

Identification of Indigenous Bacteria from Dumai Sea Waters Using 16S rRNA Method

Esa Buana Fatwa^{1*}, Dessy Yoswaty¹, Irwan Effendi¹

¹Department of Marine Science, Faculty of Fisheries and Marine Universitas Riau
Corresponding Author: esabuanafatwa@gmail.com

Diterima/Received: 22 Agustus 2021; Disetujui/Accepted: 09 September 2021

ABSTRACT

Indigenous bacteria are bacteria that naturally live freely in nature and have a variety of benefits for humans. These bacteria also have the potential to degrade pollution bacteria in the water. This research was conducted in November-December 2020. The purpose of this study was to identify indigenous bacteria from Dumai sea waters using the PCR method of 16S rRNA sequence technique. Based on the results of the study based on the analysis of 16S rRNA it is known that isolate 10 belongs to the bacterium genus *Bacillus* and has a homological rate of 93% with *Bacillus paramycooides* bacteria. Based on the phylogenetic tree of isolate bacteria 10 does not have nodes associated with ten bacteria contained in NCBI. This suggests that phylogenetically indigenous bacteria ISL 10 have no species similarity to the ten bacterial isolates in the phylogenetic tree, but have a similarity of base order of 93% to *B. paramycooides*.

Keywords: Indigenous bacteria, 16S rRNA, Phylogenic, *B. paramycooides*.

1. PENDAHULUAN

Bakteri indigenous merupakan bakteri yang pada saat ini memberikan banyak manfaat pada pelbagai bidang kehidupan manusia. Bakteri Indigenous adalah bakteri yang dapat hidup secara bebas di alam dan biasanya merupakan bakteri asli dari daerah tersebut. Salah satu peranan dari bakteri indigenous adalah dalam hal pencemaran (Tanasupawat *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa bakteri indigenous cukup efektif dijadikan agen bioremediasi dalam hal penguraian limbah (Rochman *et al.*, 2016). Hal ini dikarenakan bakteri indigenous merupakan bakteri pengurai serat yang cukup resisten terhadap bahan-bahan pencemar seperti logam berat, tumpahan minyak, dan juga mikroplastik. Dalam proses metabolismenya bakteri akan memanfaatkan bahan-bahan pencemar tersebut sebagai sumber karbon dan nutrisi untuk kehidupannya menggunakan bantuan enzim yang berbeda pada masing-masing bakteri.

Untuk itu dibutuhkan suatu metode untuk mengetahui dan mengidentifikasi bakteri-bakteri indigenous lainnya secara cepat dan akurat agar bakteri ini dapat dimanfaatkan secara maksimal terutama dalam dunia ilmu pengetahuan dan teknologi (iptek) (Reimena, 2016).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi telah mengantarkan banyak kemudahan bagi kehidupan manusia, salah satunya dalam hal mengidentifikasi jenis suatu mikroorganisme yaitu bakteri. Saat ini metode yang paling banyak digunakan adalah metode analisis urutan DNA yang menyandi ge 16S rRNA. Metode ini biasanya digunakan untuk mengetahui kebaruan isolat bakteri yang ditemukan di alam.

Berdasarkan uraian tersebut, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang identifikasi bakteri indigenous dari perairan laut Dumai menggunakan metode 16S rRNA agar didapatkan hasil identifikasi yang tepat dan akurat.

2. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan November-Desember 2020. Untuk pengambilan sampel air dilakukan di perairan laut Dumai dan PCR serta sekuensing dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia Jakarta Barat.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *survey* yaitu secara langsung melakukan observasi di lapangan yang bertujuan

mendapatkan data primer.

Prosedur Penelitian

Isolasi DNA

Isolat bakteri yang telah diremajakan menggunakan media *Nutrient Broth* (NB) diambil sebanyak 1,5 ml kemudian dimasukkan kedalam tube yang berukuran 1,5 ml kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 60 detik. Selanjutnya ditambahkan 200 µl *buffer gram* dan dipanaskan dengan suhu 37°C selama 30 menit dan dibolak balik, kemudian dipanaskan kembali dengan suhu 60°C selama 10 menit dan ditambahkan 200 µl *GB buffer gram* dan dipanaskan dengan suhu 60°C selama 10 menit (Sogandi, 2018).

