

# Identifikasi Gen 16S rRNA Bakteri Asam Laktat UBC-DTK-01 dari Dadih

Azizah<sup>1</sup>, Minda Azhar<sup>2\*</sup>

<sup>1,2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Padang  
Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Barat, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

\*minda@fmipa.unp.ac.id

**Abstract** — Genotypic identification of bacteria is faster than phenotypic identification. This study aims to determine the group of lactic acid bacteria species from Tilatang Kamang Agam curd using the 16S rRNA gene. Bacterial chromosomal DNA was isolated using the kit wizard genomic DNA purification method. The 16S rRNA gene in chromosomal DNA was isolated by PCR method using BacF1 and UniB1 primers. The 16S rRNA gene fragment sequencing was carried out using the Dideoxy Sanger method. The sequenced nucleotide base sequences were analyzed using the BioEdit, BLASTn and MEGA X programs. The size of the 16S rRNA gene fragment of the bacterial isolate UBC-DTK-01 obtained was 1017 bp (base pair). The bacterial isolates belonged to the Enterococcus genus and Enterococcus faecalis species strain UBC-DTK-01.

**Keywords** — Dadih, Gene 16S rRNA, Polymerase Chain Reaction, Phylogeny

## I. PENDAHULUAN

Pada kehidupan saat ini, salah satu industri yang berkembang pesat adalah industri makanan dan minuman. Salah satu makanan tradisional yang aman untuk dikonsumsi yaitu produk dari fermentasi dadih. Fermentasi dadih dilakukan secara tradisional dengan melibatkan beberapa mikroorganisme yang saling berinteraksi (1).

Dadiah adalah suatu produk makanan dari olahan susu melalui fermentasi alami yang dilakukan dalam tabung bambu yang tertutup rapat dengan daun pisang (2). Kualitas dadiah yang baik dapat diketahui dari aromanya yang khas seperti susu asam dan warna putih seperti yogurt. Dadiah memiliki komposisi nutrisi diantaranya yaitu kadar air sebanyak 82,10%, lemak 8,08%, protein 6,99% dan pH 4,99 (3). Dadiah mengandung bakteri asam laktat yang bersifat sebagai probiotik (4). Beberapa bakteri asam laktat yang umum digunakan sebagai probiotik dimuat pada Tabel 1.

TABEL 1.  
BAKTERI ASAM LAKTAT YANG UMMUMNYA DIGUNAKAN  
SEBAGAI PROBIOTIK

Genus	Spesies
<i>Lactobacillus</i>	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.amylovorus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.Gallinarum</i> , <i>L.Gasseri</i> , <i>L.delbrueckii</i> <i>subsp.bulgaricus</i> , <i>L.reuteri</i> , <i>L.Crispatus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L.brevis</i> , <i>L.bactis</i> , <i>L.cellobiosu</i>
<i>Streptococcus</i> ( <i>Lactococcus</i> )	<i>Lc.lactis</i> , <i>Lc.cremoris</i> , <i>S.alivarius</i> <i>subsp.thermophilus</i> , <i>S.intermedius</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. Animalis</i> , <i>B. Bifidum</i> , <i>B. Breve</i> , <i>B. Infantis</i> , <i>B. Lactis</i> , <i>B. Longum</i>

Sumber : (7)

Bakteri asam laktat merupakan salah satu bakteri yang dibutuhkan dalam pangan seperti sebagai pengawet alami

pada makanan (4). Bakteri asam laktat dapat diisolasi dari produk susu fermentasi. Bakteri ini dianggap sebagai probiotik, karena dapat menghasilkan beberapa zat antimikroba yaitu seperti protein bakterisida atau bakteriosin (5). Zat antimikroba yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusukan pada makanan (6).

