

16S rRNA Gene Amplification Of Endophytic Bacteria Which Produces Antimicrobial Compounds

Rahmat Afif, Dwi Hilda Putri

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang

derosostrada97@gmail.com

Abstract. Cases of bacterial resistance to antibiotics are a serious problem in the world of health. Exploration to find new sources of antibiotics needs to be done, one of them is by utilizing endophytic bacteria Andaleh. The purpose of this study was to amplify the 16S rRNA coding gene, three isolates of Andaleh endophytic bacteria producing antimicrobial compounds with ATB A4.1, B.J.T.A.2.1, B.J.T.A.3 isolate code. This research is a descriptive research, carried out from November 2017 to June 2018 at the Research Laboratory of the Biology Department FMIPA UNP. The results showed that the amplification of the 16S rRNA gene from the three isolates succeeded in producing a single DNA band located between DNA bands 2027bp and 564 bp from the marker λ HindIII.

Katakunci : 16S rRNA, PCR, Elektroforesis



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2017 by author and Universitas Negeri Padang.

1. PENDAHULUAN

Peningkatan kasus infeksi mengakibatkan meningkatnya penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik rentan memicu resistensi terhadap patogen khususnya bakteri (Sasongko, 2014). Eksplorasi untuk mencari sumber antibiotik yang baru perlu dilakukan, salah satunya dengan memanfaatkan endofit. Endofit merupakan mikroorganisme yang hidup dalam jaringan tumbuhan, tetapi tidak menimbulkan penyakit pada tumbuhan tersebut. Mikroba endofit mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya, beberapa diantaranya mampu menghasilkan senyawa antimikroba. Kemampuan mikroba endofit menghasilkan senyawa aktif antimikroba merupakan potensi yang dapat dikembangkan, mengingat ekstraksi senyawa aktif dari tumbuhan langsung tidak efisien (Zulkifli, 2016, Yulianti, 2012 dan Castillo, 2003).

Salah satu tumbuhan yang dapat dijadikan sumber bakteri endofit adalah Andaleh (*Morus macroura* Miq.). Penelitian mengenai Andaleh menunjukkan tumbuhan ini mengandung senyawa yang memiliki aktifitas antibakteri (Syah dkk, 2000). Afifah (2018)

dan Yandila (2018) telah berhasil mengisolasi bakteri endofit dari tumbuhan Andaleh yang berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba, namun penelitian yang telah dilakukan belum dapat menentukan jenis bakteri yang telah diisolasi. Identifikasi yang baik berguna untuk memudahkan dalam komunikasi ilmiah dan mempelajari karakteristik bakteri lebih spesifik, sehingga dapat dikembangkan menjadi penelitian yang lebih maju.

DNA genomik bakteri mengkodekan semua informasi genetik yang diperlukan untuk memfungsikan sel bakteri. Gen pengkode 16S rRNA banyak digunakan untuk identifikasi bakteri dengan pendekatan molekular karna memiliki daerah yang konserfatif dan variatif. Isolasi DNA genomik yang cepat dari mikroorganisme sangat penting untuk analisis DNA seperti PCR dan sekuensing (Clarridge, 2004 dan Cheng, 2006).

Gen pengkode 16S rRNA dapat diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer universal spesifik terhadap gen 16S rRNA. Produk PCR dapat digunakan untuk identifikasi jenis bakteri dengan metode sekuensing (Rinanda, 2011). Identifikasi ini sangat penting mengingat potensi yang dimiliki bakteri endofit Andaleh sebagai penghasil senyawa antimikroba dibidang pengobatan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengamplifikasi gen pengkode 16S rRNA tiga isolat bakteri endofit Andaleh dari penelitian Afifah (2018), dan Yandila (2018) dengan kode isolat ATB A4.1, B.J.T.A.2.1, dan B.J.T.A.3 menggunakan metode PCR.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: autoklaf, erlenmeyer, *beaker glass*, batang pengaduk, kompor listrik, jarum inokulasi, lampu bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung eppendorf, mikropipet, tip, *vortex*, *sentrifuge*, LAF (*laminar air flow*), timbangan analitik, mesin PCR, *microwave*, mesin elektroforesis, *UV illuminator*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: medium NA, aquades, Dream taq (Kit Thermo Scintific), primer *forward* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), primer *reverse* 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3'), TAE 1X, EtBr, Marker λ *HindIII*, dan *loading dye*. Isolat bakteri yang akan dianalisis merupakan stok kultur penelitian yang telah dilakukan oleh Afifah (2018), dan Yandila (2018).

