). Oleh karena itu, konsumsi makanan atau suplemen yang mengandung probiotik semakin populer sebagai bagian dari gaya hidup sehat.

Dalam penggunaannya sebagai bagian dari pangan fungsional, terdapat beberapa kriteria pemilihan jenis probiotik yang akan digunakan. Pertama-tama, probiotik yang digunakan harus tetap mempertahankan viabilitasnya di sepanjang saluran pencernaan hingga sampai di usus. Untuk itu, strain probiotik yang digunakan harus memiliki sifat tahan terhadap asam dan empedu, mampu menempel dengan baik pada mukosa usus, serta dapat berkembang biak pada lingkungan usus. Selain itu, probiotik yang digunakan tentunya harus memiliki efek kesehatan yang

terbukti entah itu dalam menghambat pertumbuhan pathogen, memiliki efek *immunomodulatory*, maupun menghasilkan berbagai vitamin yang dibutuhkan tubuh (Pramanik et al., 2023)..

Probiotik yang bagus juga merupakan probiotik yang dapat tumbuh dengan baik pada medium berupa bahan makanan dan mampu mempertahankan sifatnya sepanjang pemrosesan makanan. Terakhir, dari sisi keamanan, probiotik harus memiliki status GRAS (Generally Regarded As Safe), berasal dari manusia atau makanan, tidak beracun, tidak bersifat patogen maupun hemolitik, dan tidak mengandung sifat resisten terhadap antibiotic (Yadav dan Shukla, 2017).

## 2. Pengertian prebiotik

Prebiotik adalah senyawa makanan yang tidak dapat dicerna oleh tubuh manusia tetapi berfungsi sebagai sumber makanan bagi bakteri baik dalam usus, sehingga membantu meningkatkan kesehatan saluran pencernaan. Prebiotik umumnya berupa serat pangan atau karbohidrat kompleks, seperti oligosakarida, yang dapat difermentasi oleh mikroorganisme probiotik untuk menghasilkan asam lemak rantai pendek yang bermanfaat bagi kesehatan usus (Younis et al., 2015). Manfaat prebiotik meliputi peningkatan kesehatan pencernaan, peningkatan penyerapan mineral seperti kalsium dan magnesium, serta penguatan sistem kekebalan tubuh. Selain itu, prebiotik juga dapat membantu mengurangi risiko gangguan metabolismik seperti obesitas dan diabetes dengan mengatur komposisi mikrobiota usus (Sanders et al., 2019).

Terdapat beragam jenis prebiotic yang saat ini sudah terbukti memiliki manfaat dalam peningkatan pertumbuhan probiotik. Jenis yang paling dikenal adalah fruktan seperti inulin dan fruktooligosakarida (FOS), serta galaktooligosakarida (GOS), yang terbukti memiliki efek bifidogenik kuat dan banyak ditemukan dalam bawang-bawangan, pisang, dan susu. Selain itu, terdapat beta-

glukan, yaitu serat larut air yang terdapat pada gandum, barley, jamur, dan alga, dengan manfaat terhadap kesehatan saluran cerna karena variasi struktur rantainya. Isomaltooligosakarida (IMO) yang berasal dari enzimatisasi pati jagung juga termasuk prebiotik yang dapat dikonsumsi dan memberikan efek kesehatan. Guar gum, berasal dari tanaman *Cyamopsis tetragonolobus*, sering digunakan dalam industri makanan dan kaya akan galaktomannan yang membentuk gel di saluran cerna (Carlson et al., 2018; Davani-Davari et al., 2019).

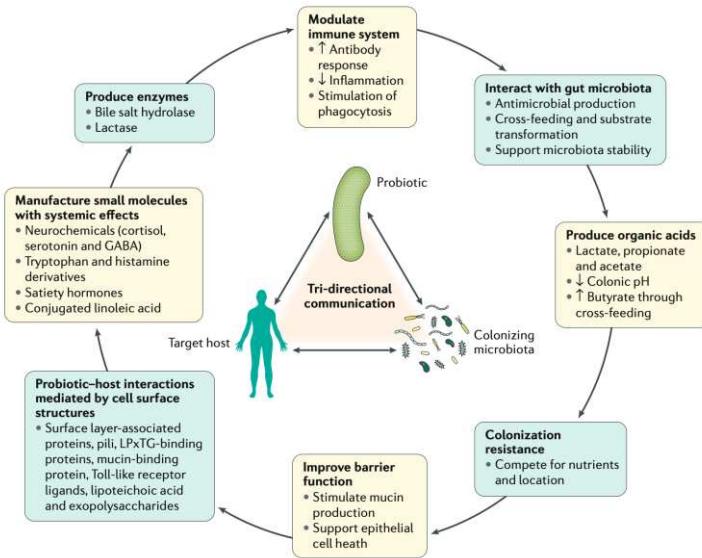
Selain itu, terdapat jenis prebiotic lain seperti pati resisten (RS) dan maltodekstrin resisten yang tidak tercerna di saluran cerna bagian atas dan dapat meningkatkan produksi asam lemak rantai pendek, khususnya butirat. Terakhir, xilooligosakarida (XOS) dan arabinooligosakarida (AOS), yang berasal dari serat tumbuhan seperti jagung dan sereal, kini banyak digunakan dalam minuman olahraga, produk susu, dan makanan fungsional (Carlson et al., 2018; Davani-Davari et al., 2019).

Prebiotik secara alami terdapat dalam berbagai produk pangan tinggi serat, seperti sayur-sayuran, bawang putih, kacan-kacangan, serealisa, susu, dan buah-buahan. Selain itu prebiotik juga ditemukan dalam rumput laut dan mikroalga. Namun karena konsentrasi yang rendah dalam bahan pangan alami, prebiotik umumnya diproduksi dalam skala industri besar. Beberapa jenis prebiotik dibuat dengan menggunakan bahan baku seperti laktosa, sukrosa, dan pati melalui proses bioteknologi (Panesar et al., 2013).

### 3. Mekanisme kerja prebiotic dan probiotik di saluran pencernaan

Probiotik memiliki beberapa mekanisme kerja utama dalam memelihara kesehatan saluran pencernaan (Gambar 1). Salah satu mekanisme utama kerja probiotik adalah melalui kompetisi dengan mikroorganisme patogen dalam mendapatkan nutrisi dan tempat melekat di dinding usus. Dengan mendominasi ekosistem usus, probiotik dapat

menghambat pertumbuhan mikroorganisme berbahaya seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella*. Selain itu, probiotik menghasilkan berbagai senyawa antimikroba, seperti asam laktat, asam asetat, dan bacteriocin, yang membantu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan menciptakan lingkungan dengan pH rendah yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Selain fungsi antimikroba, probiotik juga berperan dalam modulasi sistem kekebalan tubuh dengan merangsang produksi antibodi, meningkatkan aktivitas sel imun seperti makrofag dan sel T, serta mengurangi peradangan dalam tubuh. Probiotik juga memperkuat integritas sel epitel usus dengan meningkatkan produksi protein junction yang mempererat hubungan antar sel usus, sehingga membantu mencegah sindrom usus bocor (*leaky gut syndrome*) yang dapat meningkatkan risiko penyakit sistemik. Selain itu, probiotik memiliki manfaat dalam sintesis vitamin yang penting bagi metabolisme tubuh serta berkontribusi dalam peningkatan penyerapan mineral seperti kalsium dan magnesium, yang berperan penting dalam kesehatan tulang dan fungsi fisiologis lainnya (Sanders et al., 2019).

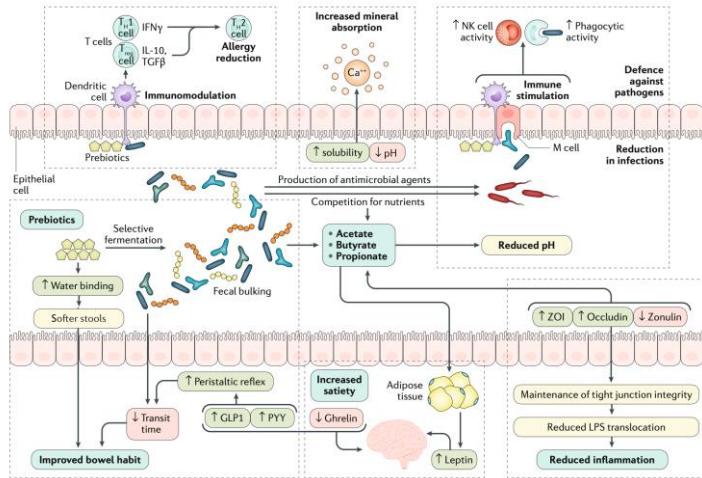


**Gambar 1.** Mekanisme kerja probiotik.

(Sumber gambar: Sanders et al., 2019)

Sementara itu, prebiotik adalah serat pangan yang tidak dapat dicerna oleh tubuh, namun menjadi sumber nutrisi utama bagi bakteri baik seperti *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*. Prebiotik seperti inulin, FOS, dan GOS akan difermentasi oleh mikroba tersebut menjadi asam lemak rantai pendek (SCFA) seperti asetat, propionat, dan butirat, yang memiliki berbagai fungsi metabolismik penting (Slavin, 2013). Butirat merupakan sumber energi bagi sel epitel usus dan memiliki efek antiinflamasi; asetat membantu menjaga keseimbangan mikrobiota dan mendukung sistem imun; sedangkan propionat berperan dalam regulasi metabolisme glukosa dan lipid (Macfarlane & Macfarlane, 2011). SCFA juga membantu penyerapan mineral dan menjaga pH usus tetap stabil. Selain menghasilkan SCFA, prebiotik juga meningkatkan fungsi imun dengan merangsang produksi mukus dan antibodi di usus. Terakhir, prebiotik juga mendukung pergerakan usus yang sehat dengan meningkatkan volume feses dan

merangsang peristaltik, sehingga bermanfaat dalam mencegah sembelit (Gambar 2)(Sanders et al., 2019).



