

Identifikasi Spesies Isolat Bakteri Galur D dengan Metode Analisa Sekuen Fragmen Gen 16S rDNA

Laras Nurwati dan Refdinal Nawfa

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: refnawfa@chem.its.ac.id

Abstrak— Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi spesies isolat bakteri galur D dengan menggunakan pengujian secara genotip. Isolat bakteri galur D merupakan bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber mata air panas Songgoriti, Malang. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies isolat bakteri galur D dengan metode analisa sekuen fragmen 16S rDNA. Kromosom isolat bakteri galur D diisolasi dan diamplifikasi menggunakan PCR, selanjutnya dilakukan analisa sekuen fragmen gen 16S rDNA. Hasil analisa dibandingkan dengan sekuen 16S rDNA yang terdaftar di Bank Gen untuk mengetahui homologinya dengan bakteri lain. Hasil analisa ini menunjukkan fragmen gen 16S rDNA memiliki kecocokan dengan *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* dengan homologi sebesar 99%.

Kata Kunci— Fragmen gen 16S rDNA; PCR; *Caldicellulosiruptor kristjanssonii*.

I. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan beriklim tropis yang banyak memiliki sumber daya alam seperti kawah gunung berapi maupun sumber air panas. Sumber air panas ini memiliki potensi mengandung organisme termofilik. Termofilik secara umum diartikan sebagai organisme yang hidup pada suhu di atas 45 °C. Organisme ini menarik minat ilmuwan terutama setelah ditemukan bakteri-bakteri yang hidup pada suhu didih air atau bahkan lebih tinggi. Bakteri termofilik merupakan bakteri dengan kemampuan bertahan hidup pada kondisi panas sampai dengan ekstrim panas, bahkan bakteri termofilik ada yang mampu bertahan hidup pada suhu 250 °C [1].

Bakteri termofilik berhasil diisolasi sebanyak 86 jenis bakteri termofilik penghasil amilase dengan suhu pertumbuhan optimum 40-70 °C dari sumber air panas Rimbo Panti [2]. Bakteri termofilik juga berhasil diisolasi dari sumber air panas Danau Ranau Sumatera selatan dan didapat dua isolat yang merupakan genus *Bacillus sp* [3]. Bakteri jenis *Geobacillus thermoleovorans* diisolasi dari sumber air Gedong Songo dan diidentifikasi dengan metode analisis gen 16S rDNA yang dapat tumbuh pada kisaran suhu 65-70 °C [4].

Berdasarkan penelitian tentang isolasi bakteri termofilik dari sumber mata air panas Songgoriti dengan sampel air panas yang diambil pada suhu 50 °C dengan pH 5,5 diperoleh isolat bakteri galur D yang kemudian dilakukan pengujian fenotip menggunakan uji pewarnaan gram, uji fermentasi glukosa dan uji Na⁺. Pengujian pada isolat bakteri galur D tersebut menunjukkan isolat bakteri

termasuk bakteri gram negatif, memiliki sel berbentuk batang, positif terhadap uji fermentasi glukosa dan positif terhadap uji Na⁺. Berdasarkan pengujian secara fenotip ini, disimpulkan bahwa isolat bakteri galur D merupakan *Vibrio sp* [5].

Meski demikian, identifikasi menggunakan pengujian berdasarkan sifat fenotip memiliki kelemahan karena sifat fenotip bakteri dapat berubah sesuai dengan keadaan lingkungannya yang dapat menyebabkan bakteri berevolusi [6], sehingga diperlukan pengujian identifikasi bakteri menggunakan pengujian secara genotip dengan mengetahui sekuen basa nitrogen pada nukleotida penyusun fragmen gen 16S rDNA. Metode ini memiliki keunggulan dibandingkan menggunakan pengujian fenotip karena urutan basa nitrogen dari seluruh spesies bakteri yang telah ditemukan dapat dijadikan pedoman apabila ditemukan spesies baru.

Pada penelitian ini, karakterisasi bakteri termofilik dari isolat bakteri galur D ditentukan sampai tingkat spesies dengan dilakukan amplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil amplifikasi ini kemudian di sekuen untuk mengetahui fragmen gen 16S rDNA yang kemudian dicocokkan dengan database dari bank gen.