2.2 Metode

2.2.1 Pembuatan media Nutrient Agar (NA)

Medium NA dibuat dengan menimbang bubuk NA sebanyak 20 g, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan aquades steril sampai volume 1000 ml. Campuran diaduk dan dipanaskan sampai mendidih, setelah mendidih medium

dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril masing masing 6 ml. Tabung ditutup rapat dengan kain kasa dan alumunium foil steril. Medium disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Medium didinginkan dengan posisi dimiringkan.

2.2.2 Peremajaan isolat bakteri

Peremajaan isolat dilakukan pada medium NA miring. Satu ose stok isolat bakteri digoreskan pada medium NA miring dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam.

2.2.3 Isolasi DNA bakteri

Isolasi genom bakteri dilakukan dengan metode *boiling* (Dashti *et al*, 2009). Sebanyak 2-3 ose koloni bakteri dimasukkan ke dalam tabung appendorf 1,5 ml yang berisi 200µl 1/10 buffer TE pH 8. Suspensi divorteks sampai homogen. Proses *boiling* dilakukan di dalam penangas air pada suhu 95-100°C, selama 15 menit. Suspensi selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit hingga terpisah supernatan dan *pellet*. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung ependorf baru dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan.

2.2.3 PCR dan Elektroforesis

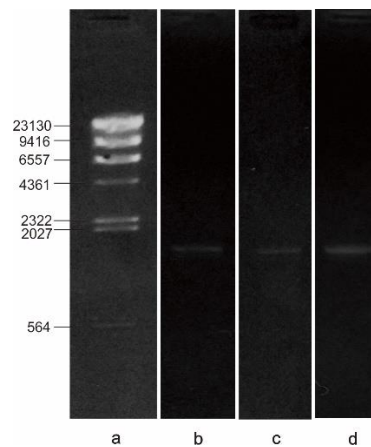
Proses amplifikasi dilakukan dengan metode PCR menggunakan alat *thermal cycle* dengan primer universal 27F (*forward*) dan 1492R (*reverse*). Reaksi PCR dilakukan dalam 25 ul reaksi, yang terdiri dari 6,5 µl ddH₂O, 12,5 µl Kit Dream Taq PCR (*Thermo Scientific*), 2 µl masing masing primer *forward* dan *reverse*, 2 µl DNA *template*. Suhu yang digunakan adalah denaturasi awal 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi 95°C selama 45 detik, penempelan primer (*annealing*) pada 55°C selama 30 detik, dan elongasi pada 72°C selama 2 menit. Reaksi ditutup dengan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Analisis produk PCR dilakukan dengan teknik elektroforesis menggunakan gel agarose 1%. Hasil elektroforesis selanjutnya di cek dengan *gel doc* elektroforesis.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

Penelitian ini dianalisis secara deskriptif. Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk gambar berupa hasil visualisasi gel elektroforesis menggunakan

agarose 1 % dalam buffer TAE dengan kondisi running 110 voltase selama 30 menit.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Produk amplifikasi gen 16S rRNA. (a) Marker; (b) Isolat ATB A4.1; (b) isolate B.J.T.A.2.1; (c) Isolat B.J.T.A.3

Gambar 1 menunjukkan bahwa proses amplifikasi gen 16S rRNA dari ketiga isolate berhasil menghasilkan pita DNA tunggal yang terletak antara pita DNA 2027 bp dan 564 bp dari marker λ *Hind*III. Besar produk PCR masing masing isolat yang telah berhasil diamplifikasi lebih kurang 1465 bp.