**Gambar 2.** Mekanisme kerja prebiotik.

(Sumber gambar: Sanders et al., 2019)

Prebiotik dan probiotik bekerja secara sinergis. Probiotik sebagai mikroorganisme hidup membantu menyeimbangkan mikrobiota usus, sementara prebiotik menyediakan substrat nutrisi yang diperlukan. Kombinasi ini secara bersama-sama meningkatkan kesehatan pencernaan, memperkuat sistem imun, dan membantu mencegah berbagai gangguan metabolismik. Oleh karena itulah, dalam konteks ini, kombinasi prebiotik dan probiotik, yang dikenal sebagai sinbiotik, menjadi sebuah formulasi yang dapat dengan efektif meningkatkan kolonisasi mikroba menguntungkan sekaligus menyediakan substrat yang optimal untuk pertumbuhannya (Swanson et al., 2020).

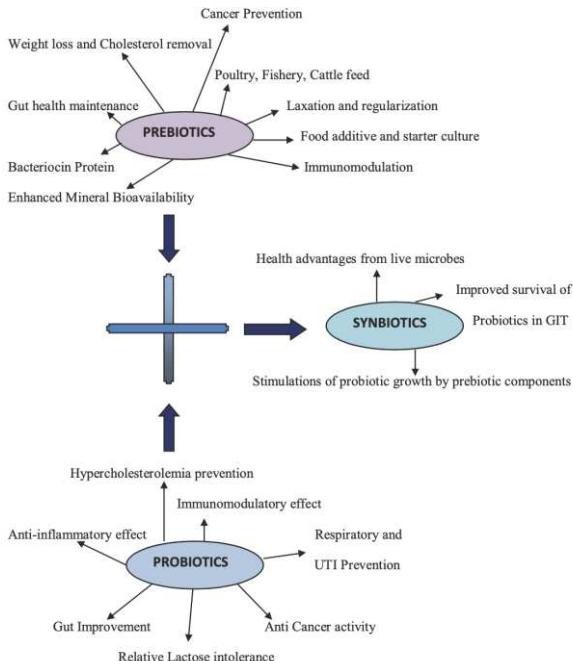
#### 4. Sinbiotik: Kombinasi probiotik dan prebiotik dalam pangan fungsional

Sinbiotik merupakan gabungan antara probiotik dan prebiotik dalam satu formulasi dengan tujuan untuk memberikan manfaat kesehatan yang lebih besar dibandingkan penggunaan masing-masing secara terpisah (Gibson & Roberfroid, 1995; Swanson et al., 2020). Berdasarkan definisi tersebut, sinbiotik diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu sinbiotik komplementer, yang mendukung pertumbuhan mikroba alami di saluran pencernaan, dan sinbiotik sinergistik, yang secara khusus dirancang agar prebiotik dan probiotik bekerja sama secara langsung (Swanson et al., 2020).

Dalam konteks aplikatif, sinbiotik memegang peranan penting dalam mengatasi tantangan viabilitas probiotik selama proses produksi, penyimpanan, dan perjalanan melalui saluran cerna (Sarao & Arora, 2015; Rioux et al., 2005). Untuk mengatasi tantangan tersebut, teknologi mikroenkapsulasi telah digunakan secara luas, yaitu dengan melapisi sel probiotik menggunakan bahan seperti alginat, pektin, atau protein whey agar lebih tahan terhadap kondisi ekstrem. Studi-studi sebelumnya menunjukkan bahwa mikroenkapsulasi probiotik bersama prebiotik, seperti *Bifidobacterium BB-12* dengan inulin atau polidekstrosa, serta *Lactobacillus plantarum* dengan FOS, mampu meningkatkan daya tahan probiotik secara signifikan dalam lingkungan asam dan tinggi garam empedu (Pinto et al., 2015; Pop et al., 2015; Rajam & Anandharamakrishnan, 2015).

Prebiotik dalam formulasi sinbiotik tidak hanya berperan sebagai substrat, tetapi juga mendukung kolonisasi probiotik di usus besar, sekaligus membantu dalam menjaga keseimbangan mikrobiota, meningkatkan penyerapan nutrisi, mereduksi inflamasi, dan memperkuat respons imun tubuh (Gambar 3) (Mishra et al., 2018; Olveira & González-Molero, 2016; Sáez-Lara et al., 2016). Selain itu, sinbiotik juga telah terbukti bermanfaat dalam mengatasi gangguan

pencernaan seperti sindrom iritasi usus besar (IBS), meningkatkan kualitas mikrobiota usus, dan memperbaiki kesehatan metabolismik (Wasilewski et al., 2015; De Vrese & Schrezenmeir, 2008).



**Gambar 3.** Sinbiotik sebagai gabungan prebiotic dan probiotik

(Sumber gambar: Mishra et al., 2018)

5. Postbiotik dan parabiotik: bentuk baru penggunaan mikroorganisme

Postbiotik dan parabiotik merupakan bentuk turunan dari probiotik yang tidak lagi mengandung mikroorganisme hidup, namun tetap memberikan manfaat kesehatan yang signifikan bagi tubuh manusia. Postbiotik didefinisikan sebagai produk metabolit atau senyawa aktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme selama proses fermentasi dan ditemukan dalam supernatan bebas sel, seperti enzim, protein sekresi, asam lemak rantai pendek (SCFA), vitamin,

peptida, dan asam organik (Aguilar-Toalá et al., 2018; Tsilingiri & Rescigno, 2013). Di sisi lain, parabiotik – juga dikenal sebagai “probiotik yang tidak aktif” atau “ghost probiotics” – merujuk pada sel mikroba mati (baik utuh maupun terfragmentasi) atau ekstrak kasar dari sel yang telah diinaktivasi secara fisik atau kimiawi (Taverniti & Guglielmetti, 2011; Salminen et al., 2021).

Perbedaan utama antara keduanya terletak pada sumber bioaktivitasnya. Postbiotik bekerja melalui metabolit yang disekresikan oleh mikroorganisme selama hidupnya, sementara parabiotik berfungsi melalui komponen struktural dari sel mikroba yang telah mati, seperti dinding sel dan isinya. Meski demikian, keduanya menunjukkan potensi biologis yang mirip dengan probiotik hidup, termasuk kemampuan untuk memperkuat sistem kekebalan tubuh, mengurangi inflamasi, melawan patogen usus, serta mendukung keseimbangan mikrobiota (Piqué et al., 2019; Singh et al., 2022).

Keunggulan utama dari postbiotik dan parabiotik dibandingkan probiotik hidup adalah aspek keamanannya, khususnya bagi individu dengan sistem imun yang lemah. Karena tidak mengandung mikroorganisme hidup, risiko translokasi bakteri dari lumen usus ke sirkulasi darah dapat dihindari, dan tidak ada kemungkinan perpindahan gen resistensi antibiotik (Piqué et al., 2019). Selain itu, bentuk ini lebih stabil dalam penyimpanan, mudah distandarisasi, dan dapat diekstraksi dengan lebih efisien (Aguilar-Toalá et al., 2021). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa sel probiotik yang telah mengalami lisis justru mampu melepaskan lebih banyak komponen aktif yang dapat berinteraksi langsung dengan sel epitel usus, memperkuat efek biologisnya (Singh et al., 2022).

Meskipun manfaatnya menjanjikan, belum ada konsensus atau definisi resmi dari badan regulasi internasional mengenai standar dosis yang tepat untuk postbiotik atau parabiotik sebagaimana yang telah

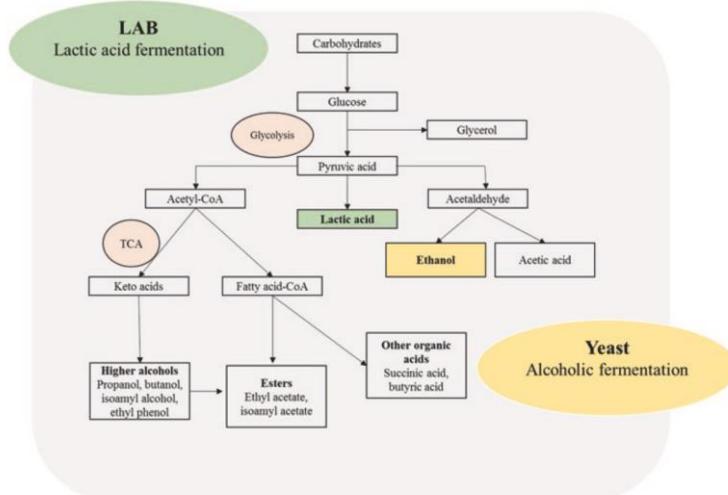
ditetapkan untuk probiotik. (Salminen et al., 2021; Piqué et al., 2019).

## 6. Fermentasi makanan

Fermentasi makanan merupakan proses biokimia yang melibatkan aktivitas mikroorganisme seperti bakteri, ragi, dan kapang untuk mengubah bahan pangan melalui reaksi enzimatik. Proses ini tidak hanya penting dari aspek kuliner, tetapi juga memberikan kontribusi besar terhadap nilai gizi dan bioaktivitas pangan (Marco et al., 2017). Fermentasi makanan menjadi salah satu pendekatan yang memainkan peran penting dalam mengoptimalkan keberadaan bakteri probiotik dalam pola makan sehari-hari. Mikroorganisme dalam fermentasi menghasilkan senyawa seperti asam laktat, etanol, dan asam asetat yang berperan sebagai pengawet alami sekaligus pembentuk rasa dan aroma khas pada berbagai produk fermentasi (Tamang et al., 2016). Keberadaan senyawa-senyawa ini menurunkan pH lingkungan pangan dan menghambat pertumbuhan mikroba pembusuk maupun patogen, sehingga secara signifikan memperpanjang umur simpan produk (Ross et al., 2002; Hutzins, 2006).