II. METODELOGI PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat peralatan gelas, mikropipet 1-10 µL, tabung eppendorf, tabung PCR, microwave, parafilm, tip putih, satu peralatan elektroforesis (Biorad Power PAC 300), satu set peralatan purifikasi, satu set peralatan pembuatan gel agarosa, sentrifuge, inkubator dan PCR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kultur cair isolat bakteri galur D, SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 10%, proteinase K konsentrasi 10 mg/ml, larutan PCI (Fenol: kloroform: isoamil alkohol perbandingan 25: 24: 1), etanol absolut dingin, etanol 70%, ddH₂O, buffer Te (Tris EDTA), buffer STE (Saline Tris EDTA), enzim DNA *polymerase*, primer *forward* dan *reverse*, stok dNTP mengandung dTTP; dATP; dGTP; dan dCTP, buffer PCR, MgCl₂, larutan EtBr, agarosa, buffer TAE (Tris Asetat EDTA), marker DNA 1 kb (Intron Biotechnology).

B. Isolasi DNA Kromosom Bakteri Galur D

Kultur cair isolat bakteri D sebanyak 10 ml dipisahkan dengan sentrifus dalam tabung eppendorf 1000 µL selama 2 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Supernatan yang terbentuk dibuang, endapannya disuspensi dengan menambahkan buffer STE sebanyak 500 µL. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan dipisahkan dengan

sentrifus selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pellet di resuspensi dengan 500 μ L buffer TE dan 100 μ L SDS 10%. Larutan dihomogenkan, kemudian ditambah 10 μ L proteinase K dan di inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Setelah inkubasi, ditambahkan 500 μ L larutan PCI. Larutan dipisahkan dengan sentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit, diambil larutan bagian atas sebanyak 400 μ L dan dipindahkan ke tabung eppendorf steril lain. Etanol absolut dingin sebanyak 800 μ L ditambahkan kedalam larutan, selanjutnya didinginkan pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 30 menit. Setelah didinginkan, tabung eppendorf dipisahkan dengan sentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Supernatan yang diperoleh dibuang dan endapan diresuspensi dengan etanol 70 %. Larutan dipisahkan dengan sentrifus kembali selama 10 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Endapan yang diperoleh dikeringkan menggunakan evaporator. Endapan kering di resuspensi dengan menambahkan 50 μ L ddH₂O.

C. Pembuatan Gel Agarosa

Bubuk agarosa sebanyak 0,4 gram dilarutkan dalam 40 ml buffer TAE. Campuran dipanaskan dengan microwave selama 2 menit. Larutan selanjutnya dituangkan ke dalam chamber elektroforesis, setelah mengeras ditambahkan buffer TAE hingga gel terendam.

D. Pemisahan DNA Kromosom Galur D dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Loading buffer sebanyak 3 μ L disiapkan pada lembar parafilm. Sampel hasil isolasi DNA ditambahkan sebanyak 7 μ L ke dalam loading buffer. Marker DNA dimasukkan ke dalam lubang sumur paling ujung di gel agarosa. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan tegangan 5 V/cm, setelah itu gel direndam dalam larutan EtBr selama 10 menit untuk proses pewarnaan. Selesai pewarnaan, gel agarosa direndam dalam air selama 1 menit. Pengamatan migrasi DNA dilakukan menggunakan lampu UV transiluminator.

E. Amplifikasi Fragmen 16S rDNA

Larutan DNA cetakan sebanyak 5 μ L, reagen multimax PCR sebanyak 25 μ L, primer *forward* 5'CACGGTCTTCTTCGCCCTC(A/T)CGCCGTT-3' sebanyak 5 μ L, primer *reverse* 3'GTGAAGCTTACGGYTACCTTGTTACGACTT-5' sebanyak 5 μ L (Promega Corporation, USA) dan ddH₂O sebanyak 10 μ L dimasukkan ke dalam tabung PCR dengan pengaturan suhu prapemisahan 95 $^{\circ}$ C selama 5 menit, suhu pemisahan 95 $^{\circ}$ C selama 30 detik, suhu penempelan primer 60 $^{\circ}$ C selama 30 menit dan suhu perpanjangan rantai 72 $^{\circ}$ C selama 1 menit.

