

Identifikasi Molekuler Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin dari Rizosfer Umbi Dahlia

Deristiana Dewata^{#1}, MindaAzhar^{#2}, Budhi Oktavia^{#3}

[#]Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jln. Prof Hamka Air Tawar Barat Padang, Indonesia Telp. 0751-7057420

¹deristiana.dewata@gmail.com

²minda@fmipa.unp.ac.id

³budhi_akt@yahoo.com

Abstrak—Gen 16S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi spesies bakteri secara molekuler. Pada penelitian telah dilakukan identifikasi molekuler gen 16S rRNA isolat bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi Dahlia yang diberi kode RZ-01. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan spesies isolat bakteri RZ-01. Isolasi DNA kromosom bakteri dilakukan dengan metode yang dimuat pada *Wizard Genomic Purification Kit by Promega*. DNA kromosom isolat bakteri RZ-01 diidentifikasi dengan elektroforesis DNA. Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan metoda *Polymerase Chain Reaction (PCR)* menggunakan primer BactF1 dan UniB1. Amplikon produk PCR adalah gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01, kemudian ditentukan urutan basa nukleotidanya berdasarkan metoda *dideoxycy-Sanger* menggunakan primer UniB1. Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 dibaca menggunakan program DNASTAR dan dianalisis menggunakan program BLASTn, Clustal Omega dan Mega 6. Ukuran fragmen gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 yang diperoleh 724 bp. Konsentrasi DNA kromosom isolat bakteri RZ-01 diperkirakan 50 ng/ μ L. Hasil identifikasi menunjukkan isolat bakteri RZ-01 termasuk kedalam kelompok spesies *Enterobacter aerogenes*.

Kata Kunci : Gen 16S rRNA, Bakteri, Spesies, Inulin, Rizosfer Umbi Dahlia

I. PENDAHULUAN

Peran dari organisme prokariota sangat dibutuhkan dalam ekosistem kehidupan. Salah satu prokariota adalah bakteri. Bakteri adalah sel uniseluler yang memiliki karakter khusus, berukuran mikroskopis, dan memiliki struktur yang sederhana (Fenchel, 2012). Bakteri memiliki peran penting di alam dan sangat mudah tumbuh. Bakteri berperan dalam berbagai siklus dan degradasi berbagai senyawa (Pangastuti, 2006).

Salah satu senyawa yang didegradasi bakteri adalah inulin. Inulin adalah senyawa polimer alami yang monomernya fruktosa dan termasuk kelompok karbohidrat. Inulin adalah polyfructan yang banyak di akar dan umbi *Yerusalem artichoke*, *chicory* dan umbi dahlia. Inulin dibutuhkan dalam jumlah yang besar sebagai bahan murah dan berlimpah untuk produksi fruktosa dan fructooligosaccharida (FOS), yang digunakan dalam makanan, minuman dan industri farmasi (Mohamed, et al., 2015).

Inulin dihidrolisis menjadi monomer fruktosa dibutuhkan enzim inulinase. Inulinase adalah enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa dan atau fructooligosakarida. Enzim ini dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur, maupun tumbuh-tumbuhan. Enzim inulinase juga diproduksi bakteri yang diisolasi dari rizosfer umbi dahlia (Viswanathan & Kulkarni, 1996; Baston & Barna, 2013).

Bakteri pendegradasi inulin harus diketahui spesiesnya. Penentuan spesies dari bakteri dilakukan berdasarkan fenotip dan genotip. Fenotip adalah suatu karakteristik fisiologis umum yang digunakan sebagai parameter penentuan spesies

pada prokaryota (Pangastuti, 2006). Tapi untuk saat ini identifikasi spesies dari bakteri sering dilakukan berdasarkan genotip. Dengan mengetahui bakteri secara genotip, maka spesies bakteri lebih mudah dikenali.

Identifikasi bakteri secara genotip melibatkan DNA dari bakteri. Kemajuan teknologi memungkinkan untuk menganalisis spesies bakteri di laboratorium dengan melakukan isolasi DNA atau dari sampel bakteri yang diambil dari lingkungan.

