

IDENTIFICATION OF 16S rRNA GENE FRAGMENTS LACTIC ACID BACTERIA UBC-DA-08 FROM DADIH

IDENTIFIKASI FRAGMENT GEN 16S rRNA BAKTERI ASAM LAKTAT UBC-DA-08 DARI DADIH

Ike Ramadhanty Daniel¹⁾, Minda Azhar²⁾,

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jln. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Padang, Indonesia Telp. 0751 7057420

¹kekedaniel85@gmail.com

²minda@fmipa.unp.ac.id

Abstract — Bacterial identification can be done by phenotypically and genotypes use the 16S rRNA gene. This study aims to determine the species of lactic acid bacteria isolates in Dadih. The first step of identification of bacteria by screening and isolating lactic acid bacteria found in Dadih, then isolate the bacterial isolate chromosome DNA from screening (UBC-DA-08). Bacterial chromosome DNA was used as a template for amplification of the 16S rRNA gene using the PCR method. Amplikon was electrophoresed using agarose gel and purified for sequencing. Sequencing of the 16S rRNA gene was carried out using the Dideoxy-Sanger method. Sequencing bases of nucleotide sequences were analyzed using the DNASTar program. The 16S rRNA gene size of the UBC-DA-08 bacterial isolate consisted of 896 bp (base pair). The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene can be read using the BLASTn and MEGA programs. The results of identification of UBC-DA-08 bacterial isolates were lactic acid bacteria including the *Lactococcus lactis* group.

Keywords: Dadih, Lactic Acid Bacteria, Gene 16S rRNA

I. Pendahuluan

Dadiah merupakan produk tradisional alami susu kerbau yang diolah melalui proses fermentasi pada tabung bambu yang ditutup daun pisang dengan kondisi fakultatif anaerob pada suhu ruang hingga terbentuk gumpalan menyerupai pasta atau semi padat.^[1] Susu mengandung laktosa yang kemudian melalui proses fermentasi akan dihidrolisis oleh enzim laktase.^[2] Aktifitas enzim laktase ini menyebabkan terjadinya perubahan laktosa menjadi glukosa dan galaktosa yang kemudian akan menghasilkan asam laktat.^[3]

Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang sering digunakan sebagai pangan fungsional karena manfaatnya yang baik untuk kesehatan dan sering digunakan sebagai pengawet alami makanan.^[4] Bakteri asam laktat adalah bakteri gram positif bentuk batang atau *coccus*, tidak membentuk spora, bersifat fakultatif anaerob dan memproduksi asam laktat sebagai hasil utamanya selama fermentasi laktosa.^[5]

Bakteri asam laktat pada dadiah dapat diidentifikasi kelompok genus atau spesiesnya secara fenotip dan genotip. Identifikasi secara

fenotif dilakukan secara makroskopis (bentuk, warna, dan ukuran koloni bakteri), mikroskopis (bentuk dan warna sel bakteri), motilitas dan uji biokimia dari bakteri. Identifikasi ini membutuhkan waktu yang lama dibandingkan identifikasi bakteri secara genotip. Identifikasi secara genotip menggunakan gen 16S rRNA mempunyai kelebihan yaitu pengerjaannya cepat dan akurat.^[6]

Gen 16S rRNA dimanfaatkan sebagai parameter sistematis molekular yang universal, karena gen 16S rRNA ini tidak tergantung pada pertumbuhan dan media yang digunakan^[7]. Sebagai penanda molekular yang paling banyak digunakan adalah RNA ribosomal (rRNA). Ada tiga jenis gen pengkode rRNA pada prokaryot diantaranya 5S rRNA, 16S rRNA, dan 23S rRNA. Dari ketiga jenis gen tersebut, gen 16S rRNA adalah gen yang paling umum digunakan karena ukuran gen 16S rRNA cukup memadai dan memudahkan dalam proses amplifikasi gen tersebut secara PCR dan dalam proses sekuensing^[8]. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kelompok spesies bakteri asam laktat isolat UBC-DA-08 menggunakan gen 16S rRNA.