Bakteri asam laktat pada dadiah, dapat diidentifikasi kelompok genus dan spesies secara fenotip dan genotip. Identifikasi fenotip dilakukan melalui pengamatan makroskopis morfologi koloni seperti bentuk, ukuran dan warna koloni bakteri, mikroskopis (perwarnaan gram), motilitas dan uji biokimia. Proses identifikasi secara fenotip membutuhkan waktu yang lama dibandingkan dengan metode genotip. Identifikasi secara fenotip yang dilakukan yaitu pengamatan makroskopis morfologi koloni seperti bentuk, ukuran dan warna koloni bakteri. Identifikasi secara genotip dapat dilakukan dengan metoda molekuler dengan menggunakan gen 16S rRNA (8). Gen 16S rRNA digunakan karena dadiah mengandung bakteri asam laktat yang dapat diidentifikasi dengan menggunakan gen 16S rRNA yang memiliki ukuran 1.500 bp (*base pair*) (9). Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan identifikasi isolat rizosfer umbi dahlia dengan menggunakan gen 16S rRNA yang didapatkan spesies bakteri *Enterobacter aerogenesis* dan penelitian yang telah dilakukan oleh Clarridge pada darah didapatkan bakteri *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. Pada penelitian sebelumnya belum dilakukan identifikasi isolat bakteri dari dadiah Tilatang Kamang Agam menggunakan gen 16S rRNA.

Identifikasi secara genotip dapat dilakukan dengan cara mengisolasi DNA kromosom bakteri, kemudian diidentifikasi molekuler gen pengkode rRNA, yaitu gen 16S rRNA. Identifikasi sekuen gen 16S rRNA diawali dengan mengisolasi gen 16S rRNA menggunakan metode PCR. PCR

merupakan suatu teknik memperbanyak atau amplifikasi fragmen DNA secara berulang-ulang dalam waktu yang singkat (9). Produk PCR disekuensing menggunakan metode *Dideoxy-Sanger* dan diidentifikasi menggunakan program komputer (BioEdit, *Genbank* program BLASTn dan MEGA X). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kelompok spesies bakteri asam laktat dari dadih Tilatang Kamang Agam menggunakan gen 16S rRNA. Penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu dan teknologi tentang gen 16S rRNA sebagai penentu kelompok spesies bakteri.

## II. METODE PENELITIAN

### A. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas steril autoclave, inkubator, jarum ose, pipet mikro, mikrotube, bunsen, sentrifugasi, UV-transiluminator, alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan alat elektroforesis DNA.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dadih, MRS broth, MRS agar, EDTA 50 mM, *Lysozyme* 10 mg, etanol 70%, kit Promega, kit *KAPA Taq DNA polymerase*, Bubuk Agarosa, Buffer TAE 50 mM, asam asetat glasial, marker DNA ladder 1 kb, loading dye, dan Redsafe.

### B. Skrining dan Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Dadih

Skrining dan isolasi bakteri asam laktat dilakukan secara aseptis. Alat dan bahan yang digunakan harus dalam keadaan steril. 1 gram sampel dadih dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril, lalu ditambahkan 9 mL MRS broth steril (pengenceran  $10^{-1}$ ), masukkan ke dalam inkubator *shacker* dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Pipet kembali pengenceran  $10^{-1}$  sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 mL MRS broth steril (pengenceran  $10^{-2}$ ), dilakukan perlakuan yang sama hingga pengenceran  $10^{-5}$ . Masing-masing pengenceran kultur media MRS broth steril diinokulasikan ke media MRS agar steril menggunakan jarum ose metode *spread*, kemudian diinkubasi kembali pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Koloni bakteri asam laktat pada media MRS agar mempunyai ciri bentuk bulat warna putih kekuningan. Koloni tunggal yang mencirikan BAL pada media MRS agar, diinokulasikan kembali ke media MRS agar untuk pemurnian koloni menggunakan metoda *streak*, dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Isolat murni dari satu koloni tunggal diperoleh. Koloni isolat murni pada media MRS agar diinokulasikan kembali ke media MRS agar menggunakan metode *streak*, dan diinokulasikan ke media MRS broth steril 2 mL masing-masing dilakukan tiga kali perlakuan (2 untuk kultur kerja, 1 untuk kultur stock), kemudian inkubasi selama 24-48 jam. Media untuk kultur kerja di simpan pada refrigerator suhu  $4^{\circ}\text{C}$ , yang akan digunakan untuk uji lanjut (9).