Jenis fermentasi dapat diklasifikasikan berdasarkan mikroorganisme dan metabolit utamanya (Gambar 4). Fermentasi asam laktat, yang umum terjadi pada pembuatan yogurt, tempe, kimchi, dan *sauerkraut*, dilakukan oleh bakteri seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, yang menurunkan pH dan menciptakan lingkungan yang tidak mendukung bagi patogen (Rezac et al., 2018). Sementara itu, fermentasi alkohol menggunakan ragi seperti *Saccharomyces cerevisiae* untuk mengubah gula menjadi etanol dan karbon dioksida, terutama pada pembuatan bir, anggur, dan sake. Fermentasi asam asetat, yang melibatkan bakteri *Acetobacter*, digunakan dalam produksi cuka dari etanol. Selain itu, fermentasi kapang melibatkan jamur seperti *Aspergillus* dan *Rhizopus*, yang digunakan dalam pembuatan kecap, miso, keju, dan natto, serta menghasilkan

enzim seperti protease dan amilase untuk memecah protein dan karbohidrat kompleks (Steinkraus, 2002).



**Gambar 4.** Klasifikasi fermentasi makanan

(Sumber gambar: Kandasamy et al., 2018)

Produk fermentasi secara alami mengandung beragam senyawa bioaktif yang umum dihasilkan oleh bakteri probiotik seperti peptida antimikroba, asam organik, vitamin, dan mineral (LeBlanc et al., 2017). Proses fermentasi juga memicu produksi asam lemak rantai pendek (SCFA) berperan sebagai sumber energi untuk sel epitel usus dan memiliki efek imunomodulator Koh et al., 2016). Di luar manfaat pencernaan, makanan fermentasi juga menunjukkan potensi dalam mendukung fungsi sistem saraf pusat melalui interaksinya dengan mikrobiota usus. Beberapa senyawa yang dihasilkan selama fermentasi diketahui dapat memengaruhi produksi neurotransmitter *gamma-aminobutyric acid* (GABA), seperti serotonin, yang berperan dalam mengatur suasana hati dan fungsi kognitif (Westfall et al., 2017). Dengan demikian, fermentasi

makanan tidak hanya memperkaya cita rasa dan stabilitas pangan, tetapi juga menjadi jalur alami dalam peningkatan kualitas kesehatan secara menyeluruh.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., & Rani, R. P. (2014). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: A review. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/572754>
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., & Slavin, J. L. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Current Developments in Nutrition*, 2(3), nzy005. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 1–66. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_097](https://doi.org/10.1007/10_2008_097)
- FAO/WHO. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. FAO Food and Nutrition Paper No. 85.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of

- prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Heuvelin, E., Lebreton, C., Granette, C., Pot, B., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2009). Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *bifidobacterium breve*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(Suppl 1), S58–S63. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31819ff1e0>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods*. Blackwell Publishing.
- Jain, S., Yadav, H., & Sinha, P. R. (2014). Probiotic fermented foods for promoting good health. *Current Nutrition & Food Science*, 10(1), 45–55. <https://doi.org/10.2174/157340131001140219115637>
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2011). Fermentation in the human large intestine: Its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45, S120–S127. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31822fecfe>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., ... & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>

- in Biotechnology*, 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), 482–494. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.08.003>
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1), 279–289. <https://doi.org/10.1023/A:1020620607611>
- Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2013). Potential applications of prebiotics in food industry: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.004>
- Pinto, S., Teixeira, J. A., & Malcata, F. X. (2015). Microencapsulation of probiotics for use in functional dairy products. *Food Research International*, 45(2), 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.009>
- Piqué, N., Berlanga, M., & Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (tyndallized) probiotics: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2534. <https://doi.org/10.3390/ijms20102534>
- Pop, O. L., Pop, C. R., Dulf, F. V., Socaciu, C., & Vodnar, D. C. (2015). Lactic acid bacteria as a promising alternative to chemical preservatives. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(6), 11087–11094.
- Pramanik, S., Sultana, M., & Rahman, M. M. (2023). Viability and functionality of probiotics during gastrointestinal transit: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 134, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.002>
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* using sodium alginate and whey protein concentrate: Optimization of wall material concentration using response surface methodology. *LWT*

- *Food Science and Technology*, 60(2), 480-488. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.027>
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Rioux, K. P., Madsen, K. L., & Fedorak, R. N. (2005). Synbiotic therapy is a promising intervention strategy for IBD. *Digestive Diseases*, 23(3-4), 325-328. <https://doi.org/10.1159/000089831>
- Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 3-16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., ... & Sanders, M. E. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649-667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605-616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2015). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 344-371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Singh, B., Rani, A., & Chopra, R. (2022). Paraprobiotics and postbiotics: An emerging paradigm in gut microbiome modulation. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01797-y>

- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417–1435. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Steinkraus, K. H. (2002). Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(1), 23–32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00004.x>
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., & Scott, K. P. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 687–701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>
- Sáez-Lara, M. J., Robles-Sánchez, C., Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Díaz, J., & Gil, A. (2016). Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: A review of human clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 928. <https://doi.org/10.3390/ijms17060928>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*, 6(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>
- Tsilingiri, K., & Rescigno, M. (2013). Postbiotics: What else? *Beneficial Microbes*, 4(1), 101–107. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0049>
- Wasilewski, A., Zielińska, M., Storr, M., & Fichna, J. (2015). Beneficial effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66(5), 613–627.

- Westfall, S., Lomis, N., & Kahouli, I. (2017). Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: Deciphering the gut-brain axis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(20), 3769–3787. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2550-9>
- Yadav, R., & Shukla, P. (2017). Probiotics for human health: Current progress and applications. *3 Biotech*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0585-1>
- Younis, K., Ahmad, S., & Jahan, K. (2015). Health benefits and application of prebiotics in foods. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(7), 1000462. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000462>

## BIODATA PENULIS



**Nisrina Fitri Nurjannah, S.Si., M.Si.** lahir di Pematang Siantar, pada 5 Januari 2001. Menyelesaikan pendidikan S1 dan S2 di Sekolah Imu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Sampai saat ini penulis bekerja sebagai dosen di Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro.

# BAB 12

## Teknik analisis biomolekuler: PCR, elektroforesis, spektrofotometri

\*Nyoman Yudi Antara, S.Si.,M.Biotech\*

### A. Pendahuluan

Biologi adalah ilmu yang ada sejak lama dan menjadi ilmu dasar untuk mempelajari mahluk hidup dan lingkungannya mulai dari biosfer, ekosistem, komunitas, populasi, organisme hingga tingkat sel (Campbell et al., 2005). Dalam perkembangannya ilmu biologi terbagi menjadi banyak bagian ilmu yang lebih spesifik, misalnya botani (ilmu tentang tumbuhan), zoology (ilmu tentang hewan), dan masih banyak lagi cabang ilmu yang dihasilkan dari ilmu biologi. Pengetahuan yang berkembang semakin spesifik dan dalam tidak terlepas dari terungkapnya fakta-fakta baru yang dikaji berdasarkan struktur sel (tingkat molekul) yang kita kenal sekarang sebagai biologi molekuler (Alberts et al., 2015; Stevens, 2012)

Biologi molekuler adalah cabang ilmu biologi yang mempelajari tentang struktur sel, komponen sel, dan mekanisme atau cara kerja didalam sel termasuk juga struktur dari materi genetik yang terdapat di dalam inti sel berupa DNA (*Deoxyribose nucleic acid*) atau asam nukleat. Asam nukleat menyimpan semua informasi hereditas yang ada pada mahluk hidup dan merupakan senyawa kimia yang disebut nukleotida serta disimbolkan dengan empat huruf alphabet yaitu A, T, G, dan C. Setiap nukleotida mengandung dua bagian yaitu gugus gula (*deoxyribose*) dengan fosfat dan sebuah basa dengan pasangan yaitu A (adenine) dengan T (Timin) atau G (Guanine)

dengan C (Sitosin). Ikatan tersebut membentuk suatu polimer DNA berganda (Alberts et al., 2015). Proses pembentukan untaian DNA terus terjadi didalam sel untuk memperbanyak materi genetik yang digunakan pada saat pembelahan sel ataupun pembentukan suatu protein melalui mekanisme ekspresi gen.

Mekanisme perbanyak materi genetik atau DNA telah dapat dilakukan diluar sel dengan ditemukannya alat yang meniru cara kerja perbanyak DNA di dalam sel. Teknologi tersebut dikenal dengan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) suatu mesin yang mampu mengungkap misteri dibanyak bidang biologi termasuk kedokteran (Jonathan D, 2015). Dalam pengaplikasiannya PCR membutuhkan perangkat lainnya agar dapat digunakan atau dapat memberikan hasil yang maksimal yaitu eletroforesis dan spektrofotometri yang akan dibahas pada chapter ini.

## B. Teknik PCR, Elektroforesis dan Spektrofotometri

### 1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Penemuan PCR tidak terlepas dari peran penemuan-penemuan sebelumnya seperti ditemukannya struktur DNA oleh James D. Watson dan Francis Crick pada tahun 1953, kemudian ditemukannya DNA polymerase oleh Arthur Kornberg pada tahun 1956, serta rancangan konsep awal dari PCR oleh Kjell Kleppe di laboratorium H. Gobind Korana yang digambarkan sebagai amplifikasi DNA secara invitro dengan melibatkan primer oligonukleotida dan enzim DNA polymerase. Kemudian Karry Mullis dinobatkan sebagai penemu PCR dengan memperbaiki sintesis oligonukleotida (Kleppe et al., 1971; LEHMAN et al., 1958).