Teknik aplikasi molekuler untuk sistematik bakteri memperkenalkan sebuah parameter baru yang cepat untuk klasifikasi bakteri, yaitu analisis sekuen dari gen 16S rRNA (Rosello-Mora & Amann, 2000). Ribosomal ribonucleic Acid (rRNA) adalah salah satu molekul yang bergabung dengan molekul lain RNA membentuk ribosom yang digunakan pada sintesis protein. Dalam penentuan spesies bakteri telah diperkenalkan gen 16S rRNA yang terdapat pada bakteri. Gen 16S rRNA adalah gen yang paling lestari pada bakteri. Gen yang paling lestari ini maksudnya adalah gen yang mudah dicari kemiripannya dengan gen yang lain dari spesies bakteri berbeda. Oleh sebab itu gen 16S rRNA sangat membantu dalam menentukan pembeda dan penanda suatu spesies bakteri yang ada. Molekul gen 16S rRNA memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah variatif.

Hasil analisa ini adalah sekuen basa nukleotida gen 16S rRNA dari isolat bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi dahlia. Analisa sekuen gen 16S rRNA menggunakan metode amplifikasi *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Selanjutnya analisa dilakukan menggunakan teknologi bioinformatika

dengan program SeqmanDNASStar. Selanjutnya analisa spesies bakteri dilakukan menggunakan program BasicLocalAligmentSearchTools n(BLASTn). Untuk melihat filogenetik dari spesies bakteri menggunakan program MEGA6. Oleh sebab itu dengan mengetahui spesies bakteri yang dapat mengubah inulin menjadi fruktosa dan FOS sebagai prebiotik dalam tubuh manusia, kita bisa mengembangkan bakteri tersebut dalam skala industri. (Azhar, etal., 2015)

Di Laboratorium Biokimia FMIPA UNP terdapat koleksi isolat bakteri pendegradasiinulin dari rizosfer umbi dahlia. Tapi bakteri tersebut belum diketahui spesiesnya. Oleh sebab itu penelitian ini ditentukan sekuen gen 16S rRNA bakteri pendegradasiinulin dari rizosfer umbi dahlia dan menentukan species bakteri tersebut.

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini alat yang digunakan adalah inkubator, shaker, autoklaf, neraca analitik, pipet mikro, tabung mikro, erlenmeyer 100 mL, cawan petri, pH meter, gelas ukur, kawat ose, freezer, penangas air, vortex, spritus, sentrifus, Polymerase Chain Reaction (PCR), alat elektroforesis DNA.

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sampel isolat bakteri ari rizosfer umbi dahlia yang akan diidentifikasi, DNA template, Primer BactF1 dan UniB1. Reagen kimia yang digunakan adalah $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, trisodium sitrat, agar bakto, EDTA, lisozime, etanol, isopropanol, Tris-Cl, buffer TAE, gel agarosa, etidium bromida, loadingdye, kit wizard Genomic DNA Purification (Promega), kit PCR (KAPA).

B. Peremajaan Isolat Bakteri

Komposisi bahan yang digunakan dalam pembuatan 1 L media padat adalah 2 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14 gram KH_2PO_4 , 6 gr $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 gram trisodium sitrat, 10 gram inulin, 20 gram agar bakto dan 1L aquades. Alat yang digunakan pada proses peremajaan isolat bakteri, seperti jarum ose, cawan petris, tabung reaksi dan erlenmeyer disterilkan menggunakan autoclav selama 20 menit. Isolat bakteri RZ-01 yang diperoleh dari laboratorium Biokimia diremajakan di media padat. Isolat bakteri ditotolkan sebanyak 3 μL di media padat dan didiamkan selama 18 jam. Hasil totolan kemudian di streak sehingga terbentuk singel koloni. Singel koloni bakteri RZ-01 dimasukkan ke dalam 10mL media cair pada erlenmeyer 50 mL dan disheker selama 24 jam sehingga terbentuk kultur bakteri.