### C. Isolasi DNA Kromosom Bakteri

Isolasi DNA kromosom bakteri dilakukan dengan cara memipet 1,5 mL kultur bakteri dengan mikropipet lalu tempatkan pada mikrotube steril. Sentrifugasi mikrotube yang berisi kultur bakteri dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu

$4^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit sehingga terbentuk endapan (pellet) dan cairan (supernatan). Ekstrak bening (supernatan) yang telah terpisah dari endapan dibuang. Endapan ditambahkan 480  $\mu\text{L}$  EDTA 50 mM hingga tersuspensi dan ditambahkan 120  $\mu\text{L}$  *lysozyme* 10 mg/mL. Inkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit dan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Setelah sentrifugasi terdapat endapan dan supernatan. Supernatan yang telah memisah dengan endapan dibuang. Endapan yang terbentuk ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  *Nucleic Lysis Solution* hingga tersuspensi dan diinkubasi pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Dinginkan hingga suhu ruang dan ditambahkan 3  $\mu\text{L}$  *RNAse*. Sampel dihomogenkan 2 sampai 5 menit dan diinkubasikan dalam suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit, kemudian dinginkan hingga suhu ruang. Tambahkan 200  $\mu\text{L}$  *Protein Precipitation Solution*, divortex dengan cepat selama 20 detik dan diinkubasi selama 5 menit dalam es. Sentrifugasi sampel pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, lalu pisahkan endapan dan supernatan.

Mengisi tabung dengan larutan isopropanol sebanyak 600  $\mu\text{L}$  dan tambahkan supernatan. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Endapan dan supernatan dipisahkan dengan hati hati. Endapan yang terbentuk ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  etanol 70% dingin lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan endapan dikeringkan 10 sampai 15 menit, setelah kering ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  *DNA Rehydration Solution* dan diamkan semalaman pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . DNA hasil isolasi disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Promega.com).

### D. Elektroforesis DNA kromosom Bakteri

Elektroforesis DNA kromosom bakteri dilakukan dengan cara menyiapkan gel agrosa 1%. Gel agrosa 1% disiapkan dengan memanaskan 0,5 gram bubuk agarosa dan larutkan dengan 50 mL TAE 1x lalu dipanaskan sampai mendidih pada microwave. Setelah mendidih kemudian didinginkan hingga suhu  $45-50^{\circ}\text{C}$  dan ditambahkan 1  $\mu\text{L}$  etidium bromida, kemudian diaduk hingga homogen. Larutan agarosa dituangkan pada cetakan yang telah dipasang sisir pembuat sumuran sampel. Setelah gel mengeras dicabut sisir dan cetakannya lalu tuangkan buffer TAE 1x sampai gel terbenam. Masukkan DNA kromosom 1  $\mu\text{L}$  dan larutan loading dye 1  $\mu\text{L}$  pada masing-masing sumur terlebih dahulu dicampurkan hingga tercampur merata diatas parafilm serta sebagai marker digunakan DNA ladder 1 kb yang dicampur dengan 1  $\mu\text{L}$  loading dye. Elektroda dihubungkan dengan power supply dan dinyalakan hingga 45 menit dengan tegangan 80 volt dengan kuat arus 400 mA (volt konstan). Setelah selesai alat elektroforesis dimatikan dan gel dipindahkan ke UV-transiluminator dan diamati hasilnya (11).