F. Pemurnian Produk Amplifikasi dengan Gel Agarosa

Hasil amplifikasi diambil sebanyak 30 μ L dimasukkan ke eppendorf, kemudian ditambahkan ddH₂O sebanyak 70 μ L dan *binding buffer* sebanyak 500 μ L. Campuran dipisahkan dengan sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Larutan yang terpisah dibuang, ditambahkan buffer pencuci sebanyak 500 μ L dan dipisahkan dengan sentrifus kembali. Pencucian dengan buffer dilakukan dua kali. Tabung pemisah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, ditambahkan ddH₂O sebanyak 25 μ L dipisahkan dengan sentrifus kembali. Larutan yang diperoleh pada dasar dipisahkan dengan gel elektroforesis.

G. Analisa Sekuen Fragmen Gen 16S rDNA

Larutan hasil pemurnian produk amplifikasi di analisa dengan sekuen fragmen gen 16S rDNA menggunakan *primer forward*.

H. Analisa Filogenetik Gen 16S rDNA dari Isolat Bakteri Galur D yang Diidentifikasi

Urutan sekuen fragmen gen 16S rDNA yang diperoleh selanjutnya diupload ke bank gen melalui program BLAST pada website www.ncbi.nlm.nih.gov untuk mengetahui kemiripannya dengan gen 16S rDNA yang sudah dilaporkan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi DNA Kromosom Bakteri galur D

DNA kromosom bakteri galur D yang berhasil di isolasi dilarutkan dalam ddH₂O dan disimpan dalam suhu -20 $^{\circ}$ C sebelum di analisa menggunakan elektroforesis.

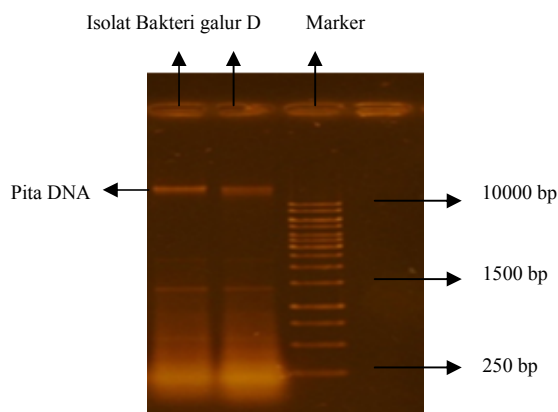


Gambar 1. Hasil isolasi DNA kromosom bakteri galur D

B. Pemisahan DNA Kromosom Galur D dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Uji elektroforesis dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA hasil isolasi serta ukuran DNA tersebut. Uji elektroforesis ini menggunakan alat elektroforesi dan marker DNA berukuran 250-10000 bp. Hasil elektroforesis tersaji pada Gambar 2.

Pada gambar terdapat dua jalur migrasi DNA isolat bakteri galur D. Pita pertama terdapat diatas 10000 bp. Hal ini menunjukkan adanya molekul dengan ukuran lebih dari 10000 bp. Pita yang tipis mengindikasikan konsentrasi molekul yang terseparasi pada daerah ini rendah, sedangkan adanya pita di 1500 dan 250 bp menunjukkan adanya molekul lain yang diduga merupakan DNA plasmid.

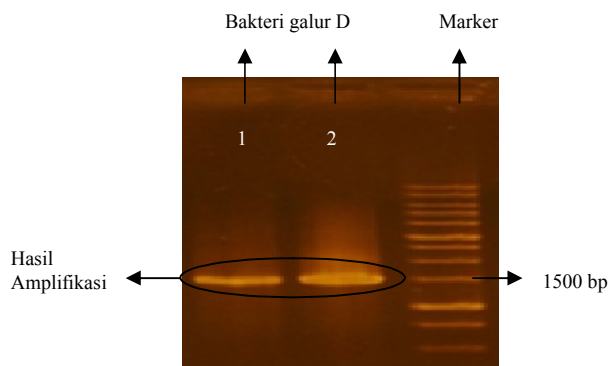


Gambar 2. Pola pita elektroforesis DNA kromosom isolat bakteri galur D

C. Amplifikasi Fragmen 16S rDNA

Amplifikasi fragmen gen 26S rDNA dilakukan menggunakan PCR sebanyak 25 siklus. Tiap siklus memiliki

