

# IDENTIFIKASI SPESIES ISOLAT BAKTERI K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> DARI TANAH KARST DENGAN SISTEM KEKERABATAN MELALUI ANALISIS URUTAN NUKLEOTIDA GEN 16S rRNA

TINA DEWI ROSAHDI<sup>1\*</sup>, NURUL TAFIANI<sup>1</sup>, DAN ANGGITA RAHMI HAFSARI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Gunung Djati Bandung, Jl. A. H. Nasution No. 105 Cibiru Kota Bandung

<sup>2</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Gunung Djati Bandung, Jl. A. H. Nasution No. 105 Cibiru Kota Bandung

\*alamat email korespondensi: tina\_dr@uinsgd.ac.id

Informasi Artikel	Abstrak/Abstract
Riwayat Naskah : Diterima pada 19 Desember 2018 Diterima setelah direvisi pada 29 Januari 2019 Diterbitkan pada 30 Januari 2019	Bakteri adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Setiap bakteri memiliki jenis yang berbeda-beda. Perlu adanya identifikasi untuk mengetahui suatu jenis bakteri sehingga dapat dimanfaatkan secara maksimal. Identifikasi bakteri dapat dilakukan secara fenotip maupun genotip. Namun, identifikasi secara fenotip memiliki kelemahan yakni sering terjadi kesalahan dalam membedakan spesies dan galur bakteri. Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk menentukan spesies bakteri dengan kode K <sub>2</sub> Br <sub>5</sub> yang telah diisolasi dari kawasan tanah Karst. Pada penelitian ini dilakukan analisis secara genotip dengan mengisolasi DNA kromosom dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. K <sub>2</sub> Br <sub>5</sub> yang kemudian dilakukan proses amplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer universal BactF1 maju dan UniB1 mundur untuk memperoleh fragmen gen 16s rRNA. Fragmen gen yang diperoleh selanjutnya disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotide. Hasil analisis urutan nukleotida gen 16s rRNA menunjukkan bahwa bakteri <i>Bacillus</i> sp. K <sub>2</sub> Br <sub>5</sub> memiliki kemungkinan berkerabat dengan <i>Paraclostridium bifermentans</i> atau dikenal juga dengan nama <i>Bacillus bifermentans</i> .
<b>Kata Kunci:</b> fragmen gen 16s rRNA; <i>Bacillus</i> sp.; tanah Karst; PCR.	
<b>Keywords:</b> 16s rRNA gene fragment; <i>Bacillus</i> sp.; Land Karst; PCR.	<i>Bacteria are a group of organisms that do not have a cell nucleus membrane. Each bacteria has different types. There needs to be identification to find out a type of bacteria so that it can be utilized optimally. Identification of bacteria can be carried out phenotypically or genotypically. However, phenotypic identification has the disadvantage of frequent errors in distinguishing species and strains of bacteria. This study aims to identify bacterial species with the code K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> which has been isolated from the Karst soil region. In this study genotypic analysis was carried out by isolating chromosomal DNA from <i>Bacillus</i> sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> which was then amplified by PCR method using universal primer BactF1 maju and mundur UniB1 to obtain 16s rRNA gene fragments. The gene fragments obtained are then sequenced to determine the order of nitrogen bases. The results showed that <i>Bacillus</i> sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> has the possibility of being related to <i>Paraclostridium bifermentans</i> or <i>Bacillus bifermentans</i>.</i>

## PENDAHULUAN

Bakteri adalah kelompok organisme yang termasuk ke dalam domain prokariota dan berukuran kecil (mikroskopik), serta memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Setiap bakteri memiliki jenis yang berbeda-beda. Hal ini yang menyebabkan beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai agen penyebab infeksi dan penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat dibidang pangan, pengobatan, dan industri [1].

Untuk mengetahui jenis atau spesies bakteri diperlukan adanya identifikasi. Identifikasi merupakan upaya untuk mengetahui nama suatu makhluk hidup dalam suatu kelompok tertentu berdasarkan karakteristik persamaan dan

perbedaan yang dimiliki oleh masing-masing makhluk hidup. Identifikasi bakteri dilakukan dengan membandingkan ciri-ciri yang ada pada satuan yang belum diketahui dengan satuan-satuan yang sudah dikenal [2].