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

Amplifikasi DNA target dilakukan terhadap larutan DNA sampel bakteri yang telah disiapkan pada isolasi DNA kromosom bakteri. Total volume campuran reaksi yang digunakan untuk proses amplifikasi DNA target adalah 50  $\mu\text{L}$ . Langkah kerja dengan cara menambahkan bahan ke tabung PCR secara berurutan 3,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,5  $\mu\text{L}$  dNTP

mix 10 mM , 2,5 µL primer BacF1 10 µM , 2,5 µL primer UniB1 10 µM , 27,5 µL ddH<sub>2</sub>O steril, 10 µL 5x KAPA Taq Extra Buffer tanpa Mg<sup>2+</sup> , 0,5 µL KAPA Taq Extra Hotstart DNA Polymerase, dan 2 µL sampel. Campuran tersebut dihomogenkan dan dispin selama 15 detik dan dimasukkan ke dalam alat PCR.

Proses denaturasi dilakukan dua kali dimana pada suhu 94°C selama 3 menit dan 30 detik. Proses *annealing* dilakukan pada suhu 48°C selama 30 detik dan proses *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik. *Post elongasi* pada suhu 72°C selama 5 menit. Siklus PCR dilakukan 29 kali (KAPA.com).

#### F. Sekuensing Gen 16S rRNA Bakteri Metode Dideoxy-Sanger

Amplikon PCR dimurnikan dan disekuensing menggunakan metode Sekuensing *Dideoxy-Sanger*. Amplikon PCR dikirim ke 1stBASE.

#### G. Analisa Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Bakteri Asam Laktat Hasil Sekuensing

Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA hasil sekuensing dikirim berupa grafik *electrophoregram* yang dibaca menggunakan program BioEdit. Sekuen gen 16S rRNA hasil penjaran dengan BioEdit dibandingkan dengan data yang ada pada *Genbank* program BLASTn. Data yang ada pada *Genbank* diambil 19 isolat secara acak dan dilakukan penjaran menggunakan program MEGA X untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari spesies isolat bakteri asam laktat dengan 19 spesies yang telah ada pada *Genbank*.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Skrining dan Identifikasi isolat Bakteri Asam Laktat dari Dadih secara Fenotip

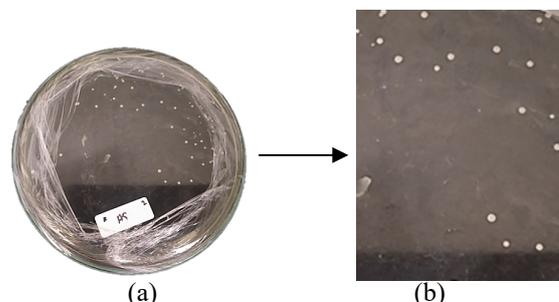
Skrining bakteri asam laktat pada dadih menggunakan media selektif *de Man Rogosa Sharpe* (MRS). Media *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) digunakan karena merupakan media yang spesifik (media selektif) sehingga hanya bakteri tertentu yang dapat tumbuh. Jumlah pertumbuhan koloni pada media *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) agar dimuat pada Tabel 2.

TABEL 2.  
PERTUMBUHAN KOLONI PADA MEDIA *DE MAN ROGOSA SHARPE* (MRS)

Kode sampel	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
01	~	~	~	137	40
02	~	~	~	192	73

Pertumbuhan koloni bakteri asam laktat pada tingkat pengenceran 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> dan 10<sup>-3</sup> dengan pengulangan 1 (pertama) dan ke 2 (kedua) menunjukkan jumlah koloni sulit untuk dihitung dan diamati morfologinya, karena koloni yang dihasilkan pada media *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) terlalu rapat. Pada tingkat pengenceran 10<sup>-4</sup> dan 10<sup>-5</sup> koloni bakteri pada pengulangan pertama dan kedua dapat diamati morfologi koloninya, masing-masing berjumlah 137, 192 40 dan 73 koloni. Koloni bakteri asam laktat yang tumbuh pada media

*de Man Rogosa Sharpe* (MRS) agar diidentifikasi secara fenotip yaitu bentuk morfologi koloni yaitu berbentuk bulat cembung tepian rata, bewarna putih dan memiliki ukuran yang berbeda (sedang dan kecil). Morfologi dari koloni ini merupakan ciri-ciri dari koloni bakteri asam laktat. Koloni yang dipilih adalah isolat bakteri murni yang diberi kode nama yaitu isolat bakteri UBC-DTK-01 dimuat pada Gambar 1.