tahap pengaturan suhu tertentu. Pada proses awal, diawali dengan tahap inisiasi dimana suhu ditahan (*hold*). *Hold* pertama berlangsung pada suhu 96 °C selama 5 menit. Fungsi inisiasi *hold* ini untuk mendenaturasi rantai DNA awal yang panjang agar terdenaturasi sempurna. Pada proses akhir dilakukan *hold* kedua yang berfungsi menyempurnakan perpanjangan rantai. Setelah tahap inisiasi masuk ke dalam tahap denaturasi untuk memisahkan rantai ganda menjadi rantai tunggal dengan cara memutuskan ikatan hidrogen menggunakan suhu tinggi. Suhu pada saat denaturasi 95 °C selama 30 detik. Kemudian dilanjutkan dengan tahap penempelan primer pada DNA rantai tunggal dengan suhu 60 °C selama 30 menit. Tahap ini dilanjutkan dengan proses perpanjangan rantai (*elongasi*) yang berjalan dengan suhu 72°C selama 1 menit.



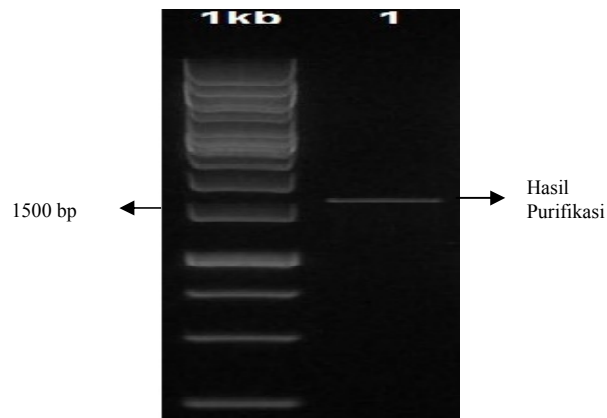
Gambar 3 Pita elektroforesis fragmen gen 16S rDNA bakteri galur D

Fragmen gen 16S rDNA yang telah di amplifikasi kemudian diuji dengan elektroforesis untuk mengetahui hasil amplifikasi. Dari hasil elektroforesis terdapat pita pada marker di daerah 1500 bp. Pada Gambar 3, hasil elektroforesis fragmen gen 16S rDNA bakteri galur D pada jalur migrasi ke-1 pita elektroforesis yang dihasilkan berupa pita tebal tanpa adanya pengotor dibandingkan dengan jalur migrasi ke-2 terlihat pita tebal dengan bagian yang terseparasi diatas daerah 1500 bp. Bagian yang melebar diatas 1500 bp diduga merupakan RNA Keberadaan RNA dalam larutan DNA disebabkan karena tidak ditambahkan enzim RNase pada prosedur ini [7]. Berdasarkan hasil ini, pita elektroforesis pada jalur migrasi 1 digunakan untuk proses pemurnian selanjutnya sebelum dilakukan analisa sekuensing.

D. Pemurnian Produk Amplifikasi dengan Gel Agarosa

Purifikasi hasil amplifikasi fragmen gen 16S rDNA dilakukan untuk menghilangkan sisa enzim *itaq*-polymerase, dNTP dan sisa reagen amplifikasi lainnya. Purifikasi ini penting dilakukan karena sisa reagen amplifikasi akan mengganggu proses analisa urutan sekuen fragmen gen 16S rDNA

Berdasarkan pita elektroforesis yang terlihat pada Gambar 4, terlihat ada satu pita berada di marker 1500 bp. Hal ini menunjukkan hanya terdapat satu jenis molekul fragmen gen 16 rDNA bakteri isolat D tanpa ada pengotor. Dari hasil ini, sampel hasil purifikasi ini dapat dilanjutkan ke uji sekuen fragmen gen 16S rDNA.