Proses identifikasi dilakukan dengan cara pengamatan terhadap organisme tersebut baik secara morfologi maupun fisiologi. Pengamatan secara morfologi dapat meliputi bentuk koloni, struktur koloni, bentuk sel, ukuran sel, bentuk *flagel*, dan pewarnaan endospore dari bakteri. Pengamatan secara fisiologi yaitu meliputi uji biokimia. Selain itu, identifikasi bakteri juga dapat dilakukan dengan cara identifikasi secara genetik, yaitu dengan mengisolasi DNA kromosom bakteri, selanjutnya diamplifikasi dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Ukuran DNA

hasil PCR selanjutnya diidentifikasi dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil elektroforesis akan menunjukkan karakteristik dari DNA yang dimiliki [3]. Urutan nukleotida selanjutnya disekuensing dengan metode dideoksi Sanger.

Salah satu jenis bakteri yang telah teridentifikasi adalah *Bacillus* sp. *Bacillus* sp. merupakan bakteri yang berbentuk batang, merupakan golongan bakteri gram positif, motil, dapat menghasilkan spora yang biasanya resisten pada panas, bersifat aerob (beberapa spesies bersifat anaerob fakultatif), katalase positif, dan oksidasi bervariasi. Setiap spesies pada bakteri ini berbeda dalam penggunaan gula, sebagian melakukan fermentasi dan sebagian tidak [4].

Seftia Maulani (2015) dalam penelitiannya mengenai isolasi dan identifikasi bakteri pada tanah rhizosfer di kawasan Karst Citatah Kabupaten Bandung Barat melaporkan bahwa terdapat beberapa genus bakteri yang berhasil diidentifikasi pada kawasan Karst, salah satunya adalah bakteri dengan kode K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> yang telah teridentifikasi memiliki genus *Bacillus* sp. Hasil tersebut didapatkan berdasarkan serangkaian pengujian yaitu, uji biokimia, pengamatan makroskopik, pengamatan mikroskopik (pewarnaan gram dan pewarnaan endospora) dan potensi bakteri *Bacillus* sp. Hasil uji fenotip menunjukkan bahwa bakteri dengan kode K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> termasuk bakteri gram positif, berbentuk batang, berwarna putih, tepian tak beraturan, elevasi datar dan permukaan mengkilat, sehingga disimpulkan bahwa bakteri dengan kode K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> memiliki genus *Bacillus* sp. [5].

Nurhayati et al (2011) dalam penelitiannya melaporkan bahwa identifikasi bakteri dengan uji fenotip kurang dapat memperjelas hasil identifikasi di tingkat strain [6]. Thoyibatun Nuroniyah dan Surya Rosa P (2017) juga dalam penelitiannya menyatakan bahwa identifikasi bakteri berdasarkan karakter fenotip memiliki kelemahan, yakni sering terjadi kesalahan dalam membedakan spesies dan galur bakteri. Hal ini disebabkan adanya karakter fenotipik bakteri yang tidak biasa. Karakter fenotipik bakteri tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan perubahan kondisi organisme dan lingkungan hingga menyebabkan evolusi [7].

Kelemahan identifikasi bakteri *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> karena menggunakan analisis fenotipik mendorong dilakukannya identifikasi bakteri dengan analisis genotip melalui pembacaan urutan nukleotida pada fragmen gen 16s rRNA bakteri. Metode ini dinilai lebih baik dibandingkan dengan metode analisis fenotipik, karena gen 16s rRNA dari hampir seluruh spesies bakteri telah ditentukan urutan basa nitrogennya sehingga dapat

dijadikan pedoman jika ditemukan spesies baru [8]. Selain itu urutan basa nitrogen gen 16s rRNA memiliki keragaman intraspesifik yang lebih rendah dibandingkan gen pengkode protein yang lain, serta sifat dari fragmen 16s rRNA yang lestari [9].

Berdasarkan hal di atas, dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi spesies bakteri *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> dengan mengisolasi DNA kromosom bakteri *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>. DNA kromosom yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi menggunakan PCR untuk memperoleh fragmen gen 16s rRNA. Fragmen yang diperoleh selanjutnya disekuensing untuk mengetahui urutan basa nitrogen dan untuk mengetahui homologinya dengan urutan basa nitrogen fragmen gen 16s rRNA bakteri lain yang telah terdata pada bank gen.