II. Metodologi

A. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat gelas, mikropipet, *mikrotube*, inkubator, alat elektroforesis, UV-Transamiliator, sentrifus, alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Isolat bakteri, EDTA 50mM, Lysozym 10mg/ml, Genomic DNA Purification Kit (Promega), Es Batu, etanol dingin 70%, isopropanol, Agarosa 1%, Buffer TAE 1x, Etidium Bromida, Loading dye, DNA Ladder 1 kb, KAPPA Taq Extra HotStart ReadyMix PCR Kit

B. Isolasi DNA Kromosom Isolat Bakteri UBC-DA-08

Isolasi DNA kromosom bakteri dilakukan menggunakan prosedur pada *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Kultur Isolat bakteri UBC-DA-08 dimasukkan ke dalam *mikrotube*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 2 menit. Supernatan yang telah terpisah dari endapan dibuang. Endapan ditambahkan 480 µL EDTA 50 mM sehingga tersuspensi dan ditambahkan 120 µL *Lysozyme* 10 mg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Endapan dan supernatan dipisah. Endapan ditambahkan 600 µL *Nucleic Lysis Solution* hingga tersuspensi dan diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit, kemudian dibiarkan dingin pada suhu kamar dan ditambahkan 3 µL *RNAse*. Campuran dihomogenkan selama 2-5 menit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit kemudian dibiarkan dingin pada suhu kamar. Campuran ditambahkan 200 µL *Protein Precipitation Solution* kemudian divortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik dan direndam di dalam es selama 5 menit. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam *mikrotube* yang sudah berisi 600 µL isopropanol. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Endapan ditambahkan 600 µL ethanol 70% dingin dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan endapan dibiarkan kering pada inkubator. Setelah kering ditambahkan *DNA Rehydration Solution* sebanyak 100 µL, dan didiamkan semalam pada suhu 4°C. DNA hasil isolasi disimpan pada suhu -20°C^[9].

C. Elektroforesis DNA Kromosom Isolat Bakteri UBC-DA-08

Tahap awal elektroforesis DNA kromosom adalah menyiapkan gel agarosa 1% dengan cara 0.5 gram agarosa bubuk, dilarutkan dengan 50 mL TAE 1x, kemudian dipanaskan hingga mendidih menggunakan *mikrowave*. Campuran didinginkan hingga suhu 45-50°C dan ditambahkan 1 µL *etidium bromida* dan diaduk hingga homogen. Larutan agarosa dituangkan ke cetakan yang telah dipasang sisir pembuatan sumur sampel, agarosa dibiarkan mengeras. Setelah mengeras dicabut sisir dari cetakan. Pindahkan gel agarosa ke dalam alat elektroforesis dan dituang buffer TAE 1x hingga gel agarosa terendam. Buat campuran DNA kromosom 1 µL dan *loading dye* 1 µL diaduk hingga homogen dan dimasukkan ke dalam lubang sumur. Sumur lainnya sebagai marker yang berisi campuran *DNA ladder 1 kb* 1 µL dan *loading dye* 1 µL. Hubungkan elektroda pada *power supply* dan dinyalakan selama 45 menit dengan tegangan 80 volt. Setelah selesai gel agarosa dipindahkan ke UV-transamiliator dan diamati hasil elektroforesis.^[10]

D. Amplifikasi gen 16S rRNA Isolat Bakteri UBC-DA-08

Amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri UBC-DA-08 menggunakan metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Total volume campuran reaksi adalah 50 µL yang terdiri dari 3.5 µL MgCl₂ 25 mM; 1.5 µL dNTPs; 2.5 µL primer BactF1 10 µM; 2.5 µL primer UniB1 10 µM; 27.5 µL ddH₂O steril; 2 µL DNA kromosom isolat bakteri; 10 µL KAPA Taq Ekstra Buffer (tanpa Mg²⁺); 0.5 µL KAPA Taq Ekstra Buffer Hotstart *DNA Polymerase* dan homogenkan. Campuran yang telah homogen dimasukkan ke dalam alat PCR. Proses PCR dilakukan pada denaturasi awal 94°C selama 3 menit, denaturasi akhir 94°C selama 30 detik, *annealing* 48°C selama 30 detik, *elongasi* 72°C selama 1 menit 30 detik, *post elongasi* 72°C selama 5 menit. Siklus PCR dilakukan sebanyak 29 kali. Amplikon dielektroforesis pada gel agarosa 1%.^[11]

E. Sekuensing Gen 16S rRNA Isolat Bakteri UBC-DA-08 dengan Metode Dideoxy-Sanger

Gen 16S rRNA disekuensing dari isolat bakteri UBC-DA-08 dan dikirim ke 1stBASE

F. Analisa Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Bakteri Hasil Sekuensing.

Data hasil sekuensing dikirim dalam bentuk *electropherogram*. Hasil sekuensing dibaca menggunakan program DNASTar, kemudian disalin