Setelah itu supernatan dipindahkan ke tube baru dan ditambahkan dengan etanol absolute sebanyak 200µl. Kemudian cairan dipindahkan ke GDC dan disentrifus kembali selama 2 menit, lalu GDC dipindahkan kedalam CT (*collection tube*) berukuran 2 ml dan ditambahkan 400 µl *W1 buffer* lalu disentrifus kembali selama 30 detik.

Selanjutnya supernatan dibuang dan ditambahkan 600 µl *wash buffer* dan disentrifus selama 30 detik, kemudian pasang kembali CT ke GDC dan disentrifus selama 3 menit untuk mengeringkan matriks lalu GDC dipindahkan ke tube 1,5 µl yang baru dan ditambahkan 60 µl elution buffer dibiarkan dalam suhu ruang selama 5 menit dan disentrifus kembali selama 60 detik

Amplifikasi

Amplifikasi PCR volume 50 µl dilakukan dengan menggunakan primer B27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' dan UI1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' dengan cara DNA diambil sebanyak 1 µl lalu dipindahkan kedalam tabung PCR berukuran 0,2 ml kemudian dimasukkan kedalam thermocycler PCR. Proses pra PCR dijalankan pada suhu 94°C selama 3 menit. Dalam proses amplifikasi terbagi menjadi tahapan denaturasi, penempelan primer dan reaksi polimerasi (Rizaldi *et al.*, 2018).

Elektroforesis DNA

Metode elektroforesis yang digunakan yaitu dengan gel agarose, yang dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu: pertama, persiapkan gel agarose yang disesuaikan dengan ukuran DNA fragmen yang dipisahkan ; kedua, DNA sampel dimasukkan kedalam lubang gel dan gel

diletakkan dibak elektroforesis yang dialiri listrik sehingga menghasilkan pemisahan yang baik ; ketiga, gel direndam dengan larutan TBE (*Tris Borate EDTA*) 1x yang telah digunakan pada gel penyangga elektroforesis. Selanjutnya dilakukan pengamatan band yang terbentuk.

Purifikasi Gel

Kegiatan purifikasi gel akan dilakukan menggunakan beberapa tahapan, yaitu:

Pemisahan Gel. Pertama ambil bagian dari gel agarose yang berisis fragmen DNA hasil PCR, dan buang kelebihan gel yang tidak mengandung DNA. Kemudian sebanyak ± 300mg gel agarose berisi fragmen DNA tersebut dimasukkan kedalam mikrosentrifuge 1,5 ml. Kemudian 500 µl ditambahkan ke dalam mikrosentrifuge, lalu dihomogenkan campuran tersebut menggunakan vortex. Setelah itu diinkubasi pada suhu 55°C selama 15 menit. Selama diinkubasi tube dibalikkan setiap 2-3 menit setelah itu campuran sampel dibiarkan dingin pada suhu ruang (Waluyo, 2007).

DNA Binding. Tempatkan kolom DF ke dalam tube 2 µl lalu pindahkan ± 700 µl campuran sampel dari tahap pemisahan gel kedalam kolom DF. Kemudian 30 µl DF buffer ditambahkan lalu disentrifuse selama 30 detik. Setelah itu caran dari tube dibuang dan disimpan kembali pada tube 2 µl. Jika campuran sampel lebih dari 800 µl, maka langkan akan diulangi kembali.

Pencucian (Wash). Di dalam kolom DF tersebut ditambahkan 400 µl *W1 Buffer*, lalu disentrifuse selama 30 detik. Kemudian ditempatkan kembali kolom tersebut pada tube 600 µl *wash buffer* (yang ditambahkan etanol), lalu dibiarkan selama 1 menit. Setelah itu dilakukan sentrifugasi terhadap kolom DF tersebut yang masih terpasang pada tube 2 µl selama 30 detik 14000-16000x. Kolom DF ditempatkan pada tube 2 µl baru, lalu disentrifugasi lagi 14000x selama 3 menit untuk mengeringkan matriks.