C. Isolasi DNA Kromosom Isolat Bakteri RZ-01

Kultur bakteri RZ-01 sebanyak 1,5 mL disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 4°C selama 3 menit. Ekstrak bening (supernatan) yang telah terpisah dari

endapan dibuang. Endapan yang terbentuk ditambahkan 480 μL EDTA 50 mM dan ditambahkan 120 μL lisozime 10 mg/mL kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Endapan dan supernatan dipisah. Endapan ditambahkan 600 μL Nucleic Lysis Solution dan diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit. Setelah dipanaskan kemudian didiamkan pada suhu ruang dan ditambahkan 3 μL RNase. Sampel diinvert selama 2-5 detik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Simpan pada suhu ruang dan ditambahkan 200 μL Protein Precipitation Solution. Sampel divortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik dan diinkubasi didalam es selama 5 menit. Sentrifugasi sampel pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Pisahkan endapan dan supernatan. Ambil supernatan dan dimasukkan kedalam tabung mikro yang telah diisi larutan isopropanol sebanyak 600 μL . Sentrifugasi sampel pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Pisahkan endapan dan supernatan dengan hati-hati. Endapan yang terbentuk ditambahkan 600 μL ethanol 70% dan tabung mikro dibolak-balik. Sentrifugasi sampel pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan endapan dikeringkan, setelah kering ditambahkan 20 μL DNA Rehydration Solution. DNA hasil isolasi disimpan pada suhu -20°C (Promega, 2016).

D. Elektroforesis DNA Kromosom Bakteri

DNA kromosom bakteri RZ-01 dielektroforesis dengan cara menyiapkan agarosa 1%. Agarosa 1% dibuat dengan cara memanaskan 0,5 gr bubuk agarosa dengan 50mL TAE 50x sampai mendidih. Agarosa didinginkan sampai suhu 8°C dan ditambahkan 1-2 μL etidium bromida. Campuran agarosa dengan etidium bromida dituangkan pada cetakan yang telah dipasang sisir pembuat sumuran sampel. Setelah gel mengeras dimasukkan gel beserta cetakkannya kedalam chamber dan tuangkan buffer TAE sampai gel terendam. Kemudian dimasukkan DNA sebanyak 1 μL dan larutan loading dye sebanyak 1 μL pada masing-masing sumur. Kemudian elektroda dihubungkan dengan powersupply dan dibiarkan menyala selama 45 menit dengan tegangan 80V dan kuat arus 40mA. Setelah elektroforesis selesai gel agarosa diambil dan pindahkan ke UV-transiluminator dan hasilnya dapat diamati hasilnya (Fatchiyah, 2011).

E. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). Komposisi larutan yang digunakan pada proses PCR adalah sebagai berikut: 10 μL 10x DreamTaq buffer, 1,5 μL dNTP, 1 μL , MgCl_2 25mM, 0,5 μL primer BactF1 (5' AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG3'), 0,5 μL primer UniB1 (5'GGTTAC(G/C)TTGTTACGACTT3'), sampel 0,25 μL (150ng/ μL), 0,5 μL DreamTaq polimersae. Kemudian untu mencapai volume sebanyak 50 μL ditambahkan 29,25 μL ddH₂O. Untuk proses denaturasi pada metode PCR dilakukan pada suhu 94°C selama 3 menit. Denaturasi kedua dilakukan

selama 30 detik pada suhu yang sama. Untuk proses anealing yaitu pada suhu 48°C selama 30 detik, untuk elongasi awal pada suhu 72°C selama 1,5 menit dan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Demikian seterusnya sebanyak 29 kali proses. Elektroforesis ampikon dilakukan pada gel agarosa (KAPA, 2016).

F. Elektroforesis Produk PCR

Prosedur kerja untuk elektroforesis produk PCR sama seperti elektroforesis DNA.

G. Sequencing Gen 16S rRNA Bakteri dengan Metode Dideoxy-sanger

Dalam penelitian ini Sequencing gen 16S rRNA bakteri dengan metode dideoxy-Sanger dilakukan dengan cara produk PCR dikirim ke 1st_Base di Singapura.