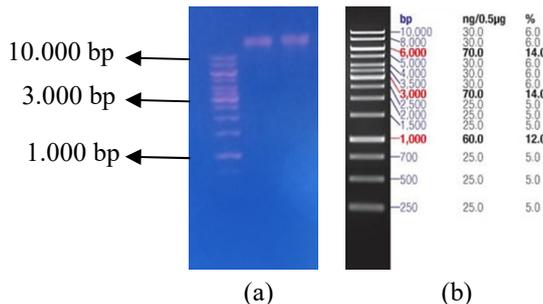
Gambar 1. Isolasi Bakteri Murni pada media MRS Agar  
(a) Isolasi bakteri murni pada plate  
(b) Isolasi bakteri murni

#### B. Amplifikasi Gen 16S rRNA dan Sekuensing

Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pada prinsipnya memiliki tiga tahap reaksi yaitu denaturasi, *annealing* dan *elongasi* yang terjadi secara berulang-ulang sebanyak 29 siklus. Pada tahap denaturasi mengakibatkan terputusnya ikatan hidrogen antar basa nukleotida dari DNA untai ganda ke DNA untai tunggal. Pada tahap *annealing* terjadinya penempelan primer ke daerah spesifik pada DNA target. Pada tahap *elongasi* terjadinya perpanjangan primer. DNA yang digunakan diisolasi dari bakteri asam laktat UBC-DTK-01. DNA kromosom diisolasi dari bakteri UBC-DTK-01 menggunakan *kit wizard Genomic DNA purification* (Promega). Isolasi DNA kromosom bakteri terdapat tiga tahapan untuk memperoleh DNA kromosom bakteri menggunakan etilendiamintertra asetat (EDTA). EDTA berfungsi untuk mengikat ion Mg<sup>2+</sup> dan Ca<sup>2+</sup> yang dibutuhkan untuk menjaga ketahanan dinding sel. EDTA juga berfungsi untuk mengaktifkan enzim DNase yang dapat mendenaturasi DNA. Perusakan dinding sel bakteri juga dilakukan dengan penambahan *lysozyme* (12). Selanjutnya dilakukan penambahan *Nucleic Lysis Solution* pada endapan yang bertujuan untuk menghilangkan molekul lipid pada membran sel karena mengandung deterjen *Sodium Dedosil Sulfat* (SDS) (13). Penambahan *RNase Solution*, yang bertujuan untuk menghancurkan RNA sehingga DNA dapat di ekstrat. Protein yang terdapat pada campuran harus dihilangkan dengan *Protein Precipitation Solution* (PPS).

Pada isolasi DNA kromosom bakteri dilakukan pemurnian DNA kromosom berdasarkan prinsip kelarutan DNA. Salah satu senyawa kimia yang mampu mengurangi kelarutan DNA adalah isopropanol dingin. DNA tidak larut dalam isopropanol karena DNA bersifat polar. Dilakukan pencucian DNA dengan menggunakan etanol 70% dan penambahan DNA *Rehydration Solution* untuk mengawetkan DNA agar dapat bertahan lama ketika simpan.

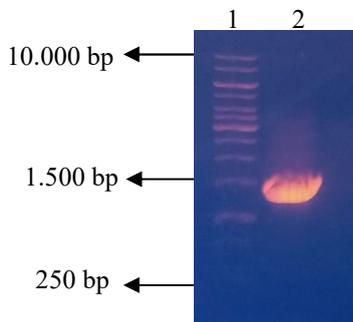
Keberhasilan dari isolasi DNA kromosom bakteri dapat diketahui dengan melakukan elektroforesis DNA kromosom bakteri menggunakan gel agarosa. DNA yang bermuatan negatif akan bergerak ke arah anoda yang bermuatan positif. DNA dengan berat molekul yang kecil akan bergerak lebih cepat menuju anoda dibandingkan dengan DNA dengan berat molekul yang besar. Pada elektroforesis DNA kromosom bakteri digunakan *GeneRuler 1 kb DNA ladder* sebagai marker DNA. Marker DNA memiliki 14 pita DNA yang digunakan sebagai pembanding terhadap sampel dari hasil elektroforesis DNA dimuat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA kromosom bakteri (a) Isolasi DNA kromosom UBC-DTK-01 (b) Marker *GeneRuler 1 kb DNA ladder*