Elusi DNA. Setelah kolom DF tadi dikeringkan, kolom DF ditempatkan pada mikrosentrifus 1,5 mm yang baru. Setelah itu, kedalam kolom DF, ditambahkan TE (*Tris EDTA*) buffer 20-50 µl pada bagian tengah kolom matriks. Setelah itu, dibiarkan selama 2 menit sampai TE terserap sempurna kedalam matriks, lalu disentrifugasi 14000-16000x selama 2 menit untuk elusi DNA murni.

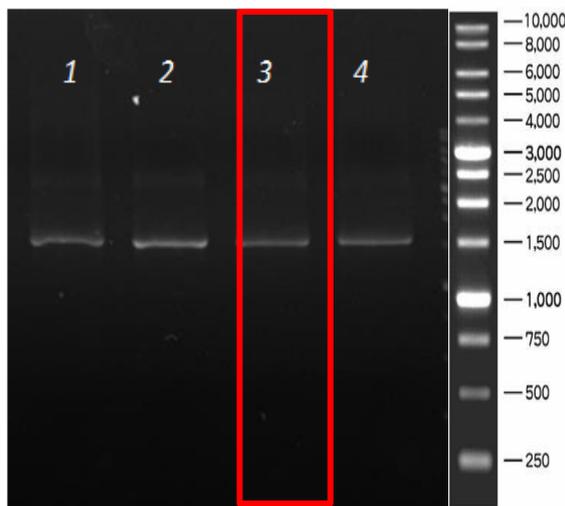
Analisis Sekuens

Data yang diperoleh dari hasil *sequence* dianalisis menggunakan teknik BLAST (*Basic Local Allignment Search Tool*) yaitu mencocokkan *sequence* DNA bakteri uji dengan *sequence* DNA bakteri yang ada di website NCBI dengan aplikasi MEGA 6 dan *Bioedit*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Elektroforesis DNA

Hasil ekstraksi DNA total di elektroforesis dengan menggunakan Gel agarose 0,8% dan larutan TBE 1x untuk menunjukkan DNA kromosomal yang telah dimurnikan yang diberi kode ISL 10. Hasil Elektroforesis DNA ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA

Berdasarkan (Gambar 1.) terlihat bahwa isolat 10 (no. 3) memiliki pita agak tebal dan tunggal. Tebalnya pita menandakan bahwa isolat tersebut memiliki 1500 bp, besarnya ukuran ini sesuai dengan yang diharapkan dari gen-gen 16S rRNA. Amplifikasi isolat bakteri yang memiliki pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan adalah primer spesifik untuk menganplifikasi gen 16S rRNA pada bakteri.

Sekuensing DNA

Dalam penelitian ini isolat yang dilakukan proses *sekuensing* yaitu ISL 10. *Sekuensing* adalah proses pengurutan basa nitrogen dengan menggunakan mesin ABI 3130 *Genetic Analyzer*. Bentuk dari hasil sekuensing ISL 10 dalam bentuk elektrogram dengan siklus

terpisah (*forward* dan *reverse*). Pasangan basa yang telah diperoleh selanjutnya digabungkan serta dirapikan dengan menggunakan software *BioEdit* 7.0 (Waluyo, 2018).

Analisis BLAST dan Pohon Filogenetik

Berdasarkan hasil analisis BLAST dengan merujuk pada *Gen Bank* melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menunjukkan bahwa ISL 10 memiliki nilai homologi antara 92-93% terhadap jenis bakteri yang terdapat didalam *GenBank*. Menurut Drancourt *et al.* (2000) berdasarkan dari urutan gen 16S rRNA homologi $\leq 97\%$ dapat dinyatakan bahwa isolat yang dibandingkan berada pada genus yang sama. Sedangkan nilai homologi antara 89-92% menunjukkan famili yang berbeda dan apabila memiliki kemiripan (homologi) basa nukleotida $< 70\%$ bakteri bisa dikatakan spesies baru.

Pendapat yang serupa juga dijelaskan oleh Hagstrom *et al.* Dalam Feliatra (2011) bahwa isolat yang mempunyai persamaan homologi lebih dari 97% dapat mewakili pada tingkat spesies yang sama. Persamaan homologi antara 93-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesies, sedangkan jika dibawah 93% kemungkinan merupakan spesies baru yang urutan basa nitrogennya belum terdapat dalam data *GenBank*.