H. Analisa Hasil Sequencing data Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Bakteri

Data hasil sequencing dikirim oleh makrojen di Korea Selatan dalam bentuk electropherogram. Data electropherogram akan diterjemahkan menjadi urutan basa nukleotida sampel bakteri menggunakan program DNASTar. Untuk mengidentifikasi spesies sampel bakteri, urutan basa nukleotida yang telah diterjemahkan dianalisa menggunakan program BasicLocalAligmentSeachTool n (BLAST n, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Hasil BLASTn dilakukan alignment (penjajaran) urutan gen 16S rRNA menggunakan Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) Kemudian digunakan program MEGA6 untuk menentukan hubungan filogenetik spesies bakteri yang diidentifikasi dengan spesies yang telah ada.

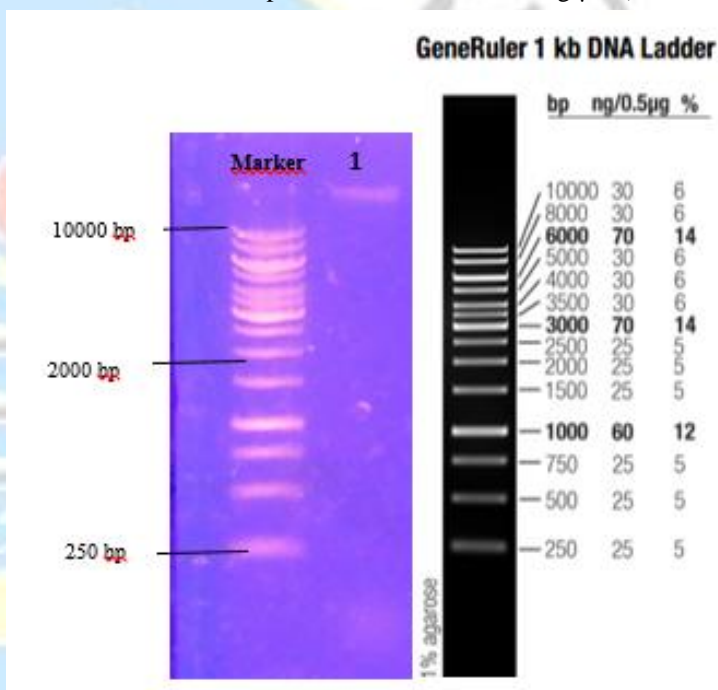
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi dan Elektroforesis DNA Kromosom Bakteri RZ-01 Pendegradasi Inulin dari Rizosfer Umbi Dahlia

Pada penelitian ini isolasi DNA kromosom bakteri dilakukan sesuai metode yang dimuat pada Wizard Genomic Purification Kit by Promega (Promega, 2016). DNA kromosom bakteri RZ-01 dielektroforesis untuk mendeteksinya. Pada elektroforesis DNA kromosom bakteri digunakan 1 kb DNA Ladder sebagai marker DNA. Marker DNA memiliki 14 pita DNA yaitu 250 bp (base pairs), 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp, dan 10000 bp yang akan terpisah pada gel agarosa saat elektroforesis DNA. Fragmen DNA tersebut terlihat terang di bawah sinar UV (Gambar 1).

Hasil elektroforesis DNA menunjukkan bahwa posisi DNA kromosom isolat bakteri RZ-01 terlihat terang di bawah sinar UV yang terletak di atas pita DNA marker 1 kb DNA Ladder berukuran 10000 bp (Gambar 1). DNA kromosom bakteri memiliki ukuran lebih dari 10000 bp (Nakabachi, et al., 2008). Berdasarkan hasil pengamatan tersebut ukuran DNA kromosom isolat bakteri RZ-01 diperkirakan lebih dari 10000 bp.

Konsentrasi DNA kromosom bakteri dapat ditentukan secara kualitatif dengan cara membandingkan ketebalan DNA kromosom bakteri dengan pita DNA marker 1 kb Ladder pada gel agarosa. Fragmen DNA marker pada ukuran 6000 bp memiliki konsentrasi 70 ng/μL, untuk ukuran 3000 bp memiliki konsentrasi 70 ng/μL (Gambar



1). Dengan demikian konsentrasi DNA kromosom isolat bakteri RZ-01 diperkirakan 50 ng/μL.