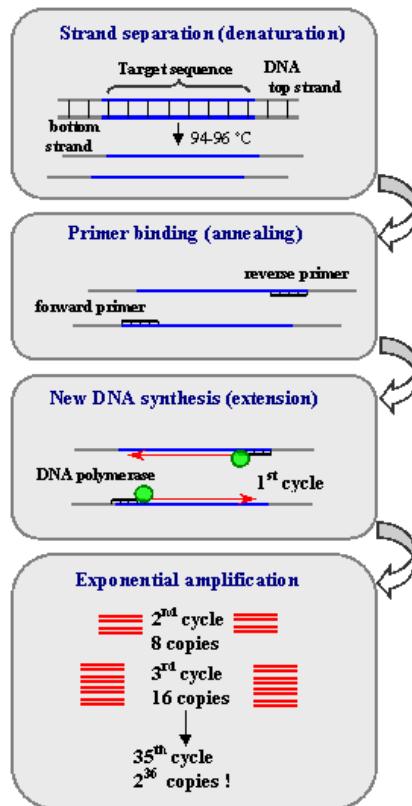
Selama penemuan PCR, Kaary Mullis mendapat gugatan terhadap penemuannya dari perusahaan yang bergerak dibidang sains dan teknologi yaitu DuPont dan Karry Mullis sendiri bekerja di perusahaan Cetus yang pada akhirnya dimenangkan oleh Cetus. Cerita penemuan tentang PCR oleh Karry Mullis menjadi cerita yang

menarik, berawal dari pemikiran tentang DNA yang dapat diamplifikasi dengan adanya dua primer. Karry Mullis mengkalkulasi bagaimana DNA dapat bertambah dari 2 menjadi sejuta. Pada percobaan pertama Karry Mullis menggunakan DNA manusia dan primer dari saraf faktor pertumbuhan manusia yang berhasil dikloning yang dipanaskan selama beberapa menit dan didinginkan dan selanjutnya ditambahkan primer dan disimpan pada suhu 37°C. Setelah beberapa percobaan dan penelitian yang mendukung perbaikan dalam konsep PCR maka ditemukan bahwa PCR adalah proses pengulangan reaksi panas dengan bantuan DNA polymerase untuk mengamplifikasi DNA yang diinginkan (Mullis, 1994).

Teknologi PCR berkembang kemudian dan dikenal secara luas sebagai reaksi berantai polymerase. PCR bekerja dengan memanfaatkan kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA baru yang komplementer dengan untai template yang tersedia. Karena enzim polimerase hanya dapat menambahkan nukleotida pada ujung 3'-OH yang telah ada, diperlukan primer sebagai titik awal sintesis. Persyaratan ini memungkinkan peneliti untuk menargetkan dan memperbanyak segmen DNA tertentu sesuai kebutuhan. Selain itu, dengan memanfaatkan sifat DNA yang membuka atau melting pada suhu tinggi maka polymerase yang tahan panas akan terus dapat memperbanyak DNA sesuai dengan jumlah primer yang ada. Setelah proses PCR selesai, segmen DNA yang diinginkan akan teramplifikasi hingga mencapai miliaran salinan (amplikon) (Geggier et al., 2011; Khandelwal & Bhayavabhotla, 2010; Wartell & Benight, 1985).

Proses PCR melalui tiga tahapan utama yang berulang (*chain reaction*) atau disebut siklus yaitu denaturasi, hibridisasi atau aneling, dan elongasi atau ekstensi (Gambar 1). Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik target digunakan untuk membuat hybrid

dengan ujung 5' menuju 3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan. Dasar dari siklus PCR ada 30-35 siklus, yaitu denaturasi: 95°C selama 30 detik, anneling: 55-60°C selama 30 detik dan ekstensi: 72°C yang tergantung pada panjang pendeknya ukuran DNA yang akan diamplifikasi (Fatchiyah et al., 2011).



**Gambar 1.** Mekanisme proses amplifikasi DNA dalam mesin PCR (NCBI, 2025)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

Denaturasi adalah suatu proses pembukaan ikatan berganda suatu DNA menjadi bagian tunggal yang

terpisah dengan memanfaatkan sifat ikatan hydrogen pada DNA. Proses denaturasi atau pelemahan ikatan hydrogen pada DNA dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu dengan panas, alkali seperti NaOH, DMSO, urea dan formamid. Meskipun, ikatan hydrogen terbuka namun struktur dasar (back bone) pada DNA yang tersusun dari gugus fosfat dan gugus gula yang mengikat basa nitrogen (Adenin, Timin, Guanin dan Sitosin) tidak ikut berpisah (rusak). Penggunaan panas menjadi salah satu alternative yang digunakan untuk proses denaturasi DNA pada metode PCR (Blanco & Blanco, 2017; Tuan & Houng, 2005).

Denaturasi DNA dapat dipantau dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm. Dalam keadaan alaminya, DNA menyerap lebih sedikit cahaya UV dibandingkan rantai polinukleotida yang terpisah, yang disebut hipokromisitas. Saat DNA dipanaskan perlahan, absorbansi cahaya UV meningkat (efek hipokromik) hingga mencapai suhu tertentu dimana DNA sepenuhnya terdenaturasi dan absorbansi tidak meningkat lagi. Temperatur dimana separuh dari DNA terdenaturasi disebut DNA melting temperature (Tm) (Blanco & Blanco, 2017). Suhu Tm ditentukan dengan rumus empiric yaitu  $Tm = \{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}$  (Wallace et al., 1980). Selain dengan metode empiric, perhitungan Tm dapat dilakukan dengan alat penghitung suhu Tm berbasis WEB ataupun aplikasi seperti NEB Tm (Wallace et al., 1980), OligoAnalyzer (Gibrat et al., 2008) dan primer 3 (Untergasser et al., 2012) yang dikembangkan berdasarkan penelitian sebelumnya.

Proses selanjutnya setelah denaturasi adalah annealing. Annealing adalah proses DNA yang mengalami renaturasi atau penyatuhan kembali DNA yang terpisah menjadi DNA beruntai ganda (Blanco & Blanco, 2017). Proses ini dimanfaatkan sebagai proses penempelan primer di template DNA pada proses PCR. Penentuan

suhu annealing menjadi sangat penting karena dapat mempengaruhi produk PCR yang dihasilkan (Rychlik et al., 1990). Suhu annealing dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti banyaknya pasang basa nitrogen dalam primer, komponen buffer, cetakan DNA dan suhu melting dari primer. Suhu annealing biasanya dioptimasi pada rentang 5°C dibawah suhu Tm (Fatchiyah et al., 2011).

Proses paska penempelan adalah pemanjangan untai DNA primer primer bersama dengan cetakan yang dalam istilah lain disebut ekstensi atau elongasi. Proses ekstensi dari DNA bergantung pada kestabilan suhu pada enzim DNA polymerase atau termostabil DNA polymerase dan cetakan DNA yang akan diamplifikasi. Suhu yang digunakan pada proses ini berkisar antara 70-75°C tergantung pada kandungan GC dan AT pada cetakan DNA (Montgomery et al., 2014; Su et al., 1996).

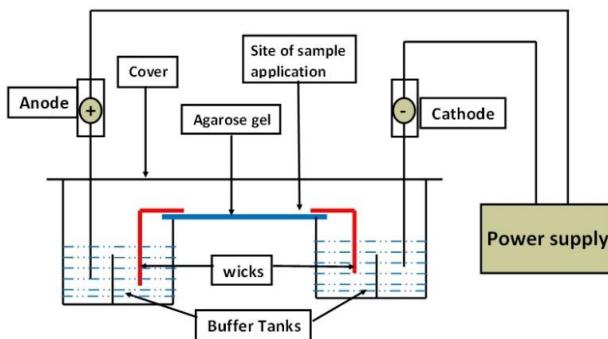
Ketiga proses ini terus berulang hingga siklus antara 26 hingga 30 siklus. Jika siklus ditambahkan melebihi 30 siklus maka dimungkinkan produk PCR mengalami penurunan atau memunculkan produk yang tidak spesifik (Bell & DeMarini, 1991; Nakayama et al., 1992). Selain itu, amplifikasi yang efisien dan spesifik dapat dilakukan dengan menurunkan jumlah siklus serta meningkatkan jumlah primer dan enzim polymerase sehingga dapat mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk PCR (Farrar & Wittwer, 2015; Millington et al., 2019).

## 2. Elektroforesis

Eletroforesis adalah suatu metode yang digunakan dalam bidang molekuler untuk memisahkan biomolekul seperti DNA, Protein, dan peptide berdasarkan muatan listriknya atau dengan kata lain suatu proses migrasi muatan listrik dari biomolekul dibawah pengaruh medan listrik. Metode ini ditemukan oleh seorang ahli biokimia asal Swedia yaitu Arne Tiselius pada tahun 1937 (Srinivas, 2019). Mekanisme pergerakan molekul dalam elektroforesis dipengaruhi oleh muatan, ukuran dan

bentuk molekul, serta pergerakan molekul yang memiliki muatan negatif akan senantiasa bergerak kearah kutub positif begitu juga sebaliknya molekul bermuatan positif akan bergerak kearah kutub negatif (Lee et al., 2012).

Komponen peralatan secara umum yang dibutuhkan dalam menjalankan elektroforesis yaitu buffer, sumbu (*wicks*), media pendukung, *cover* (penutup), catu daya atau *power supply* dan densitometer (Gambar 2). Buffer berfungsi sebagai pembawa arus dan mempertahankan pH medium, Sumbu berfungsi sebagai penghubung antara media pendukung dengan buffer untuk melengkapi sirkuit, media pendukung berfungsi menyediakan matrik dimana pemisahan terjadi, penutup berfungsi mengurangi penguapan buffer dan mencegah kontaminasi selama proses elektroforesis, catu daya berfungsi sebagai penyedia medan listrik untuk menggerakkan partikel bermuatan (DNA ataupun protein) dan densitometer yaitu berfungsi sebagai kuantifikasi pita yang terpisah yang dilakukan dengan perbandingan kerapatan optik pita (Sonagra & Dholariya, 2022).