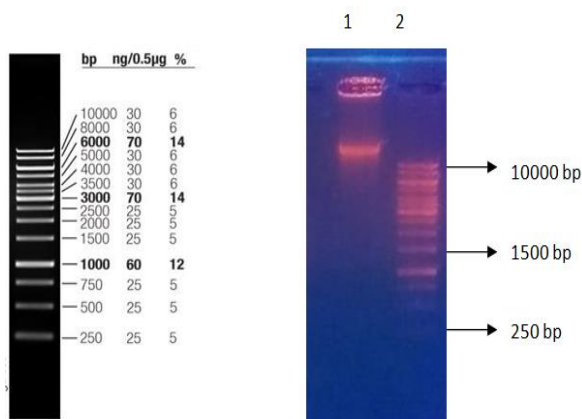
ke notepad dan data dipindahkan pada website *Genbank* menggunakan *BLASTn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Hubungan kekerabatannya dilihat menggunakan program *MEGA 5.0*

III. Hasil dan pembahasan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang, mulai Bulan November 2018 sampai Maret 2019 dan menggunakan alat *Polymerase Chain Reaction (PCR)* di Laboratorium Penelitian Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

A. Isolasi Fragmen Gen 16S rRNA menggunakan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Isolasi DNA kromosom bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega). Isolasi DNA kromosom merupakan teknik pemisahan DNA kromosom bakteri dari komponen-komponen sel lain yang bertujuan untuk memperoleh DNA kromosom murni.

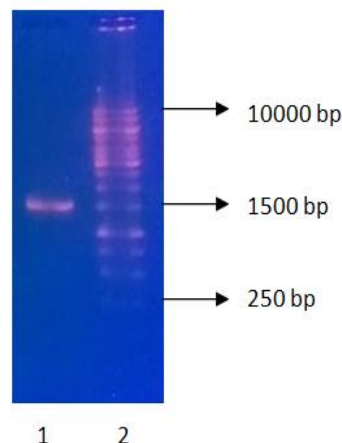


Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA kromosom Isolat Bakteri UBC-DA-08
 (1) DNA kromosom isolat bakteri
 (2) DNA Ladder 1 kb

Elektroforesis gel agarosa merupakan teknik pemisahan molekul DNA pada gel agarosa berdasarkan berat molekul dan medan listrik^[10]. Elektroforesis DNA kromosom digunakan Sebagai marker DNA digunakan *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. Marker DNA memiliki 14 pita DNA yang digunakan sebagai pembanding terhadap sampel hasil elektroforesis. Hasil elektroforesis DNA kromosom pada Gambar 1, terdapat satu pita murni jauh di atas pita marker 10.000 bp. Konsentrasi DNA kromosom bakteri

hasil isolasi diperkirakan memiliki konsentrasi 70 ng/µL.

Amplifikasi Sekuen gen 16S rRNA disekuensing menggunakan dua buah primer yaitu primer forward *BacF1* (5'AGAGTTTGATC(A/C) TGGCTCAG3') dan primer reverse *UniB1* (5'GGTAC(G/C)TTGTTCGA CTT3')

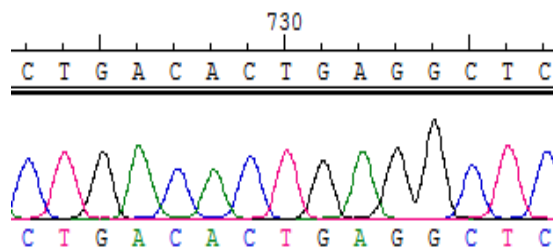


Gambar 2. Amplikon *Fragmen Gen 16S rRNA* metode *Polymerase Chain Reaction*
 (1) Amplikon PCR UBC-DA-08
 (2) DNA Ladder 1 kb

Hasil elektroforesis pada Gambar 2 menunjukkan bahwa terdapat pita fragmen DNA berukuran 1500 bp yang merupakan ukuran gen 16S rRNA^[7]. Konsentrasi gen 16S rRNA hasil elektroforesis pada Gambar 2 diperkirakan adalah 100 ng/µL.