Gambar 4 Pita elektroforesis produk amplifikasi setelah purifikasi

E. Analisa Sekuen Fragmen Gen 16S rDNA

Analisa sekuen fragmen gen 16S rDNA dilakukan menggunakan software Sequence Scanner dari *Applied Biosystems*. Hasil purifikasi kemudian disekuensing. Primer yang digunakan primer *forward* seperti pada PCR. Dari hasil sekuen fragmen gen 16S rDNA didapat pada primer forward sebanyak 449 sekuen. Urutan basa nukleotidanya yaitu :

```
TNCGCTGGCGGCGTGCCTAACGCATGCAAGTCGAG
CGGAGATGGTAGCTGAAGGTGATGAGCTGGAAGCT
ATCATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGA
GCAACCTACCCTCAGCACGGGGATAACAGCTCGAA
AGGGCTGCTAATACCCGATGGGACCACGGCATCGC
ATGGTGCTGTGGTGAAAGGGTAGCCGGAGAGGCTA
TGCCGGCTGGGGATGGGCTCGCGGCCCATCAGCTA
GTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGCGCAGCAGCG
GTAGCGCCTGAGAGGGTGACGGCCACAGTGGGGA
CTGAGACACGGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCA
GCGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACG
CAGCGACCCGCGTGAGGGAAGAAGCCCTTCGGG
GTGTAAACCTCTTTGGACGGAGTAAGCTAG
```

Sekuon fragmen 16S rDNA yang didapat ini kemudian diunggah melalui program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada website *ncbi.nlm.nih.gov* untuk mengetahui homologinya dengan sekuen 16S rDNA bakteri lain yang telah terdaftar pada database bank gen untuk mengetahui spesies bakteri tersebut.

F. Analisa Filogenetik Gen 16S rDNA dari Isolat Bakteri Galur D yang di Identifikasi

Berdasarkan hasil sekuen fragmen gen 16S rDNA, didapat pada primer forward sebanyak 449 sekuen. Hasil jumlah sekuen yang didapatkan pada penelitian ini berbeda bila dibandingkan dngan uji elektroforesis yang diketahui bahwa fragmen 16S rDNA yang teramplifikasi memiliki ukuran sekitar 1500 bp. Hal ini dapat disebabkan antara lain konsentrasi dan stabilitas enzim polimerase yang digunakan ataupun lama reaksi pada proses sekuensing.

Menurut hasil sekuen yang telah dicocokkan dengan database bank gen, sekuen yang melekat pada primer forward homolog dengan *Caldicellusiruptor kristjanssonii* dengan kemiripan sebesar 99%, *Caldicellusiruptor lactoaceticus* 6A sebesar 99% dan *Caldicellusiruptor besicii* DSM 6725 (memiliki nama sinonim *Anaerocellum thermophilum* DSM 6725) sebesar 97%. Hasil sekuen ini menunjukkan tidak adanya kemiripan antara bakteri *Vibrio sp* dengan isolat bakteri galur D karena tidak ada homologi yang ditemukan.

Bakteri *Caldicellusiruptor kristjanssonii* ditemukan di sumber mata air panas di Islandia [8], termasuk bakteri anaerob berbentuk batang (2,8-9,4 x 0,7 μm), tidak dapat bergerak aktif (non motil), tidak memiliki spora dan termasuk bakteri gram negatif yang hidup pada kondisi ekstrim termofilik pada suhu 45-82 °C dengan suhu pertumbuhan optimal 78 °C. Bakteri *Caldicellusiruptor kristjanssonii* dapat hidup pada pH 5,5-8,0 dengan pH 7 sebagai derajat keasaman optimal pertumbuhan. Uji fermentasi glukosa pada *Caldicellusiruptor kristjanssonii* menghasilkan produk akhir berupa asam asetat, asam laktat, etanol dan asam format. Uji sensitifitas NaCl juga dilakukan dengan penambahan NaCl sebesar 1-2%, dimana pada penambahan tersebut tidak menghambat pertumbuhan *Caldicellusiruptor kristjanssonii*.