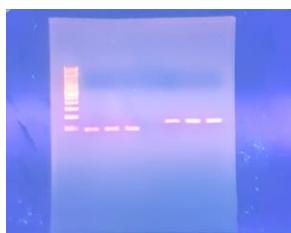


**Gambar 2.** Diagram Skema Peralatan Elektroforesis  
Disumbangkan oleh Amit Sonagra, MD (Sonagra & Dholariya,  
2022)

Metode elektroforesis telah diketahui secara luas dibidang molekuler sebagai salah satu metode yang

memisahkan molekul DNA yang didapatkan dari proses hasil PCR. Proses pemisahan molekul DNA menggunakan metode eletroforesis yaitu dengan memanfaatkan sifat muatan DNA yang bermuatan negatif. Muatan negatif dari DNA dikarenakan adanya gugus fosfat pada ikatan gula-fosfat yang membentuk struktur utama DNA, hal ini memungkinkan DNA berikatan kuat dengan protein histon yang bermuatan positif (Pierce, 2013).

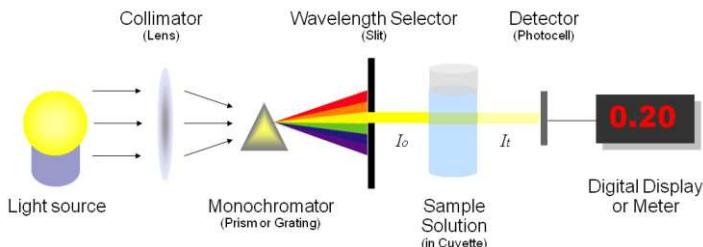
Proses pemisahan DNA dengan metode elektroforesis umumnya menggunakan gel agarose yang secara efektif memisahkan fragmen DNA berkisar antara 100 bp hingga 25 kb (Sambrook & Russel, D, 2000). Agarose diisolasi dari rumput laut genus *Gelidium* dan *Gracilaria*, yang tersusun dari subunit agarobiosa (L- dan D-galaktosa) berulang. Selama proses gelasi, polimer agarosa berasosiasi secara non-kovalen membentuk jaringan bundle berpori sehingga dapat menyaring molekul DNA (Green & Sambrook, 2019). Pergerakan molekul DNA mengikuti model "*biased reptation*" dimana ujung depan bergerak maju dan menarik sisanya (Smith et al., 1989). Laju migrasi DNA pada gel dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu ukuran molekul DNA, konsentrasi agarosa, konformasi DNA, tegangan, keberadaan etidium bromide, jenis agarosa dan larutan penyanga. Setelah pemisahan DNA, molekul DNA yang terpisah divisualisasikan dibawah sinar UV (Gambar 3). (Adkins & Burmeister, 1996; Lee et al., 2012).



**Gambar 3.** Contoh hasil visualisasi DNA dari elektroforesis

### 3. Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengukur serapan sinar monokromatis yang melalui larutan berwarna pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detector fototube. Metode spektrofotometri didasari atas prinsip spektroskopi yang menangkap spectrum elektromagnetik seperti ultraviolet atau UV, visible dan inframerah. Secara sederhana spektrofotometri adalah suatu metode untuk mengukur seberapa banyak kandungan kimia yang menyerap cahaya dengan mengukur sinar cahaya yang melewati larutan sampel. Metode analisa ini dapat mengukur secara kuantitatif dari intensitas radiasi elektromagnetik pada satu atau lebih panjang gelombang dengan suatu detector. Rangkaian alat yang menggunakan prinsip spektrofotometry disebut spektrofotometer (Yudono, 2017).



**Gambar 4.** Struktur dasar dari spektrofotometer  
(LibreTexts, 2025)

Metode spektrofotometri juga digunakan sebagai salah satu metode untuk mengukur konsentrasi biomolekul seperti DNA. Konsentrasi DNA diukur dengan panjang gelombang sinar UV pada 260 nm. Spektrofotometri juga dapat menentukan kemurnian dari DNA menggunakan rasio panjang gelombang 260/280 dan 260/230. Kemurnian yang dapat diterima jika

menggunakan rasio 260/280 berkisar antara 1,8-2,0 dan rasio 260/230 berkisar antara 1,8-2,2 (Viljoen et al., 2022).

## DAFTAR PUSTAKA

- Adkins, S., & Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in Agarose Gels as Migrating Colored Bands: Applications for Preparative Gels and Educational Demonstrations. *Analytical Biochemistry*, 240(1), 17–23.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0325>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*.
- Bell, D., & DeMarini, D. (1991). Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic Acids Research*, 19 18, 5079.  
<https://doi.org/10.1093/NAR/19.18.5079>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Chapter 6 - Nucleic Acids. In A. Blanco & G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry* (pp. 121–140). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00006-9>
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Olivier, S., Steyn, R., Wtisberg, S., Artists, D., Chism, H., Kim, B., Probst, K., & Mcntee, S. (2005). *Biology Seventh Edition*.
- Farrar, J., & Wittwer, C. (2015). Extreme PCR: efficient and specific DNA amplification in 15-60 seconds. *Clinical Chemistry*, 61 1, 145–153.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.228304>
- Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widayarti, S., & Rahayu, S. (2011). *Biologi Molekuler; Prinsip Dasar Analisis*.
- Geggier, S., Kotlyar, A., & Vologodskii, A. (2011). Temperature dependence of DNA persistence length. *Nucleic Acids Research*, 39(4), 1419–1426.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq932>
- Gibrat, G., Assairi, F. L., Blouquit, Y., Craescu, C. T., & Bellissent-Funel, M. C. (2008). Biophysical study of thermal denaturation of apo-calmodulin: Dynamics of native and unfolded states. *Biophysical Journal*, 95(11), 5247–5256.  
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120147>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by Agarose

- Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1).  
<https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>
- Jonathan D. K. (2015). The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Dig Dis Sci*, 60(8), 2230-2231.  
<https://doi.org/10.1007/s10620-015-3747-0>.
- Khandelwal, G., & Bhyravabhotla, J. (2010). A phenomenological model for predicting melting temperatures of dna sequences. *PLoS ONE*, 5(8), 1-9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012433>
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56(2), 341-361. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90469-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90469-4)
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 62.  
<https://doi.org/10.3791/3923>
- LEHMAN, I. R., BESSMAN, M. J., SIMMS, E. S., & KORNBERG, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 233(1), 163-170.
- LibreTexts. (2025). *Spectrophotometry*.  
[https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Kinetics/Reaction\\_Rates/Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/Spectrophotometry.pdf](https://batch.libretexts.org/print/Letter/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry.pdf)
- Millington, A., Houskeeper, J., Quackenbush, J., Trauba, J., & Wittwer, C. (2019). The kinetic requirements of extreme qPCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17.  
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100081>
- Montgomery, J. L., Rejali, N., & Wittwer, C. T. (2014). The influence of nucleotide sequence and temperature on the activity of

- thermostable DNA polymerases. *Journal of Molecular Diagnostics*, 16(3), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.01.006>
- Mullis, K. B. (1994). *PCR and Scientific Invention : The Trial of DuPont vs . Cetus.*
- Nakayama, H., Yokoi, H., & Fujita, J. (1992). Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Nucleic Acids Research*, 20 18, 4939. <https://doi.org/10.1093/NAR/20.18.4939>
- NCBI. (2025). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Ncbi.Nlm.Nih.Gov. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- Pierce, B. A. (2013). *Genetics: A Conceptual Approach*. W. H. Freeman. <https://books.google.co.id/books?id=lSdDnQEACAAJ>
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. 18(21), 6409–6412.
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (2000). Molecular Cloning, 3-Volume Set: A Laboratory Manual. In *Cold Spring Harboc Laboratory Press* (Vol. 3, p. 999). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>
- Smith, S. B., Aldridge, P. K., & Callis, J. B. (1989). Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4888), 203–206. <https://doi.org/10.1126/science.2911733>
- Sonagra, A. D., & Dholariya, S. J. (2022). *Electrophoresis*. StatPearls [Internet].
- Srinivas, P. R. (2019). Introduction to Protein Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1855, 23–29. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_2)
- Stevens, W. C. (2012). Introduction to botany. *Introduction to Botany*. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.54988>
- Su, X. Z., Wu, Y., Sifri, C. D., & Wellemes, T. E. (1996). Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Research*, 24(8), 1574–1575. <https://doi.org/10.1093/nar/24.8.1574>

- Tuan, V., & Houng, V. T. T. (2005). Some results on asymptotic stability of order  $\alpha$ . *Ukrainian Mathematical Journal*, 57(2), 296–306. <https://doi.org/10.1007/s11253-005-0189-4>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Viljoen, C. D., Booysen, C., & Sreenivasan Tantuan, S. (2022). The suitability of using spectrophotometry to determine the concentration and purity of DNA extracted from processed food matrices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 112, 104689. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104689>
- Wallace, R. B., J.Shaffer, R. F. M., J.Bonner, T. H., & K, I. (1980). Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research. *Methods*, 12(21), 8235–8251.
- Wartell, R. M., & Benight, A. S. (1985). Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment. *Physics Reports*, 126(2), 67–107. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0370-1573\(85\)90060-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0370-1573(85)90060-2)
- Yudono, B. (2017). *Spektrofotometri*. Simetri.

## BIODATA PENULIS



**Nyoman Yudi Antara, S.Si., M.Biotech** lahir di Ogan Komering Ilir, pada 12 Desember 1992. Menyelesaikan pendidikan D3 Teknologi Laboratorium Medis di Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Palembang, kemudian S1 Biologi di Fakultas Biologi Universitas Nasional dan S2 Bioteknologi di Fakultas Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Sampai saat ini penulis sebagai Dosen di Jurusan Biologi Prodi Bioteknologi di Universitas Halu Oleo, Kendari Sulawesi Tenggara.