B. Analisa Sekuensing Gen 16S rRNA Isolat Bakteri UBC-DA-08

Hasil sekuensing berupa grafik *electropherogram* yang dibaca dengan program *DNAStar*. Potongan *electropherogram* dapat dilihat pada Gambar 3. Urutan basa nukleotida hasil pembacaan di program *DNAStar* menggunakan primer *BactF1*(forward) terbaca sebanyak 896 bp (Gambar 4).



Gambar 3. Potongan *Elektropherogram* yang dibaca menggunakan program DNASTar

- (-) Basa Nukleotida Guanin
- (-) Basa Nukleotida Timin
- (-) Basa Nukleotida Adenin
- (-) Basa Nukleotida Sitosin

```

AGTTTGGTAC TTGTACCGAC TGGATGAGCA GCGAACGGGT GAGTAACGCG 50
TGGGGAATCT GCCTTTGAGC GGGGGACAAC ATTTGGAAAC GAATGCTAAT 100
ACCGCATAAA AACTTTAAAC ACAAGTTTTA AGTTTGAAGG ATGCAATTGC 150
ATCACTCAA GATGATCCCG CGTTGTATTA GCTAGTTGGT GAGTAAAGG 200
CTCACCAAG CGATGATACA TAGCCGACCT GAGAGGGTGA TCGGCCACAT 250
TGGGACTGAG ACACGGCCCA AACTCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC 300
TTCGGCAATG GACGAAAGTC TGACCCGAGCA ACGCCGCGTG AGTGAAGAAG 350
GTTTTCCGAT CGTAAAACTC TGTTGGTAGA GAAGAAGCTT GGTGAGAGTG 400
GAAAGCTCAT CAAGTGACGG TAACTACCCA GAAAGGGACG GCTAACTACG 450
TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGTCCT GAGCGTTGTC CGGATTTATT 500
GGCGCTAAAG CGAGCGCAGG TGGTTTATTA AGTCTGGTGT AAAAGGCAGT 550
GGCTCAACCA TTGTATGCAT TGGAAACTGG TAGACTTGAG TGCAGGAGAG 600
GAGAGTGGAA TTCCATGTGT AGCGGTGAAA TGCCTAGATA TATGGAGGAA 650
CACCCTGGGC GAAAGCGGCT CTCTGGCCTG TAACTGACAC TGAGGCTCGA 700
AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAG 750
CGATGAGTGC TAGATGTAGG GAGCTATAAG TTCTCTGTAT CGCAGCTAAC 800
GCAATAAGCA CTCCGCCTGG GGAGTACGAC CGCAAGGTTG AAATCAAAG 850
GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTC 896
    
```

Gambar 4. Urutan Basa Nukleotida Hasil Pembacaan di Program DNASTar Menggunakan Primer BactF1

Identifikasi genus dan spesies isolat bakteri asam laktat dilakukan secara *online* di website *Genbank* menggunakan program BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Hubungan kekerabatan dilihat menggunakan program MEGA 5.0.

sequences producing significant alignments:

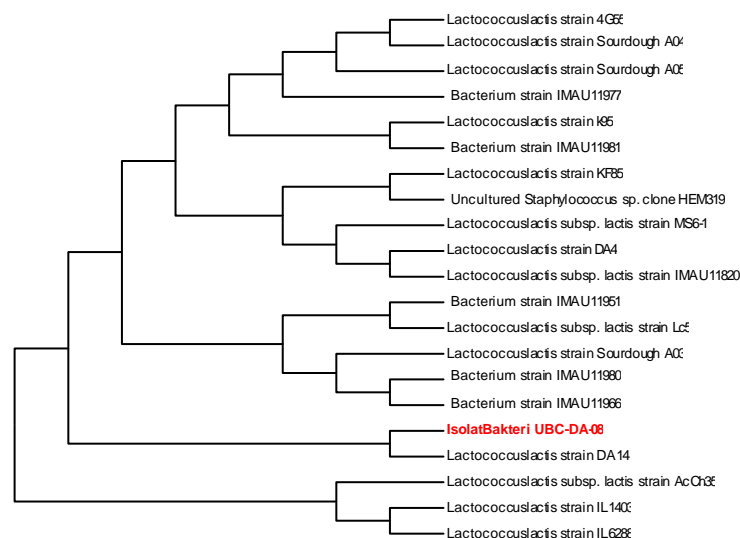
elect: All None Selected: 20

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Lactococcus lactis strain DA14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG374937.1
Lactococcus lactis subsp. lactis strain Ac7035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG374927.1
Lactococcus lactis strain DA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG292329.1
Lactococcus lactis strain IL1403 chromosome	1655	9804	100%	0.0	100.00%	CP103937.1
Lactococcus lactis strain IL6288 chromosome, complete genome	1655	9804	100%	0.0	100.00%	CP103936.1
Lactococcus lactis subsp. lactis strain MST-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG375401.1
Lactococcus lactis subsp. lactis strain MS6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG375399.1
Lactococcus lactis strain 4G66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG292321.1
Lactococcus lactis strain CE06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG375398.1
Lactococcus lactis strain K95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG375349.1
Bacterium strain IMAU11981 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG393801.1
Bacterium strain IMAU11980 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG393791.1
Bacterium strain IMAU11977 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1655	1655	100%	0.0	100.00%	MG393701.1

Gambar 5. Hasil Sekuen Isolat Bakteri UBC-Da-08 pada program BLASTn

Berdasarkan hasil identifikasi pada Gambar 5 dilihat bahwa gen 16S rRNA isolat bakteri UBC-DA-08 memiliki kesamaan lebih dari 97% dengan data yang ada di *GenBank*.



Gambar 6. Pohon Filogenetika Isolat Bakteri UBC-DA-08

Hasil BLASTn diambil secara acak sebanyak 20 spesies, kemudian dibuat pohon filogenetiknya dengan gen 16S rRNA isolat bakteri UBC-DA-08 menggunakan program MEGA 5.0. Pohon filogenetik yang digunakan untuk melihat kekerabatan spesies isolat bakteri UBC-DA-08 dengan 20 spesies lain yang ada di *GenBank*. Berdasarkan pohon filogenetika bakteri asam laktat pada Gambar 6, isolat bakteri UBC-DA-08

memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan kelompok spesies *Lactococcus lactis* yang merupakan jenis bakteri asam laktat.

IV. Kesimpulan

Berdasarkan identifikasi genotif gen 16S rRNA isolat bakteri asam laktat UBC-DA-08 dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri tersebut termasuk kelompok spesies *Lactococcus lactis*.

REFERENSI

- [1] Putra, A.A., Marlida, Y., Khasrad., Azhike, S.Y.D., dan Wulandar, R. 2011. "Perkembangan dan Usaha Pengembangan Dadih: Sebuah Review tentang Susu Fermentasi Tradisional Minangkabau". *Jurnal Peternakan Indonesia, Oktober 2011 ISSN 1907-1760*
- [2] Afriani. 2010. "Pengaruh Penggunaan Starter Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus fermentum* terhadap Total Bakteri Asam Laktat, Kadar Asam dan Nilai pH Dadih Susu Sapi". *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan Mei, 2010, Vol. XIII, No. 6*
- [3] Laurence A. Moran, H. Robert Horton, K. Gray Scrimgeour, Marc D. Perry. 2012. "Principles of Biochemistry". Subowo, Mulyadi, S. Widodo dan Asep Nugraha. 1999. *Status dan Penyebaran Pb, Cd, dan Pestisida pada Lahan Sawah Intensifikasi di Pinggir Jalan Raya*. Prosiding. Bidang Kimia dan Bioteknologi Tanah, Puslittanak, Bogor.
- [4] Arsyik Ibrahim, Aditya Fridayanti, Fila Delvia. 2015 "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Buah Mangga (*Mangifera indica*L)". *Jurnal Ilmiah Manuntung, 1(2), 2015 ISSN Cetak. 2443-115X ISSN Elektronik. 2477-1821*.
- [5] Pato, U. 2003. "Potensi Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker". *Jurnal Natur Indonesia 5(2): 162- 166 (2003) ISSN 1410-979*
- [6] Azhar, M. 2016. "Biomolekul Sel" Padang : UNP Press
- [7] Clarridge. 2004. "Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases". *Clinical Microbiology Reviews, Oct. 2004, p. Vol.*

17, No. 40893-8512/04/\$08.00_0DOI:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

- [8] Azhar, M. 2015. "Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri Pendegradasi Inulin Dari Rizosfer Umbi Tanaman Dahlia". FMIPA UNP
- [9] Promega.com
- [10] 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*
- [11] KAPA, 2016. www.kapabiosystems.com