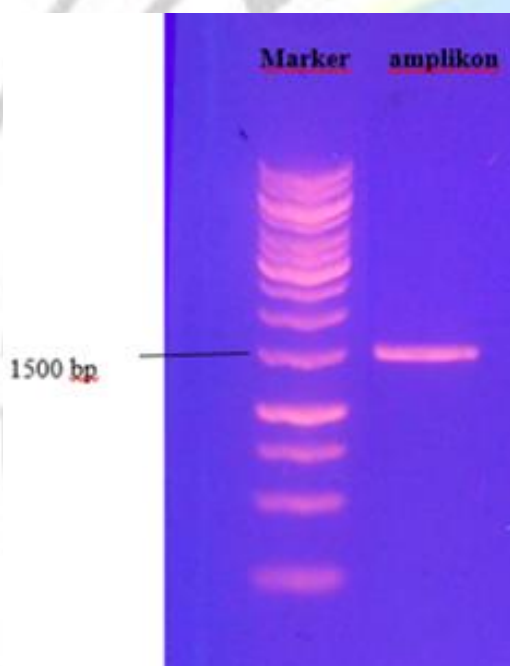
Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA kromosom isolat bakteri RZ-01
 a) Hasil elektroforesis DNA kromosom isolat bakteri RZ-01, 1= DNA kromosom isolat bakteri RZ-01
 b) Marker DNA 1 kb DNA Ladder

B. Amplifikasi Gen 16S rRNA Bakteri RZ-01 dengan Metode PCR

Gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 diamplifikasi menggunakan metode PCR. Amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 menggunakan primer BactF1 dan UniB1. Primer BactF1 merupakan primer forward, yaitu

primer yang membentuk ikatan hidrogen (annealing) dengan anti sense strand DNA. Primer UniB1 adalah primer reverse, yaitu primer yang membentuk ikatan hidrogen (annealing) dengan sense strand DNA.

Produk PCR dinamakan amplicon. Amplicon dapat dideteksi menggunakan elektroforesis DNA. Amplicon isolat bakteri RZ-01 sejajar dengan marker ukuran 1500 bp (pita kesepuluh) (Gambar 2). Hal ini dapat diindikasikan bahwa ukuran amplicon sekitar 1500 bp. Pada gen 16S rRNA E. coli (Gambar 2), primer BactF1 (forward) berada pada urutan basanukleotida yang ke 8-27, sedangkan primer UniB1 (reverse) berada pada urutan basanukleotida yang ke 1492 - 1510. Dengan demikian primer BactF1 dan primer UniB1



dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA E. coli sebanyak 1503 bp (Baker, Smith, & Cowan, 2003).

Konsentrasi amplicon gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 dapat ditentukan secara kualitatif dengan membandingkan ketebalan fragmen gen 16S rRNA isolat bakteri dengan fragmen DNA marker 1 kb Ladder. Fragmen DNA marker pada ukuran 1500 bp memiliki konsentrasi 25 ng/μL, untuk ukuran 3000 bp memiliki konsentrasi 70 ng/μL (Gambar 1). Dengan demikian, konsentrasi gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 diperkirakan 100 ng/μL.

Gambar 2. Hasil Elektroforesis Amplicon Gen 16S rRNA Isolasi Bakteri RZ-01

C. Urutan Basa Nukleotida DNA Gen 16S rRNA Bakteri RZ-01 dengan Metode Dideoxy-sanger

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan A Universitas Negeri Padang (UNP)
Jl. Prof. Hamka, Air Tawar, Padang, Sumatera Barat, Indonesia, 2

Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan menggunakan metode dideoxy-Sanger oleh 1st_BASE di Singapura. Urutan basanukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 diperoleh setelah amplikon dimurnikan dan disekuensing. Data sekuensing dinamakan dengan electropherogram. Data sekuensing dibaca menggunakan program DNASTar.

```

AAGCGGGCCC CCTGGACAAA GACTGACGCT CAGGTGCGAA 40
AGCGTGGGGA GCAAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC 80
ACGCCGTAAA CGATGTCCAC TTGGAGGTTG TGCCCTTGAG 120
GGCGTGGCTT CCGGAGCTAA CCGTTAAGTC GACCCGCTGG 160
GGAGTACGGC CGCCAAGGTT AAAAATCAA AGAATTGACG 200
GGGGCCCCGA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTGAT 240
GCAACGCGAA GAACTTACC TACTCTTGAC ATCCAGAGAA 280
ATTAGCAGAG ATGCTTTGGT GCCTTCGGGA ACTCTGAGAC 320
AGGTGCTGCA TGGCTGTCTG CAGCTCGTGT TGTGAAATGT 360
TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCCT TATCCTTTGT 400
TGCCAGCGAT TCGGTCGGGA ACTCAAAGGA GACTGCCAGT 440
GATAAACTGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCATCAT 480
GGCCCTTACG AGTAGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGCAT 520
ATACAAAGAG AAGCGACCTC GCGAGAGCAA GCGGACCTCA 560
TAAAGTATGT CGTAGTCCGG ATTGGAGTCT GCAACTCGAC 600
TCCATGAAGT CGGAATCGCT AGTAATCGTA GATCAGAATG 640
CTACGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG 680
TCACACCATG GGAGTGGGTT GCAAAAGAAG TAGGTAGCTT 720
AACC 724
    
```

Potongan electropherogram yang dibaca oleh DNASTar dimuat pada Gambar 3.

Sekuensing gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 dilakukan menggunakan UniB1. Dengan demikian diperoleh data urutan basanukleotida DNA gen 16S rRNA bakteri RZ-01 seperti yang dimuat pada Gambar 4. Urutan basanukleotida tersebut menjadi urutan basanukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 (Gambar 4).

Gambar 3. Urutan Basa Nukleotida Isolasi Bakteri RZ-01

D. Identifikasi Spesies Bakteri RZ-01

1. Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)

Data urutan basanukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 dilihat kesamaan urutan basanukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 dengan urutan basanukleotida gen 16S rRNA bakteri yang lain yang ada di GenBank menggunakan program BLASTn dari NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Hasil analisis sekuens gen 16S rRNA mempunyai kesamaan urutan basanukleotida gen 16S rRNA minimal 97% untuk menyatakan spesiesnya sama.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Enterobacter aerogenes strain FDAARGOS_139, complete genome	1291	10257	100%	0.0	99%	CP014748.1
Enterobacter aerogenes strain G7, complete genome	1291	10235	100%	0.0	99%	CP011539.1
Enterobacter aerogenes strain FDAARGOS_152, complete genome	1291	10252	100%	0.0	99%	CP014029.1
Enterobacter aerogenes 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1291	1291	100%	0.0	99%	KP776471.1
Enterobacter aerogenes strain CAV1320, complete genome	1291	10291	100%	0.0	99%	CP011574.1
Enterobacter aerogenes strain PLS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1291	1291	100%	0.0	99%	KF731618.1
Uncultured Enterobacter sp. clone M1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1291	1291	100%	0.0	99%	JQ885538.1

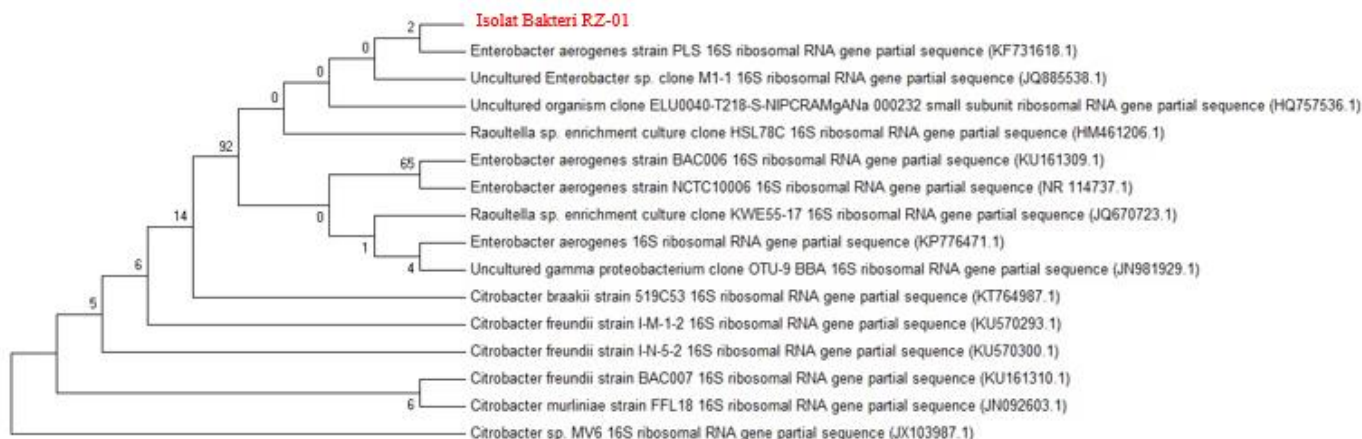
Jikakesamaannyakurang 97% makabakteri yang merupakan kelompok species *Enterobacteraerogenes* diisolasi merupakan spesies baru (Stackebrandt, 1995). (Gambar 18). Isolat bakteri RZ-01 memiliki kekerabatan Hasil BLASTn gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 yang jauh dengan *Routella sap.* dan *Citrobacterfreundii*.
tujuh pertama dimuat pada Gambar 5.