# BAB 13

## Uji Bioaktivitas dan Toksisitas Produk

\*Ida Ayu Preharsini Kusuma, S.Si.,M.Biotech\*

### A. Pendahuluan

Perkembangan bioteknologi di berbagai bidang memberi pengaruh yang signifikan bagi umat manusia dalam menghasilkan produk. Produk bioteknologi dapat berupa antibiotik, probiotik, enzim, dan metabolit sekunder. Berbagai produk tersebut dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, industri makanan, pertanian dan pengelolaan lingkungan. Akan tetapi, produk-produk yang dihasilkan tersebut perlu menjalani tahapan pengujian guna menunjang efektivitas dan keamanannya. Pengujian yang dapat dilakukan adalah uji bioaktivitas dan uji toksisitas. Adanya tahapan pengujian tersebut diharapkan dapat mengoptimalkan efek dari produk yang dihasilkan dengan tetap mengontrol dampak yang tidak diharapkan dari produk tersebut bagi konsumen. Uji bioaktivitas sangat penting dalam tahap pengembangan produk guna menjamin efektivitasnya (Banoeari & Juwitaningsih, 2023). Selain uji bioaktivitas, uji toksisitas juga penting untuk dilakukan terhadap suatu produk. Hal ini disebabkan oleh adanya kemungkinan timbulnya efek samping yang tidak diharapkan. Salah satu contoh informasi yang diperoleh dari uji toksisitas adalah nilai LC50 (*Lethal Concentration 50%*) dan LD50 (*Lethal Dose 50%*) (Teku, 2020).

## B. Uji Bioaktivitas dan Toksisitas Produk

### 1. Uji Bioaktivitas

Pengujian bioaktivitas bertujuan untuk mengetahui mekanisme interaksi produk dengan sistem biologis. Hal ini merupakan tahapan yang penting karena mencakup penentuan efek biologis dari senyawa yang dihasilkan oleh agen terapi, termasuk potensi aplikasinya di bidang kesehatan, seperti produk antimikroba. Pengujian ini sangat penting guna mengembangkan produk antimikroba, memahami interaksi mikroba, dan menyelidiki potensi agen biologis dalam bidang bioteknologi dan kedokteran.

Resistensi antimikroba termasuk ancaman bagi kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Oleh sebab itu, upaya untuk menemukan dan mengembangkan obat baru untuk memerangi infeksi yang disebabkan oleh patogen bakteri karena pengobatan konvensional yang tidak efektif sangat penting untuk dilakukan. *Actinomycetes*, strain bakteri ordo *Actinomycetales*, adalah sumber antibiotik yang saat ini banyak digunakan dalam bidang kedokteran manusia maupun hewan (Genilloud, 2017). Oleh karena itu, *actinomycetes* dan metabolit sekunder bioaktif lain yang dimilikinya merupakan sumber antibiotik yang sangat baik. Pada umumnya, gen yang mengkode protein untuk produksi, resistensi, transportasi, dari metabolit sekunder, termasuk antibiotik, mengelompok dalam genom yang disebut *biosynthetic gene clusters* (BGCs) (Rütten et al., 2022). Terdapat dua tahapan uji bioaktivitas yang umum dapat dilakukan yaitu skrining primer dan skrining sekunder. Skrining primer bergantung pada prinsip difusi dan penghambatan pertumbuhan strain indikator (strain uji). Uji yang paling umum digunakan adalah uji difusi agar yang relatif sederhana dan bioautografi kromatografi lapis tipis (KLT). Uji difusi agar memainkan peran penting dalam diagnostik, di mana uji ini diterapkan untuk pengujian kepekaan antimikroba dengan menggunakan

zat murni guna mengidentifikasi antibiotik yang tepat untuk pengobatan yang lebih terarah. Dalam bidang penemuan obat, uji ini sangat berguna untuk skrining awal material dari produsen alami seperti *actinomycetes* (misalnya, supernatan kultur, ekstrak) (Hug et al., 2018). Skrining primer ini biasanya diikuti oleh skrining sekunder yang lebih spesifik untuk memungkinkan karakterisasi lebih lanjut dari senyawa tersebut. Bagian penting dari proses ini adalah penjelasan mekanisme kerja dari zat aktif yang diharapkan (Atanasov et al., 2021).

a. Skrining Primer: Pengujian Berbasis Difusi

Alur penemuan antibiotik dimulai dengan isolasi sampel (misalnya, *actinomycetes*) dari berbagai ekosistem. Umumnya, sampel tanah diekstraksi dan dilakukan pengenceran berseri, kemudian disebarluaskan pada media padat selektif untuk melakukan seleksi awal terhadap mikroorganisme. Setelah evaluasi morfologi pada cawan, kandidat yang menjanjikan (misalnya, koloni yang menyerupai *actinomycetes*) dipilih dan diperbanyak, biasanya dengan menggunakan berbagai media yang berbeda untuk mengeksplorasi potensi biosintesis isolat. Untuk *actinomycetes*, agar dengan miselium, supernatan kultur, serta ekstrak diuji menggunakan uji difusi agar.

Uji difusi agar “langsung” digunakan untuk skrining potensi penghasil antibiotik, seperti *actinomycetes*, dengan cara mengeksposnya secara langsung kepada strain indikator (juga disebut strain uji) pada medium padat. Pertama, mikroba penghasil antibiotik ditempatkan (spotting) pada medium agar dan diinkubasi dalam kondisi optimal (untuk *actinomycetes*, 28–37°C selama 5–14 hari). Setelah itu, permukaan agar dilapisi dengan suspensi strain indikator (kepadatan optik suspensi ini sangat

bergantung pada protokol yang ditemukan dalam literatur) (Singh et al., 2016).

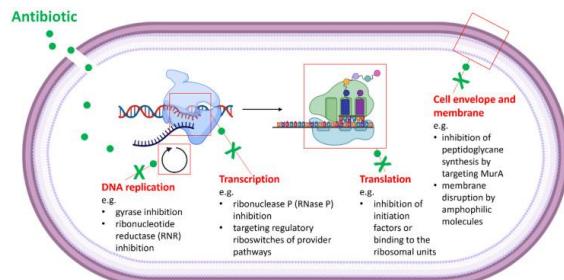
Selain itu, terdapat pengembangan metode difusi agar yaitu *The International Streptomyces Project-2 agar* (ISP-2; dikembangkan oleh Difco Laboratories pada *International Streptomyces Project*). Metode ini sering menjadi pilihan utama karena merupakan medium yang kaya nutrisi dan jernih. Hal ini meningkatkan kemungkinan produksi antibiotik serta mempermudah visualisasi dan evaluasi zona inhibisi pertumbuhan (Shrilng, E.B., Gottlieb, 1966). Agar ISP2 digunakan untuk modifikasi varian dari uji difusi agar "langsung" dengan tujuan evolusi laboratorium adaptif pada *actinomycetes*. Berdasarkan konsep metode ini, strain potensial penghasil antibiotik diaktifkan melalui kompetisi melawan patogen target (pemicu) dalam transfer serial mikroba penghasil antibiotik dan paparan terhadap patogen. Kompetisi ini diharapkan dapat meningkatkan laju mutasi. Mutasi yang mengaktifkan biosintesis antibiotik atau meningkatkan produksinya dibandingkan dengan strain prekursor dapat diidentifikasi melalui munculnya halo dan zona inhibisi yang lebih besar (Charusanti et al., 2012).

Metode lainnya yang dapat digunakan untuk skrining awal antibiotik adalah metode difusi cakram agar. Prosedur ini melibatkan pembuatan pelat uji yang diinokulasi dengan strain indikator serta penggunaan cakram kertas saring yang telah diberi larutan untuk menguji aktivitas antibiotik. Biasanya, 10–100  $\mu\text{L}$  larutan ditransfer ke cakram kertas saring. Untuk volume yang lebih besar, dapat dilakukan penambahan larutan dalam beberapa tahap dengan volume lebih kecil (misalnya, 50  $\mu\text{L}$ ) dan mengeringkannya di antara setiap penambahan, guna menghindari kelebihan muatan pada cakram dan

kemungkinan kehilangan larutan antibiotik. Berbeda dengan uji difusi agar “langsung”, metode difusi cakram agar memungkinkan pemeriksaan bahan berdasarkan konsentrasi (Sharma et al., 2016) serta perkiraan kasar dari konsentrasi hambat minimum/*minimal inhibitory concentration* (MIC) (Kumar et al., 2014) untuk senyawa murni dengan konsentrasi yang diketahui. Selain itu, berdasarkan ukuran zona inhibisi pada konsentrasi tertentu dari suatu antibiotik murni, kurva kalibrasi standar menggunakan persamaan linier dapat dibuat dan diterapkan untuk menentukan konsentrasi zat tersebut dalam sampel yang tidak diketahui (semi-kuantifikasi)

b. Skrining Sekunder: Pengujian Berbasis Target

Identifikasi target merupakan salah satu langkah paling krusial dalam pengembangan obat. Berbagai strategi telah dikembangkan untuk mengkarakterisasi target obat. Strategi tersebut mencakup pendekatan genomik, profil fenotipik/skrining, dan strategi biokimia. Skrining sekunder ini sering kali menggunakan dinding sel, DNA, RNA, ribosom, dan enzim dari jalur metabolismik sebagai target makromolekul (Gambar 1).