## EKSPERIMEN

### Material

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> yang berasal dari Laboratorium Genetika dan Molekuler Jurusan Biologi UIN Sunan Gunung Djati Bandung, bufer lisis 1x, NFW (*Nuclease Free Water*), enzim proteinase K, *Master Mix*, primer maju, primer mundur, Bufer TAE 1x, bubuk agarosa, Loading Dye, Marker 1 kb, Gel Red, plasmid pGEMT dan *E. coli* TOP10F

### Instrumentasi

Untuk mengamplifikasi gen 16s rRNA *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> digunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) C1000™ Thermal Cycler (Biorad, AS).

### Prosedur

#### Isolasi DNA kromosom *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>

Sebanyak 100 µL kultur cair bakteri *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL, kemudian disentrifugasi selama 10 detik dengan kecepatan 12000 rpm. Endapan yang di dapat ditambahkan dengan 200 µL buffer lisis 1x, 10 µL proteinase K dan 170 µL NFW (*Nuclease Free Water*). Campuran diinkubasi selama 1 jam pada suhu 50-55 °C di dalam *waterbath*. Kemudian enzim diinaktivasi pada suhu 95-100 °C selama 10 menit. Campuran disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 12000 rpm.

### Pembuatan Gel Agarosa

Sebanyak 0,35 gram agarosa dilarutkan dalam 35 mL bufer TAE 1x. Sesudah larut, larutan agarosa didiamkan hingga hangat, lalu dituangkan ke dalam alat pencetak gel agarosa dan didiamkan hingga memadat. Setelah padat, gel agarosa dimasukkan ke dalam loyang elektroforesis, kemudian bufer TAE dituangkan ke dalam loyang hingga gel terendam.

### Amplifikasi Fragmen 16s rRNA

Larutan sampel hasil isolasi DNA dimasukkan ke dalam tabung PCR sebanyak 7 µL, reagen master mix PCR 12,5 µL, BactF1 primer maju (5'-AGA GTT TGA TC (G/C) TGG CTC AG-3') 1 µL, Uni B1 primer mundur (5'-GGT TAC (G/C) TTG TTA CGA CTT-3') 1 µL (Promega Corporation, USA) dan NFW 3,5 µL. Selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam PCR dengan pengaturan suhu denaturasi awal 95°C selama 5 menit, suhu denaturasi lanjut 95°C selama 30 detik, suhu annealing 60°C selama 30 detik, suhu polimerisasi 72°C selama 1 menit dan suhu polimerisasi akhir 72°C selama 4 menit. Proses PCR ini dilakukan sebanyak 30 siklus.

Reagen multimix PCR merupakan reagen campuran yang mengandung enzim i-Taq DNA polimerase 5U/µL, 4 macam dNTP (dTTP, dCTP, dATP dan dGTP) masing-masing 2.5 mM, bufer PCR dan bufer loading gel. Setelah amplifikasi, dilakukan analisis gel elektroforesis. DNA hasil amplifikasi dimurnikan dan disekuensing di Macrogen, Korea

### Elektroforesis Gel Agarosa

Sebanyak 2 µL Gel Red ditambahkan ke dalam 10 µL sampel hasil isolasi DNA dan dihomogenkan, selanjutnya campuran sampel dimasukkan ke dalam lubang-lubang sumur pada gel agarosa. Penanda ukuran DNA dibuat dari campuran 4 µL NFW ditambah 1 µL Gel Red, 1 µL marker ukuran 1 kb dan 1 µL Loading Dye. Elektroforesis dilakukan selama 45 menit dengan tegangan 80 V/cm. Setelah proses elektroforesis, dilakukan pengamatan migrasi DNA pada gel agarosa menggunakan lampu UV transiluminator.

### Analisis Urutan Nukleotida Fragmen Gen 16s rRNA

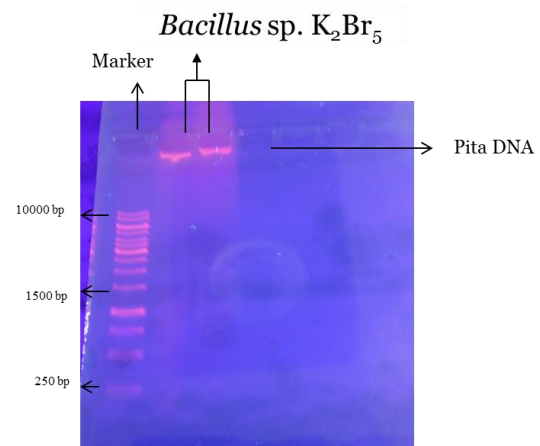
Analisis urutan nukleotida fragmen gen 16s rRNA dilakukan dalam satu reaksi dan primer yang digunakan adalah primer maju