Berdasarkan hasil elektroforesis DNA kromosom bakteri pada Gambar 2, isolasi DNA telah berhasil dilakukan karena terdapat pita murni diatas marker. DNA kromosom bakteri memiliki ukuran lebih dari 10.000 bp yaitu 21.000 bp sampai 23.000 bp (13). Konsentrasi DNA kromosom dapat ditentukan dengan cara membandingkan ketebalan dan kecerahan pita DNA kromosom dengan pita DNA marker. Konsentrasi DNA kromosom bakteri dari hasil isolasi dapat diperkirakan memiliki konsentrasi 70 ng/mL.

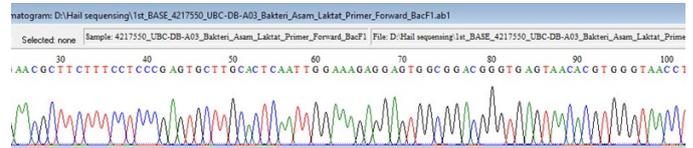
DNA kromosom bakteri dari isolat UBC-DTK-01 digunakan sebagai cetakan pada proses amplifikasi gen 16S rRNA. Keberhasilan dari amplifikasi gen 16S rRNA dapat diketahui dari elektroforesis DNA menggunakan gel agarosa yang dimuat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil elektroforesis produk PCR 1. Marker *GeneRuler 1 kb DNA ladder* 2. Amplikom UBC-DTK-01

Amplikom gen 16S rRNA disekuensing menggunakan metode *Dideoxy-Sanger*. Prinsip sekuensing dengan metode ini perpanjangan primer yang menempel pada templet yang

akan disekuensi sampai sebuah nukleotida pengakhiri rantai berikatan. Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA hasil sekuensing berupa grafik *electrophoregram* yang dibaca menggunakan program BioEdit dimuat pada Gambar 4.



Gambar 4. *Electrophoregram* gen 16S rRNA UBC-DTK-01

C. Analisa Hasil Sekuensing

Urutan nukleotida fragmen Gen 16S rRNA menggunakan primer reverse UniB1 pada BioEdit adalah 1017 bp (*base pair*) dimuat pada Gambar 5.

```

GGCTCCAAA GGTACCTCA CCGACTTCGG GTGTTACAAA CTCTCGTGGT 50
GTGACGGGCG GTGTGTACAA GGCCCGGGA CGTATTCACC GCGCGGTGCT 100
GATCCGCAT TACTAGCGAT TCCGGCTCA TGCAGCGAG TTGCAGCCTG 150
CAATCCGAAC TGAGAGAAGC TTTAAGAGAT TTGCATGACC TCGCGGTCTA 200
GCGACTCGTT GTACTTCCCA TTGTAGCAGC GTGTAGGCC AGGCATATAAG 250
GGCATGATG ATTTGACGTC ATCCCACCT TCCTCCGGTT TGTCACCGGC 300
AGTCTCGTA GAGTGCCCAA CTAATGATG GCAACTAACA ATAAGGGTTG 350
CGCTCGTTC GGGACTTAAC CCAACATCTC ACGACACGAG CTGACGACAA 400
CCATGCACCA CCTGTCACTT TGTCGCCGAA GGGAAAGCTC TATCTCTAGA 450
GTGGTCAAAG GATGTCAAAG CTGGTAAGG TTCTTCGCGT TGCTTCGAAT 500
TAAACCACAT GCTCCACCGC TTGTGCGGGC CCCCCTCAAT TCCTTTGAGT 550
TTCACCTTG CCGTCTACT CCCAGGCGG AGTGCTTAAT CGGTTTGCTG 600
CAGCACTGAA GGGCGGAAAC CCTCCAACAC TTAGCACTCA TCGTTTACGG 650
CGTGGACTAC CAGGGTATCT AATCTGTTT GCTCCCACG CTTTCGAGCC 700
TCAGCGTCAG TTACAGACCA GAGAGCCGCC TTCGCCACTG GTGTTCCCTC 750
ATATATCTAC GCATTCACC GCTACACATG GAATTCACCT CTCTCTTCT 800
GCACTCAGT CTCCAGTTT CCAATGACC TCCCGGGTTG AGCCGGGGGC 850
TTTACATCA GACTTAAGAA ACCGCTGCG CTCGCTTTAC GCCCAATAAA 900
TCCGGACAAC GCTTGCCACC TACGTATTAC CGCGGTGCT GGCACGTAGT 950
TAGCGTGGC TTTCTGTTA GATACGTC A GGGGACGTTT AGTTACTAAC 1000
GTCCTTGTTT TTCTCTA 1017
    
```