Isolat 10 (ISL 10) memiliki nilai homologi sekitar 93% terhadap bakteri *Bacillus paramycoides*. Hal ini berarti dilihat dari tingkat homologinya ISL 10 masih berada dalam satu genus dengan bakteri *B. paramycoides*, yakni dari genus *Bacillus*.

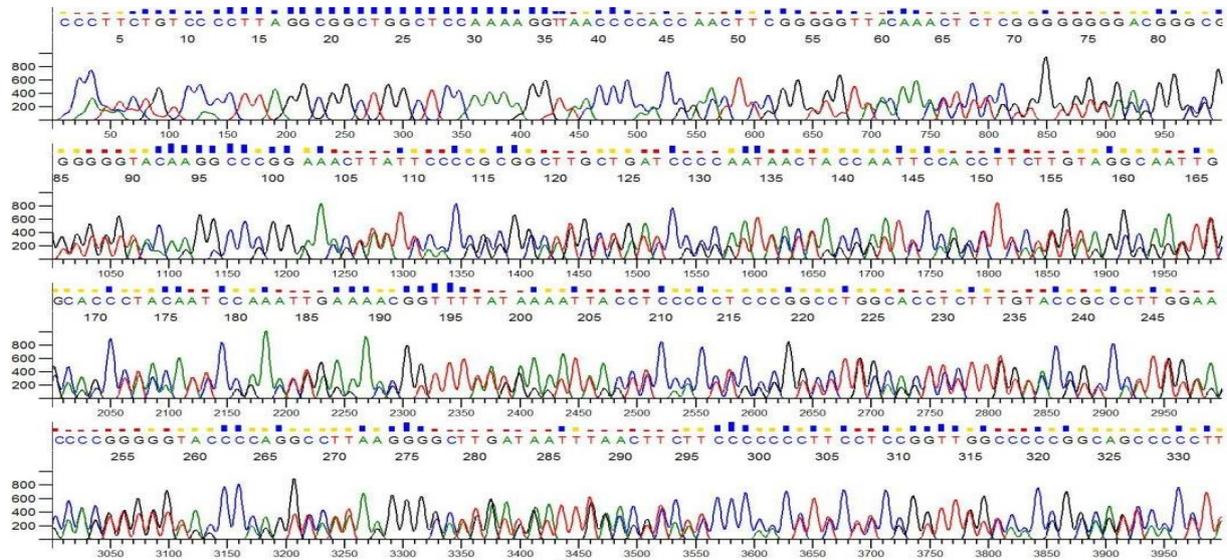
Pohon filogenetik pada (Gambar 3.) diperoleh dengan metode *neighbor-joining* dengan Bootstrap 1000 kali ulangan dalam program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) software versi 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Berdasarkan hasil pada pohon filogenetik (Gambar 3.) menunjukkan bahwa bakteri indigenous ISL 10 tidak berada pada cabang atau *node* yang sama dengan bakteri-bakteri yang ada didalam pohon filogenetik. Bakteri ISL 10 mempunyai cabang tersendiri yang terpisah dari kesepuluh bakteri yang ada dalam pohon filogenetik, tetapi didalam tabel homologi BLAST (Tabel 1).

Diketahui bahwa ISL 10 mempunyai homologi sekuensing 16S rRNA yang paling dekat dengan *B. paramycoides*. Hal tersebut menunjukkan bahwa secara filogenetik bakteri indigenous ISL 10 tidak mempunyai kesamaan

Identification of Indigenous Bacteria from Dumai Sea Water

spesies dengan kesepuluh isolat bakteri di dalam pohon filogenetik, tetapi mempunyai