yang juga dipakai pada proses amplifikasi fragmen 16s rRNA. Analisis urutan nukleotida fragmen gen 16s rRNA dilakukan dengan metode dideoksi Sanger. Urutan nukleotida pada fragmen gen yang diperoleh selanjutnya dianalisis melalui program BLAST pada untuk mengetahui kemiripannya dengan fragmen gen 16s rRNA bakteri lain.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

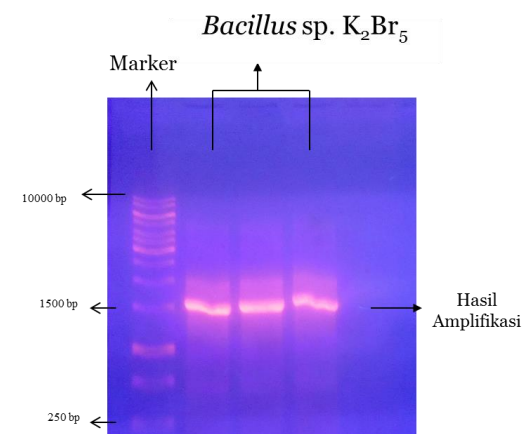
### Isolasi DNA Kromosom *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>

Hasil elektroforesis DNA kromosom bakteri *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> (Gambar 1) menunjukkan bahwa terdapat pita terang pada sumur gel. Pita DNA yang diperoleh berada lebih tinggi dari marker, hal ini dikarenakan DNA kromosom memiliki ukuran yang jauh lebih besar dibandingkan dengan marker [10]. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa hasil isolasi DNA kromosom *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> dengan metode lisis telah berhasil



**Gambar 1.** Elektroforegram DNA kromosom *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>

### Amplifikasi Fragmen 16s rRNA dan Analisis Sekuensing *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>



**Gambar 2.** Pita elektroforesis *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>

Hasil elektroforesis (Gambar 2) menunjukkan terdapat pita tunggal yang sejajar yaitu di daerah 1500 bp. Hasil tersebut sesuai dengan ukuran fragmen DNA untuk 16s rRNA berada pada daerah 1500 bp [11].

```
CACATGGATCTCGTGGTGGCTGCTTCATAATGGTTAACTAACCGGCTGGGGTGGCCAAATC
TCCGGGGGGGAAGGGGGGGGGGAAAGACCCGGGAAACCTTTTCCCGGAACCTTTTGAAT
CTGAAATTACAAGAAGTCCACCTTCTGGTAGCAAATTTCCACAGAACATCCGAAATGGA
AAAGGATTTTGAATTTGCCCGACCTCGGGTTGACATCCCTTTGACATGTACATTTGTA
ACATGTGTAGCCTAAATAAAGGGGGCTGAACATTTGACCTCTCCCACTTCTCGTGT
TTGTGTCGCCGAGTCCACCTAGAGTGACAATTTTCATGATGGCACTAAAGAAGGGGTT
GGCTCGTTGGGGGACTTAAACCAACATCTCACGACAGCTGACGACAAACATGACCA
CCTGTCACTTTGCCCAAGGAAACTCTCTTTCTCAAAGTCATTGGGGATGTAAGCA
TGGGTAAGGTTCTTTTGTGTTGCTTAAATTAACACATGCTCCCGCTGTGGGGGGC
CCCCGTCAATTTCTTTTAGTTTACTCTTGTGGGCTACTCTCACGGGAGAACTTAAATGC
GTTATCTGGCCACAGAAGGGGAAGACCCACAGCTAGTAGACATCGTTTACGGCGTG
GACTACAGGGTATCTAATCTGTTTCTCCCAAGCTTTCGTGCTCATTGTCAGTACAG
TCCAGAGACGCTTCGCTACTGGTGTCTCCCAATATCTACGCAATTCACCGTACTACTA
GAAATTTACCCTCTCTGCTCACTCAAGTCTGTTTAAAGCTGACTACGGGTTGG
AGGATAGGGTATTCACTTCTGACATAAAACACCCCTCCACCCGTTACTCCCGCCAAA
TCCGTGATAGCACCTGCCACCTACTGTTTACTCACGGGGCTGCTGTAAGTTAGTCAG
GGCGTGTCACTCTAATTACACTGCCAGTAAACATACCAT
```