**Gambar 1.** Tinjauan tentang target umum antibiotik dan penghambatan proses seluler esensial (Rütten et al., 2022).

Pengujian yang dapat dilakukan adalah pengujian dengan menargetkan dinding sel. Komponen dinding sel sangat penting untuk banyak proses dalam sel (misalnya, pertumbuhan, pembelahan sel, dan daur ulang dinding sel) (Wang & Levin, 2009). Oleh karena itu, menemukan antibiotik yang menargetkan dinding sel patogen merupakan salah satu tujuan utama dalam bidang penemuan antibiotik. salah satu contohnya adalah uji *whole-cell* untuk menguji agen yang mengganggu biosintesis peptidoglikan (PG), termasuk penghambatan daur ulang dinding sel (Barbosa et al., 2002). Dalam uji ini, UDP-N-asetilglukosamin (UDP-GlcNAc) berlabel  $^{14}\text{C}$  diberikan kepada sel *E. coli* ATCC 47076 yang telah mengalami *freeze thaw* (proses pembekuan dan pencairan). Penggunaan UDP-GlcNAc berlabel  $^{14}\text{C}$  memungkinkan deteksi langsung PG yang terikat silang, yang menunjukkan adanya daur ulang dan regenerasi PG dalam sel. Ketika inhibitor (antibiotik) dari proses ini ditambahkan ke sampel, kerapatan optik ( $\text{OD}_{600}$ ) terpengaruh, dan radioaktivitas yang lebih rendah terdeteksi dibandingkan dengan senyawa kontrol negatif (tanpa penambahan antibiotik). Fungsionalitas uji ini dikonfirmasi dengan menggunakan inhibitor PG yang sudah diketahui (misalnya, fosfomisin, basitrasin, flavomisin), yang menghambat pembentukan PG berlabel radioaktif, serta senyawa yang tidak menargetkan enzim jalur PG sebagai kontrol negatif (tidak ada efek yang diamati untuk kanamisin/streptomisin, atau norfloksasin). Penerapan pendekatan *whole-cell* untuk inhibitor biosintesis peptidoglikan dalam kombinasi dengan uji enzimatik menggunakan enzim yang dimurnikan menghasilkan identifikasi dua senyawa baru (Cpd1 dan Cpd2) yang secara spesifik menghambat enzim sintesis PG (misalnya, MurA) Pada konsentrasi 50  $\mu\text{M}$ ,

Cpd1 dan Cpd2 masing-masing menghambat uji ini sebesar 25% dan 50% (Barbosa et al., 2002).

Pengujian lainnya adalah pengujian inhibitor sintesis DNA. Dengan adanya penghambatan sintesis DNA, maka perbanyakannya sel dapat dicegah. Target utama untuk penghambatan proses ini pada bakteri adalah DNA girase (topoisomerase), karena enzim ini memiliki peran penting dalam replikasi, rekombinasi, dan transkripsi DNA (Bush et al., 2015).

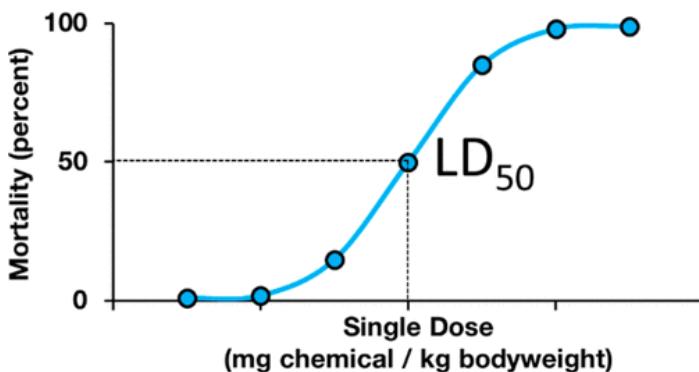
## 2. Uji Toksisitas Produk

Uji toksisitas adalah suatu pengujian untuk menentukan seberapa potensial dari suatu zat untuk dapat menjadi racun dan mengeliminasi risiko yang mungkin dapat terjadi pada manusia setelah dipaparkan suatu zat tertentu. Pengujian biasanya dilakukan dengan menggunakan hewan coba. Uji toksisitas adalah bagian dari salah satu cabang ilmu yaitu toksikologi, ilmu yang mempelajari tentang deteksi, kejadian, sifat, efek, dan regulasi zat beracun. Lebih dari itu, Uji toksisitas dirancang secara metodologi untuk mendapatkan jawaban dari beberapa pertanyaan penting seperti; apakah zat bersifat toksik? Apa kandungan kimia didalam zat tersebut? Berapa konsentrasi zat tersebut? Bagaimana kita dapat menguji efek toksik, dan berapa kadar minimum efek toksik dapat dideteksi? (Hodgson, 2005).

Pengujian toksisitas umumnya terbagi menjadi pengujian secara *in vivo* untuk melihat efek keracunan akut, subkronik, kronik, dan pengujian *in vitro* untuk menguji genotoksisitas atau transformasi sel serta pengujian secara *in silico* (Hodgson, 2005; Raies & Bajic, 2016). Suatu produk dapat dikategorikan aman apabila melewati beberapa tahapan pengujian berdasarkan metode yang ditetapkan dalam pengujian toksisitas. Secara umum untuk mengukur tingkat toksisitas suatu produk dilakukan dengan menilai paparan zat, identifikasi zat berbahay, kemudian dilakukan penilaian dosis-respon,

hingga mengkarakterisasi hubungan risiko dengan produk (Nordberg et al., 2007).

Paparan zat biasanya dilakukan untuk mengetahui kandungan zat atau kandungan kimia suatu paparan atau produk yang akan diujikan, selanjutnya dilakukan penilaian dosis yang dilakukan menggunakan studi secara *in vivo*. Studi *in vivo* dilakukan menggunakan hewan coba untuk menentukan median dosis letal atau *Lethal Dosis 50* (LD<sub>50</sub>). Konsep LD<sub>50</sub> dikembangkan oleh Trevan pada tahun 1927. Metode pengujian dirancang untuk mendapatkan kurva dosis-respons dengan menggunakan beberapa hewan (minimal 5/jenis kelamin) pada setiap dosis uji. Secara sederhana LD<sub>50</sub> adalah pengujian terhadap dosis suatu zat yang ketika diberikan akan membunuh 50% dari kelompok hewan coba dalam waktu tertentu. Nilai LD<sub>50</sub> yang lebih rendah mengindikasikan tingkat toksitas yang lebih tinggi. Dengan demikian semakin sedikit zat yang dibutuhkan untuk membunuh 50% dari populasi uji. LD<sub>50</sub> ditentukan berdasarkan jumlah zat per kilogram berat badan (Gambar 1) (mg/Kg) (Hodgson, 2005; Kojima et al., 2023).



Gambar 2. Kurva LD<sub>50</sub> (Morris-Schaffer & McCoy, 2021)

Metode perhitungan toksitas menggunakan LD<sub>50</sub> yang ditemukan oleh Trevan bukan satu-satunya metode

perhitungan yang dapat digunakan. Metode lainnya seperti analisis Probit oleh Finney (Finney, 1971) dan Litchfield dan Wilcoxon (Litchfield & Wilcoxon, 1949) juga dapat digunakan untuk perhitungan LD50. Namun, dari ketiga metode tersebut metode Trevan yang paling mendekati dalam perhitungan LD50 (Pillai et al., 2021).

Penentuan LD50 juga memiliki variasi dalam penggunaan hewan coba khususnya yang digunakan untuk mengevaluasi toksisitas akut. Beberapa metode seperti metode Graphical oleh Miller dan Tainter, Metode Aritmatika oleh Reed dan Muench, Metode Aritmatika oleh Karbar dan Metode Lorke telah banyak digunakan sebagai referensi untuk pengujian *in vivo* dalam menentukan LD50. Namun, beberapa metode tersebut tidak masuk atau diterima secara regulasi sebaliknya metode yang disetujui secara regulasi adalah metode *Fixed Dose Procedure* (FDP), *Acute Toxic Class* (ATC), dan *Up and Down Procedure* (UDP) yang dikembangkan oleh *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) (Erhirhie et al., 2018). Selanjutnya, peneliti asal Nigeria mengajukan suatu metode yang diyakini lebih baik dari metode sebelumnya dengan akurasi yang baik, jumlah hewan coba yang lebih sedikit, biaya yang terjangkau, sederhana dan memakan waktu yang lebih singkat (Tabel 1)(Chinedu et al., 2013).

**Tabel 1.** Perbandingan Metode yang Berbeda (Akhila et al., 2007)

Parameter	Metode Lorke	Metode Karber	Metode <i>Up and Down</i>	Metode Chinedu et al., 2013
Akurasi Hasil	Tidak Pasti	Tidak Pasti	Akurat	Akurat
Jumlah Hewan Coba	Sedikit	Banyak	Sedikit	Sedikit
Pengeluaran Biaya	Sedang	Tinggi	Sedang	Sedang
Kesederhanaan Proses	Sederhana	Rumit	Sederhana	Sederhana
Durasi	Lebih Singkat	Lebih singkat	Lebih lama	Lebih singkat

Metode yang dikembangkan oleh Enegeide Chinedu, David Arome dan Fidelis Solomon Ameh mempunyai tiga tahapan dan satu uji konfirmasi. Setiap hasil dari setiap tahapan menentukan apakah langkah selanjutnya dapat dilanjutkan ataupun tidak (Chinedu et al., 2013).

**Tahapan pertama** merupakan tahapan inisiasi yang membutuhkan empat hewan coba dan keempat hewan coba dibagi kedalam empat kelompok. Kemudian variasi dosis dari zat atau produk diberikan pada masing-masing hewan coba. Hewan coba di amati setelah satu jam pemberian zat/produk dan selanjutnya diamati selama 10 menit setiap dua jam dalam kurun waktu 24 jam. Tanda-tanda perilaku hewan coba dan kematian dicatat. Jika tidak ada kematian dalam tahapan ini maka uji coba dilakukan ke tahapan kedua.

**Tahapan kedua** adalah tahapan lanjutan yang menggunakan tiga hewan coba yang didistribusikan kedalam tiga kelompok. Variasi konsentrasi dengan dosis tinggi diberikan kepada hewan coba yang berbeda (Dosis tertinggi adalah 5000 mg/kg) kemudian diamati setelah satu jam pemberian dosis zat/produk dan diamati selama 24 jam secara periodik. Tanda-tanda perilaku hewan coba dan kematian dicatat. Jika tidak ada kematian dalam tahapan ini maka uji coba dilakukan ke tahapan ketiga.