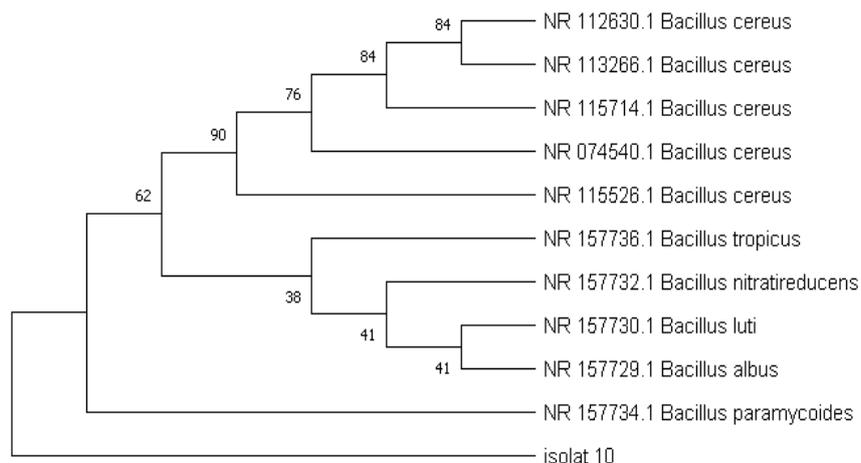
kemiripan urutan basa sebesar 93% dengan *B. paramycoides*



Gambar 2. Elektroforegram DNA Bakteri ISL 10

Tabel 1. Hasil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Kode NCBI	Nama Spesies	Panjang Sekuen (bp)	Persentase Homologi
-	ISL 10	1492	100%
NR_157734.1	<i>Bacillus paramycoides</i>	1509	93%
NR_157736.1	<i>Bacillus tropicus</i>	1509	92%
NR_157732.1	<i>Bacillus nitratireducens</i>	1509	92%
NR_157730.1	<i>Bacillus luti</i>	1509	92%
NR_157729.1	<i>Bacillus albus</i>	1509	92%
NR_115526.1	<i>Bacillus cereus</i>	1486	92%
NR_074540.1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	1512	92%
NR_115714.1	<i>Bacillus cereus</i>	1535	92%
NR_112630.1	<i>Bacillus cereus</i>	1476	92%
NR_113266.1	<i>Bacillus cereus</i>	1474	92%



Gambar 3. Pohon Filogenetik Bakteri ISL 10

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil identifikasi dengan menggunakan

analisis 16S rRNA diketahui bahwa bakteri indigenous ISL 10 yang berasal dar perairan

laut Dumai memiliki kemiripan urutan basa (homologi) sebesar 93% dengan *B.paramycoides* sehingga dapat dikatakan masih berada dalam satu genus yang sama yaitu *Bacillus*.

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melanjutkan penelitian mengenai enzim apa yang terdapat pada bakteri indigenous tersebut melalui analisis zimografi sehingga diketahui manfaat lebih lanjut dari bakteri indigen yang ditemukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Drancourt, M. A. Carlouz., C. Bollet dan D. Roul. (2000). 16S Ribosomal DNA Sequene Analysis of a Large Collection of Enviromental and Clinic Unidentifiable Bacterial Isolates. *J. Clin Microbial.* 38: 3623-3630
- Feliatra, F., T. Nugroho, T. Silalahi, dan S.Y. Oktavia. (2011). Skrining Bakteri *Vibrio* sp Asli Indonesia sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16S Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis.* 3(2): 85-99.
- Reimena, R. (2016). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat genus *Pediococcus* sp dari Feses Orang Sumatra (*Pongo abelii*). *Skripsi.* Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Syiah Kuala.
- Rizaldi, R., W. H. Setyantini dan Sudarno. (2018). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik yang Berasosiasi dengan Lamun (*Enhalus acoroides*) di Pantai Bama, Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur. Departemen Manajemen Kesehatan Ikan dan Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga. 10 (1).
- Rochman, C.M., A. Tahir, S.L. Williams, D.V. Baxa, R. Lam, dan J.T. Miller. (2016). Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *J. Nature.* 15(32): 77-97.
- Sogandi. (2018). *Biologi Molekuler Identifikasi Secara Molekuler.* Jakarta: Garuda
- Tamura, K., A. Filipiski, D. Peterson, G. Stecher, dan S. Kumar. (2013). MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) software versi 6.0: *Mol. Bio and Evol.* 30:2725-2729.
- Tanasupawat, M. K., M. Shahnawaz, dan A. B. Ade. (2016). A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *J Bioremed Biodeg.* 3(10): 1-9.
- Waluyo, L. (2007). *Mikrobiologi Umum.* Penerbit Universitas Muhammadiyah. Press Malang.
- Waluyo, L. (2018). *Teknik Metode Dasar dalam Mikrobiologi.* Penerbit Universitas Muhammadiyah. Press Malang