Gambar 5. Urutan nukleotida fragmen Gen 16S rRNA menggunakan primer UniB1

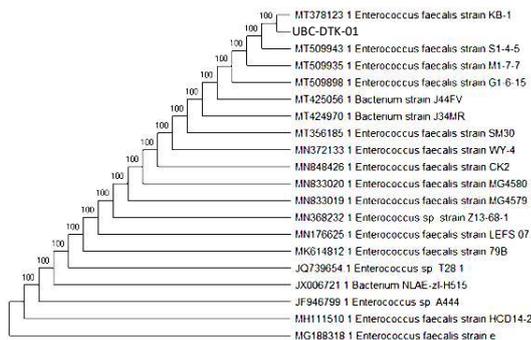
Urutan nukleotida fragmen Gen 16S rRNA dibandingkan dengan website *Genbank* program BLASTn. Hasil kesamaan basa nukleotida Gen 16S rRNA dengan data yang ada di *Genbank*. Hasil identifikasi yang dimuat pada Gambar 6 diketahui bahwa gen 16S rRNA isolat bakteri UBC-DTK-01 memiliki kesamaan lebih dari 97% dengan sekuensi yang ada di *Genbank*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 2358.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1462	MF568111.3
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 1369.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1457	MT543505.3
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 40-3.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1434	MT378328.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 40-1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1429	MT378329.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 41-1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1468	MT502943.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain M1-7.7.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1424	MT502932.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain M1-7.5.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1423	MT502933.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain M1-6.2.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1420	MT502932.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 51-6.15.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2614	2614	100%	0.0	100.00%	1468	MT503063.3
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 2457V.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus	2614	2614	100%	0.0	100.00%	1433	MT542656.3
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 1248M.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus	2614	2614	100%	0.0	100.00%	1432	MT542657.3
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 1248M.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus	2614	2614	100%	0.0	100.00%	1431	MT542656.3
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 5103.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1485	MT362105.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus faecalis strain 5103.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecalis	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1499	MT362104.1

Gambar 6. Hasil penjabaran Gen 16S rRNA UBC-DTK-01 di Genbank

Kesamaan lebih besar dari 97% menyatakan bahwa spesies yang sama, sedangkan kesamaan yang kurang dari 97% menyatakan spesies yang berbeda atau bakteri yang diidentifikasi merupakan spesies baru (14). Hasil kesamaan lebih dari 97% dapat disimpulkan isolat bakteri UBC-DTK-01 termasuk dalam kelompok spesies *Enterococcus faecalis*.