**Tahap ketiga** ini juga memerlukan tiga hewan yang dibagi menjadi tiga kelompok yang masing-masing terdiri dari satu hewan. Berbagai dosis tinggi zat uji (dengan 5000 mg/kg sebagai dosis tertinggi) diberikan kepada hewan yang berbeda. Pengamatan dilakukan selama 1 jam setelah pemberian dan kemudian 10 menit setiap 2 jam selama 24 jam. Tanda-tanda toksisitas perilaku dan juga kematian harus dicatat. Ini adalah tahap akhir pengujian dan jika tidak ada kematian yang dicatat pada tahap ini, LD50 zat uji dikatakan lebih besar dari 5000 mg/kg dan karenanya memiliki tingkat keamanan yang tinggi.

Selanjutnya jika ketiga tahapan diselesaikan tanpa ada kematian ataupun pada tahapan pertama terjadi kematian hewan coba maka dilakukan tes konfirmasi dengan memberikan dosis terendah pada dua hewan coba yang diamati satu jam setelah pemberian dosis dan 10 menit setiap dua jam selama 24 jam. Hasil dikatakan valid jika setidaknya satu hewan coba mati. Begitu juga untuk dosis yang melewati ketiga tahapan tanpa adanya kematian hewan coba, maka tahapan konfirmasi dilakukan dengan memberikan dosis sebesar 5000 mg/kg ke dua hewan coba dan diamati satu jam setelah pemberian dosis dan 10 menit pengamatan setiap 2 jam dalam kurun waktu 24 jam. Hasil dikatakan valid jika tidak ada kematian pada pemberian dosis 5000 mg/kg.

Pengujian toksisitas dengan salah satu metode yang disebutkan dalam buku ini tidak terlepas dari tujuan dilakukannya pengujian yaitu untuk melihat tingkat keamanan suatu zat atau produk yang akan digunakan oleh manusia ataupun cemaran yang berpotensi merusak lingkungan. Pengujian secara *in vivo* menjadi satu tahapan penting untuk menilai tingkat toksisitas suatu zat atau produk yang nantinya akan digunakan dalam kehidupan baik bagi manusia maupun bagi lingkungan atau ekosistem. Berikut beberapa jenis hewan yang digunakan sebagai hewan coba dan disesuaikan dengan metode uji toksisitas yaitu seperti tikus, mencit, anjing, ikan, udang-udangan dan burung. Pengujian tergantung pada object yang akan diteliti, namun penggunaan hewan coba juga wajib mempertimbangkan regulasi atau etika yang ada (Bower et al., 2022; Worth, 2019).

Berdasarkan pemaparan mengenai uji bioaktivitas dan toksisitas di atas, maka dapat disimpulkan bahwa untuk mempercepat kemajuan dalam penemuan produk, dalam hal ini adalah antibiotik, metode yang memfasilitasi skrining primer dan sekunder terhadap ekstrak kasar maupun senyawa yang dimurnikan sangat diperlukan.

Tentunya, metode skrining ini dapat diterapkan dan lebih lanjut dioptimalkan untuk karakterisasi aktivitas antimikroba dalam material yang diperoleh dari produsen atau sumber lain (misalnya, senyawa yang disintesis secara kimia). Adapun uji toksitas berperan dalam mengontrol senyawa bioaktif dari hasil uji bioaktivitas telah sesuai dengan ketentuan sebelum diproduksi secara massal. Oleh sebab itu, dua metode pengujian produk ini saling berkaitan dalam tahap pengembangan obat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akhila, J. S., Shyamjith, D., & Alwar, M. C. (2007). Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Current Science*, 93(7), 917–920. <http://www.jstor.org/stable/24099255>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., ... Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Banoeari, A. T., & Juwitaningsih, T. (2023). Kajian Aktivitas Antibakteri Dan Toksisitas Ekstrak Biji Telang. *CHEDS: Journal of Chemistry, Education, and Science*, 7(2), 254–261. <https://doi.org/10.30743/cheds.v7i2.8523>
- Barbosa, M. D. F. S., Yang, G., Fang, J., Kurilla, M. G., & Pompliano, D. L. (2002). Development of a whole-cell assay for peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(4), 943–946. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.943-946.2002>
- Bower, Nancy, Achanzar, William E, Boulifard, Virginie, Brinck, Peter R, Kittel, Birgit, & Vahle, John L. (2022). The Dog as a Second Species for Toxicology Testing Provides Value to Drug Development. *International Journal of Toxicology*, 41(6), 431–441. <https://doi.org/10.1177/10915818221125670>
- Bush, N. G., Evans-roberts, K., & Maxwell, A. (2015). DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus*, 6(2), 1–34. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014>
- Charusanti, P., Fong, N. L., Nagarajan, H., Pereira, A. R., Li, H. J., Abate, E. A., Su, Y., Gerwick, W. H., & Palsson, B. O. (2012). Exploiting adaptive laboratory evolution of *streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. *PLoS ONE*, 7(3).

- https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033727
- Chinedu, E., Arome, D., & Ameh, F. S. (2013). A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology International*, 20(3), 224–226.  
https://doi.org/10.4103/0971-6580.121674
- Erhirhie, E. O., Ihekwereme, C. P., & Ilodigwe, E. E. (2018). Advances in acute toxicity testing: Strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology*, 11(1), 5–12. https://doi.org/10.2478/intox-2018-0001
- Finney, D. . (1971). Probit Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(9), 1432.  
https://doi.org/10.1002/jps.2600600940
- Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, 34(10), 1203–1232.  
https://doi.org/10.1039/c7np00026j
- Hodgson, E. (2005). A Textbook of Modern Toxicology, 3rd Edition. In *Chemical Health & Safety* (Vol. 12, Issue 2).  
https://doi.org/10.1016/j.chs.2005.01.009
- Hug, J. J., Bader, C. D., Remškar, M., Cirnski, K., & Müller, R. (2018). Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. *Antibiotics*, 7(2).  
https://doi.org/10.3390/antibiotics7020044
- Kojima, H., Nakada, T., Yagami, A., Todo, H., Nishimura, J., Yagi, M., Yamamoto, K., Sugiyama, M., Ikarashi, Y., Sakaguchi, H., Yamaguchi, M., Hirota, M., Aizawa, S., Nakagawa, S., Hagino, S., & Hatao, M. (2023). A step-by-step approach for assessing acute oral toxicity without animal testing for additives of quasi-drugs and cosmetic ingredients. *Current Research in Toxicology*, 4(August 2022), 100100.  
https://doi.org/10.1016/j.crtox.2022.100100
- Kumar, P. S., Al-Dhabi, N. A., Duraipandiyan, V., Balachandran, C., Kumar, P. P., & Ignacimuthu, S. (2014). In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12866-014-0291-6
- Litchfield, J. T. J., & Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of

- evaluating dose-effect experiments. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96(2), 99–113.
- Morris-Schaffer, K., & McCoy, M. J. (2021). A Review of the LD50 and Its Current Role in Hazard Communication. *ACS Chemical Health & Safety*, 28(1), 25–33. <https://doi.org/10.1021/acs.chas.0c00096>
- Nordberg, G. F., Gerhardsson, L., Broberg, K., Mumtaz, M., Ruiz, P., & Fowler, B. A. (2007). CHAPTER 7 - Interactions in Metal Toxicology. In G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg, & L. T. Friberg (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)* (Third Edit, pp. 117–145). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012369413-3/50062-8>
- Pillai, S. K., Kobayashi, K., Michael, M., Mathai, T., Sivakumar, B., & Sadasivan, P. (2021). Dose (LD50 John William Trevan's concept of Median Lethal /LC50) – more misused than used. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. <https://doi.org/10.26444/jpccr/139588>
- Raies, A. B., & Bajic, V. B. (2016). *In silico toxicology : computational methods for the prediction of chemical toxicity*. 6(April), 147–172. <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>
- Rütten, A., Kirchner, T., & Musiol-Kroll, E. M. (2022). Overview on Strategies and Assays for Antibiotic Discovery. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ph15101302>
- Sharma, P., Kalita, M. C., & Thakur, D. (2016). Broad spectrum antimicrobial activity of forest-derived soil actinomycete, Nocardia sp. PB-52. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00347>
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). *Methods for Characterization of Streptomyces Species*. 16(1946), 340.
- Singh, V., Haque, S., Singh, H., Verma, J., Vibha, K., Singh, R., Jawed, A., & Tripathi, C. K. M. (2016). Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications.

- Frontiers in Microbiology*, 7(DEC).  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01921>
- Teku, R. C. (2020). *Uji Toksisitas Akut Fermentasi Buah Berenuk*. 1–9.
- Wang, J. D., & Levin, P. A. (2009). Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol.*, 7(11), 822–827.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2202>.Metabolism
- Worth, A. P. (2019). Chapter 1.2 - Types of Toxicity and Applications of Toxicity Testing. In M. Balls, R. Combes, & A. B. T.-T. H. of A. T. M. in T. Worth (Eds.), *History of Toxicology and Environmental Health* (pp. 7–10). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813697-3.00002-0>

## BIODATA PENULIS



**Ida Ayu Preharsini Kusuma, S.Si,M.Biotech.** lahir di Denpasar, pada 27 November 1991. Menyelesaikan pendidikan S1 di Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Udayana dan S2 di Program Studi Magister Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada. Sampai saat ini penulis sebagai Dosen di Program Studi Bioteknologi, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Halu Oleo, Kendari, Sulawesi Tenggara.



MEDIA  
PUSTAKA INDO

PT MEDIA PUSTAKA INDO  
Jl. Merdeka RT4/RW2  
Binangun, Kab. Cilacap, Provinsi Jawa Tengah  
No hp. 0838 6333 3823  
Website: [www.mediapustakaindo.com](http://www.mediapustakaindo.com)  
E-mail: mediapustakaindo@gmail.com