Gambar 5. Hasil BLASTn Gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01

Hasil BLASTn menunjukkan bahwa gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 termasuk kelompok spesies *Enterobacteraerogenes* dengan *Ma c score* 10257 dan kesamaan 99%. Tujuh data teratas hasil BLASTn menunjukkan kemiripan dengan spesies *Enterobacteraerogenes* karena memiliki tingkat kesamaan yang paling tinggi. Dengan demikian, isolat bakteri RZ-01 termasuk kelompok *Enterobacteraerogenes*.

2. Program MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0)

Isolat bakteri RZ-01 diidentifikasi sebagai species bakteri *Enterobacteraerogenes* berdasarkan data hasil BLASTn. Lima belas data hasil BLASTn dilakukan alignment (penjajaran) urutan gen 16S rRNA menggunakan *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Hasil penjajaran gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 dibuat pohon filogenetik menggunakan program MEGA6 (Tamura, et al., 2013). Pohon filogenetik digunakan untuk melihat kekerabatan spesies isolat bakteri RZ-01 dengan 15 spesies hasil *Clustal Omega*.



Pohon filogenetik isolat bakteri RZ-01 dimuat pada gambar 6.

Gambar 6 Pohon Filogenetik spesies isolat bakteri RZ-01

Hubungan kekerabatan isolat bakteri RZ-01 pada pohon filogenetik menunjukkan kedekatan dengan spesies bakteri *Enterobacteraerogenes*.
sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri RZ-01

IV. SIMPULAN

Berdasarkan identifikasi molekuler gen 16S rRNA isolat bakteri RZ-01 pendegradasi inulin dari rizosfer umbi Dahlia dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri RZ-01 termasuk kedalam species *Enterobacter aerogenes*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Azhar, M., Natalia, D., Syukur, S., Vovien, & Jamsari. (2015). Gene Fragments that Encodes Inulin Hydrolysis Enzyme from. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(2), 59-69.
- [2] Baker, G., Smith, J., & Cowan, D. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological methods*, 541-555.
- [3] Basic Local Alignment Search Tool. (2016, Juni 26). Diambil kembali dari National Center for Biotechnology Information: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [4] Fatchiyah. (2011). Amplifikasi DNA. Dalam Fatchiyah, E. L. Arumingtiyas, S. Widyarti, & S. Rahayu, *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis* (hal. 52-54). Malang: Erlangga.
- [5] KAPA. (2016, Januari 12). Diakses dari www.kapabiosystems.com
- [6] Mohamed, S. A., Salah, H. A., Moharam, M. E., Foda, M., & Fahmy, A. S. (2015). Characterization of two thermostable inulinases from *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 65-69.
- [7] Pangastuti, A. (2006). Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*, 292-296.
- [8] Promega. (2016). Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual.
- [9] Rosello-Mora, R., & Amann, R. (2000). The Species Concept for Prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39-67.
- [10] Stackebrandt, R. G. (1995). Taxonomic Note: Implementation of the Provisional Status. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 186-187.
- [11] Viswanathan, P., & Kulkarni, P. R. (1996). Inulinase Producing Fungi dan Actinomycetes from Dahlia Rhizosphere. *Indian Journal of Microbiology*, 117-118.