**Gambar 3.** Urutan nukleotida gen 16s rRNA *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>

Hasil analisis urutan nukleotida menunjukkan bahwa fragmen gen 16s rRNA bakteri *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> mempunyai kekerabatan dengan bakteri *Paraclostridium bifermentans*, dengan nilai kesamaan basa (*max score*) dan presentase analisis keseluruhan (*query coverage*) pada primer maju dan mundur secara berturut-turut sebesar 722 dan 92%. Bakteri *Paraclostridium bifermentans* merupakan bakteri anaerob dan termasuk bakteri gram positif. Bakteri *Paraclostridium bifermentans* diketahui merupakan bakteri yang dapat membunuh larva nyamuk [12].

Bakteri *Paraclostridium bifermentans* ini mempunyai beberapa nama lain yaitu *Clostridium bifermentans*, *Martellillus bifermentans*, *Bacillus bifermentans*, *Bacillus bifermentans sporogenes*, dan *Bacillus centrosporogenes*. Bakteri ini biasanya ditemukan pada saluran pencernaan ternak dan manusia [13], lapisan tanah dan sedimen laut, sedimen danau, sungai dan rawa serta specimen klinik [14]. Bakteri *Paraclostridium bifermentans* memiliki nama lain dengan genus *Bacillus*.

## SIMPULAN

DNA kromosom *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> berhasil diisolasi yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada elektroforegram dan fragmen gen 16s rRNA bakteri *Bacillus* sp. K<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> memiliki kekerabatan dengan *Paraclostridium bifermentans*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM UIN Sunan Gunung Djati Bandung atas bantuan Dana Penelitian 2018.

## REFERENSI

- [1] JM Berg, JL Tymoczko, and L Stryer, *Molecular Cell Biology*.: WH Freeman, 2002.
- [2] J Pelezar and E.C.S Chan, *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press, 2008.
- [3] D Suryanto, "Mengenal Lintasan aerobik degradasi senyawa hidrokarbon aromatik monosiklik mikroorganisme," *Wartauniversitaria*, no. 18, pp. 92-94, 2004.
- [4] G.I Barrow and Feltham R.K.A, *Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: University Press, 1993.
- [5] Seftia Maulani, "Isolasi dan Identifikasi Bakteri pada Tanah Rhizosfer di Kawasan Karst Citatah Kabupaten Bandung Barat Serta Aplikasinya pada Perkecambahan Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annum* L.)," Bandung, 2015.
- [6] Nurhayati, Betty Sri Laksmi Jenie, Harsi D Kusumaningrum, and Sri Widowati, "Identifikasi Fenotipik dan Genotipik Bakteri Asam Laktat asal Fermentasi Spontan Pisang var. Agung Semeru (*Musa paradisiaca* formatypica)," 2011.
- [7] Thoyibatun Nuronyah and Surya Rosa Putra, "Identifikasi spesies isolat bakteri S1 dengan metode analisa sekuen fragmen gen 16s rDNA," *Jurnal Teknik POMITS*, vol. 1, pp. 1-6, 2012.
- [8] G Acinas Silvia, A Marcelino Luisa, F Polz Martin, and Klepac-ceraj Vanja, "Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons," 2004.
- [9] Oren A, *Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges*.: Philosophical Transactions of the Royal Society, 2004.
- [10] J Hodgkin, "Genome Size," in *Encyclopedia of Genetics*., 2001, p. 865.
- [11] JE Clarridge, *Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.: Clin. Microbiol. Rev., 2004.

- [12] Qureshi et al., "The Cry Toxin Operon of *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* Is Highly Toxic to *Aedes* Larval Mosquitoes," *Applied and Environmental Microbiology*, 2014.
- [13] RF Wang, WW Cao , and CE.Cerniglia , "PCR Detection and Quantification of Predominant Anaerobic Bacteria in Human and Animal Fecal Samples," *J. Appl. & Envi. Microbiol*, pp. 1242-1247, 1996.
- [14] L.D.S Smith, *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. USA: Thomas Publisher, 1975.