Bakteri *Caldicellusiruptor lactoaceticus* 6A yang diisolasi dari sumber mata air panas [9], merupakan bakteri anaerob yang hidup pada suhu 50-78 °C dengan suhu optimal pertumbuhan 68 °C. Bakteri ini merupakan bakteri anaerob berbentuk batang (1,5-3,5 x 0,7 μm), non motil dan tidak memiliki spora. *Caldicellusiruptor lactoaceticus* 6A dapat tumbuh pada pH 5,8-8,2 dengan pH 7 sebagai derajat keasaman optimal. Hasil fermentasi mayor *Caldicellusiruptor lactoaceticus* 6A berupa asam laktat, asam asetat dan gas hidrogen, sedangkan hasil fermentasi minor berupa gas karbon dioksida dan etanol. Uji NaCl yang dilakukan menggunakan NaCl 1% pada media pertumbuhan, dimana penambahan NaCl ini tidak menghambat pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan analisa hasil sekuensing yang diperoleh, hal ini berbeda dengan dugaan semula yang mengidentifikasi isolat bakteri galur D sebagai *Vibrio sp* dengan menggunakan beberapa pengujian seperti pewarnaan gram, uji fermentasi glukosa dan uji Na^+ [5]. Pengujian dengan uji Na^+ menggunakan NaCl 6% pada isolat bakteri galur D menunjukkan hasil positif, dimana bakteri dapat tumbuh pada media tersebut. Hal ini menunjukkan isolat bakteri galur D dapat hidup pada keadaan kadar mineral yang tinggi, sedangkan pada bakteri *Caldicellusiruptor kristjanssonii* pengujian yang dilakukan menggunakan NaCl 1-2%. Bakteri *Caldicellusiruptor lactoaceticus* 6A dalam pengujiannya menggunakan NaCl 1%. Kedua hasil yang diperoleh menunjukkan kadar NaCl yang ditambahkan pada media pertumbuhan bakteri menunjukkan bakteri tetap dapat hidup pada media tersebut dengan *Caldicellusiruptor kristjanssonii* memiliki toleransi lebih tinggi terhadap NaCl dibandingkan dengan *Caldicellusiruptor lactoaceticus* 6A. Kemampuan hidup *Caldicellusiruptor kristjanssonii* pada pH 5,5-8,0 sama dengan pH saat isolasi isolat bakteri galur D yaitu pH 5,5, sedangkan *Caldicellusiruptor lactoaceticus* 6A mampu hidup pada pH 5,8-8,2 sedikit lebih tinggi dibandingkan pH isolat bakteri galur D.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa dengan pengujian secara genotip menggunakan analisa sekuen fragmen gen 16S rDNA, isolat bakteri galur D memiliki homologi sebesar 99% dengan *Caldicellusiruptor kristjanssonii*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Vieille, C., Zeikus, G.J., (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanism for Thermostability. Biochemistry Department. Michigan State University, East Lansing. Michigan. Hal. 20.
- [2] Daniel. (2001). Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Amylase Pada Sumber Air Panas Rimbo Panti, Skripsi, Universitas Andalas, Padang.
- [3] Muharni. (2010). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. Jurusan Biologi FMIPA. Universitas Sriwijaya. Sumatera Selatan.
- [4] Helin, Y.S., Mulyani, N.S., Asy'ari, M., (2010). Identifikasi Fragmen Gen 16S rRNA bakteri termofilik Hasil Isolasi Dari Sumber Air Panas Gedong Songo. Skripsi. Universitas Diponegoro, Semarang.
- [5] Maria, Y.E.P., (2012). Isolasi Bakteri termofilik Dari Sumber Mata Air Panas dari Songgoriti. Tugas Akhir. KIMIA FMIPA. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.
- [6] Ochman, H., (2005). Genomes on The Shrink. Proc. Natl Acad Sci. USA. 102: 11959-11960.
- [7] Anam, Khoirul. (2012). DNA Rekombinasi. Sekolah Pascasarjana Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [8] Bredholt, S., Hansen, J.s., Nielsen, P., Mathrani, I.M., (1999). *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* sp. Nov., a cellulolytic, extremely thermophilic anaerobic bacterium. IJSEM. Vol 49: 991-996.
- [9] Mladenovska, Z., Mathrani, I.M., Ahring, B.K. (1995). Isolation and Characterization of *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* sp. Nov., an extremely thermophilic, cellulolytic, anaerobic bacterium, Arch Microbiol 163, 223-230.