Hasil Kesamaan gen 16S rRNA pada BLAST diambil 19 isolat secara acak dan dilakukan penjabaran dengan MEGA X dalam bentuk filogenetik. Pohon filogenetik bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari spesies *Enterococcus faecalis* strain UBC-DTK-01 dengan 19 spesies yang ada pada Genbank. Spesies *Enterococcus faecalis* strain UBC-DTK-01 memiliki hubungan kekerabatan sama dengan *Enterococcus faecalis* strain KB-1 dimuat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hubungan kekerabatan Spesies *Enterococcus faecalis* strain UBC-DTK-01 dengan isolat di Genbank

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih Tilatang Kamang Agam termasuk kelompok spesies *Enterococcus faecalis* strain UBC-DTK-01 yang hubungan kekerabatannya sama dengan *Enterococcus faecalis* strain KB-1. Hasil penelitian ini dapat digunakan dalam pengembangan ilmu dan teknologi tentang gen 16S rRNA sebagai penentu kelompok spesies suatu bakteri.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada laboratorium kimia, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Padang atas bantuan penggunaan fasilitas yang ada dilaboratorium dan dukungannya.

#### REFERENSI

1. Wijayanti M, Thohari I, Purwadi P. Manufacture of Goat Milk Dadih Incubated using Variety of Bambooes. J Ilmu dan Teknol Has Ternak.

2016;11(1):22–37.

2. Putra A, Marlida Y, Azhike S, Wulandari dan R. Perkembangan dan Usaha Pengembangan Dadih: Sebuah Review tentang Susu Fermentasi Tradisional Minangkabau Recent Situation and Development Efforts of Dadih: A Review of Minangkabau Traditional Fermented Milk. J Peternak Indones Oktober. 2011;13(3):159–70.

3. Usmiati S, Broto W, Setiyanto H. Karakteristik Dadih Susu Sapi yang Menggunakan Starter Bakteri Probiotik. Jitv. 2011;16(2):140–52.

4. Delvia F, Fridayanti A, Ibrahim A. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga (*Mangifera indica L.*). 2015;1(2):114–20.

5. Syukur S, Fachrial E, Jamsari. Isolation, Antimicrobial Activity and Protein Bacteriocin Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dadih in Solok, West Sumatera, Indonesia. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2014;5(6):1096–104.

6. Yi L, Qi T, Hong Y, Deng L, Zeng K. Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria in Chinese Homemade Pickle and Dry-Cured Meat, and Bacteriocin Identification by Genome Sequencing. Lwt [Internet]. 2020;125(October 2019):109177. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109177>

7. Asli P, Barat S. Pengembangan Dadih Sebagai Pangan Fungsional Probiotik Asli Sumatera Barat. Pengemb Dadih Sebagai Pangan Fungsional Probiotik Asli Sumatera Barat. 2013;32(1):20–9.

8. Azhar, M. 2016. "Biomolekul sel" Padang : UNP Press

9. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev. 2004;17(4):840–62.

10. Harun H, Wirasti Y, Purwanto B, Purwati E. Characterization of Lactic Acid Bacteria and Determination of Antimicrobial Activity in Dadih from Air Dingin Alahan Panjang District, Solok Regency-West Sumatera. Syst Rev Pharm. 2020;11(3):583–6.

11. Ihsan YN, Fellatami K, Permana R, Mulyani Y, Pribadi TDK. Analisis Bakteri Pereduksi Konsentrasi Logam Timbal Pb(CH3COO)<sub>2</sub> Menggunakan Gen 16S rRNA. J Kelaut Indones J Mar Sci Technol. 2020;13(2):151–62.

12. Nuroniyah, T dan Surya Rosa Putra. 2012. "Identifikasi Spesies Isolat Bakteri S1 dengan Metode Analisa Sekuen Fragmen Gen 16s rdNA. "Jurnal Teknik Pomits Vol. 1, No. 1, (2012) 1-6

13. Faatih, Mukhlissul. 2009. "Isolasi dan Digesti DNA Kromosom. Jurnal Penelitian Sains & Teknologi, Vol. 10, No. 1, 2009: 61 - 67

14. Demerdash, Hassan A,M,El. 2012. "A Simple and Inexpensive Procedure for Chromosomal DNA Extraction from Streptococcus Thermophilus Strains". Middle-East Journal of Scientific Research. 11, 1, 13-18