3.2 Pembahasan

Gen pengkode 16S rRNA adalah gen yang sangat lestari dalam satu spesies dan antar spesies dalam satu genus yang sama, sehingga cocok digunakan untuk identifikasi. Untuk mendapatkan gen pengkode 16S rRNA dapat dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik terhadap gen 16S rRNA. Dalam reaksi PCR diperlukan DNA cetakan untuk pembentukan DNA baru yang sama. DNA yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari ketiga isolat bakteri endofit Andaleh menggunakan metode *boiling* (Rinanda, 2013 dan Handoyo 2001).

Metode boiling merupakan salah satu metode ekstraksi DNA sederhana dengan memberikan gangguan fisik terhadap sel bakteri berupa pemanasan dengan suhu tinggi (95-100°C). Pemanasan dengan suhu tinggi dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga mengakibatkan masuknya cairan dan molekul di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel. Kemudian DNA dipisahkan untuk selanjutnya digunakan sebagai DNA dalam cetakan proses PCR (Sunarno, 2013).

Pada penelitian ini, proses PCR dilakukan dengan 35 siklus PCR. Keberhasilan proses PCR dapat dipengaruhi oleh kondisi reaksi PCR. Menurut Dwiyo (2010) dan Demeke (2009), kegagalan hasil PCR dapat disebabkan kontaminasi reaksi PCR seperti

pretein atau RNA yang dapat menutupi DNA target sehingga menghambat proses amplifikasi. Kontaminasi tersebut dapat berasal dari proses pengerjaan yang tidak baik pada tahap isolasi DNA maupun dalam pembuatan mix PCR. Kegagalan hasil PCR juga dapat dipengaruhi oleh kesesuaian primer yang digunakan dalam proses PCR.

Selanjutnya, analisis produk hasil PCR dilakukan dengan teknik elektroforeis menggunakan gel agarose 1% yang dapat memisahkan fragmen DNA yang berukuran 10-0.5 kb (Ausubel, 2003). Hasil elektroforeis produk PCR ketiga isolat bakteri endofit andaleh menghasilkan pita DNA tunggal yang terletak antara pita DNA 2027 bp dan 564 bp dari marker λ HindIII. Besar produk PCR masing masing isolat yang telah berhasil diamplifikasi lebih kurang 1465 bp.

4. KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengamplifikasi gen pengkode 16S rRNA dari isolat bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba dengan kode isolat ATB A4.1, B.J.T.A.2.1, dan B.J.T.A.3. Besar produk PCR masing masing isolat yang telah berhasil diamplifikasi lebih kurang 1465 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, N. 2018. Isolasi Bakteri Endofit dari Batang Tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.) dan Uji Potensinya sebagai Senyawa Antimikroba. Padang: FMIPA UNP.
- Asubil, Frederick M., et al. 2003. Current Protocols in Molekular Biology. USA: Jhon Wiley & Sons Inc; ringbou edittion
- Castillo, U., et al. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. FEMS Microbiology Letters, 183-190.
- Cheng, Hai-Rong and Ning Jian. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnology Letters, 28: 55-59
- Claridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Microbiology Review, 840-846.
- Dashti, A. A. 2009. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. Kuwait Medical Journal, 117-121.
- Dwiyitno. 2010. Identifikasi Bakteri Patogen Pada Produk Perikanan Dengan Teknik Molekular. Squalen, 67-78.
- Rinanda, T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. Journal Kedokteran Syiah Kuala, 172-177.

- Sunarno, dkk. 2014. Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diptheriae* untuk Pemeriksaan PCR. *Bul. Penelit. Kesehat.*, 42(2): 85-92
- Syah, Y. M., et al. 2000. Andalisin A, a new stilbene dimer from *Morus macroura*. *Fititerapia*, 630-635.
- Yandila, S. 2018. Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.) dan Uji Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. Padang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Yulianti, T. 2012. Menggali Potensi Endofit untuk Meningkatkan Kesehatan Tanaman Tebu Mendukung Peningkatan Produksi Gula. *Jurnal Perspektif*, 111-122.
- Zulkifli, L., dkk. 2016. Isolasi Bakteri Endofit Dari Sea Grass Yang Tumbuh Di Kawasan Pantai Pulau Lombok Dan Potensinya Sebagai Sumber Antimikroba Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Biologi Tropis*, 16(2), 80-93.