

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI PUPUK ORGANIK SISTIM BIOPORI MENGGUNAKAN GEN 16S rRNA

Feren C. Pagerapan¹, Suddin Simanjuntak², Decky D. W. Kamagi²

¹*Student of Biology Departement, Faculty of Matehematics and Natural Science, Manado State University, Indonesia*

²*Biology Departement, Faculty of Matehematics and Natural Science, Manado State University, Indonesia*

**Corresponding author: Ferencindi72@gmail.com*

Received: April 9, 2022

Accepted: June 11, 2022

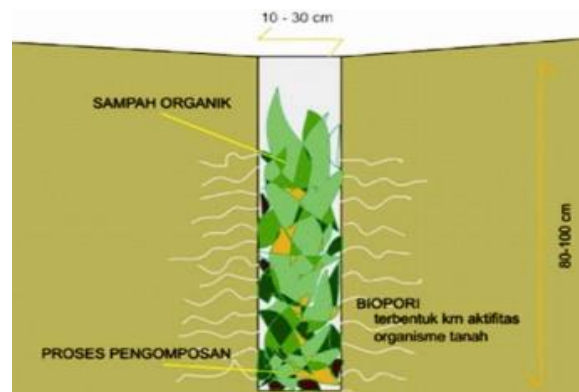
Abstrak

Bakteri dari pupuk organik sistim biopori masih perlu ditentukan kedudukan dalam klarifikasi bakteri. Untuk itu perlu dilakukan identifikasi pada tingkat spesies menggunakan analisis sekuen gen 16S rRNA. DNA bakteri dari pupuk organik sistim biopori di ekstrak untuk di identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Isolat yang diperoleh berasal dari sampel pupuk organik sistim biopori. Bakteri di isolasi pada media NA dengan metode tabur dan di inkubasi pada suhu kamar selama 2x24 jam. Isolate yang tumbuh pada media NA diekstraksi menggunakan Presto Mini gDNA Bacteria KIT. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR, visualisasi ampikon gen 16S rRNA dengan metode elektroforesis, Amplifikasi DNA target dilakukan dengan menggunakan primer 16sA dan 16sB2. Amplicon-ampikon dielektroforesis menggunakan gel agarose 1,6 dengan DNA Ladder 500-1500bp. Sekuensing menggunakan jasa sekuensing First Base Singapura. Hasil analisis penyelarasan menggunakan program BLAST (www.ncbi.nih.gov.com) 16S rRNA urutan isolat bakteri pupuk organik bp4 sistim biopori menunjukkan kemiripan 98% dengan *Bacillus cereus* strain MH19 (nomor tambahan CP039269.1). Hasil rekonstruksi filogeni dengan Neighbour Joining, urutan gen 16S Rrna isolate bp4 menunjukkan hubungan terdekat dengan *Bacillus cereus* strain MH19 (nomor tambahan CP039269.1).

Kata Kunci : Identifikasi Molekuler, bakteri pupuk organik, Gen 16S rRNA, sistem biopori

PENDAHULUAN

Lubang resapan biopori merupakan lubang kecil di dalam tanah yang terbentuk karena adanya aktivitas organisme tanah, Lubang resapan biopori dengan diameter 10cm kedalaman 100cm. Untuk menyediakan lingkungan yang kondusif bagi penciptaan biopori di dalam tanah perlu disediakan bahan organik yang cukup di dalam tanah. Peresapan air ke dalam tanah dapat diperlancar oleh adanya biopori yang diciptakan fauna tanah dan akar tanaman. organisme yang hidup di dalam tanah mencakup bakteri, jamur, akar tumbuhan, cacing tanah, rayap, semut (Permatasari 2015).



Gambar 1. Lubang resapan biopori

Mikroorganisme di dalam tanah membantu menjalankan perombakan bahan organik, mencampur bahan organik dengan baahan mineral, membuat Lorong-lorong dalam tubuh tanah yang memperlancar Gerakan air dan udara, dan mengalihtempatkan bahan tanah dari satu bagian ke bagian lain tubuh tanah. Bakteri dapat dijumpai dimana saja salah satunya pada Lubang resapan Biopori, bakteri memiliki jumlah yang sangat banyak dibandingkan dengan jumlah makhluk hidup lain dibumi (Wantania, dkk., 2016)

Mikroba perombak bahan organik secara alami atau sengaja diinokulasikan untuk mempercepat pengomposan dan meningkatkan mutu kompos. Tanaman memanfaatkan bahan organik sederhana tersebut, oleh karena itu aktifitas mikroorganisme sangat penting bagi kehidupan makhluk hidup. Metode identifikasi 16S rRNA sering digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan mikroorganisme, khususnya bakteri yang terdapat pada organisme eukariot karena bersifat ubiquitas dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal. Kunci untuk mengerti keragaman bakteri adalah metode identifikasi yang diandalkan, dengan berkembangnya identifikasi molekuler mikroorganisme, maka saat ini identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan metode berbasis molekuler dengan menggunakan gen 16s rRNA. (Rau, dkk, 2018).

Gen 16S rRNA adalah salah satu gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme (Rinanda 2011). Gen 16S rRNA digunakan untuk mempelajari spesies bakteri, dengan alasan bahwa: (1) Gen 16S rRNA terdapat di dalam semua sel bakteri, sering sebagai kelompok multigen atau operon (20 fungsi Gen 16S rRNA dalam waktu yang lama tidak berubah tergantung jarak evolusinya, dan (3) Gen 16S rRNA cukup Panjang yaitu 1500bp (Fatimali 2015).

Definisi memakai gen 16S rRNA sangat efisien untuk analisis urutan basa nukleotida, pada saat ini urutan basa nukleotida suatu gen seperti gen 16S rRNA paling sering digunakan untuk pengklasifikasian atau identifikasi bakteri, gen tersebut dipakai untuk marker molekuler dalam penentuan jenis bakteri. (Azhar, 2015) karna bersifat ubiquitis dan fungsi yang identik pada semua organisme, gen 16S rRNA dapat dipakai sebagai penanda molekuler (Pangastuti, 2006). Mengkonstruksi kekerabatan mikroba pada tingkat spesies gen 16S rRNA sudah digunakan sebagai parameter sistematik molekuler universal, representative. (Aris, dkk, 2013).

METODE

Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2019 sampai dengan November 2019 dan bertempat di laboratorium jurusan Biologi Universita Negeri Manado.

Alat Dan Bahan

Alat dan bahan yang dipakai pada penelitian ini yakni, sampel pupuk organik dari LRB, media NA (Nutrien Agar), serasah, bor biopori, parang, linggis, papan, pH meter, termometer, autoklaf, inkubator, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, kaca slide/objek, mikroskop, lampu spritus, tabung durham, tabung hush, aluminium foil, plastik wrap, mikropipet, mesin PCR, MUPID-like Electrophoresis Simple Unit, UV transilluminaor, Biodoc Digital compact, Simplicity Water Purification System, pellet pestle, tabung ependorf, sarung tangan dan hotplate.

Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian deskriptif. Data hasil penelitian diperoleh melalaui kegiatan ekperimen laboratorium. Tahapan penelitian adalah isolasi bakteri, ekstrasi dan purifikasi DNA total, amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR, visualisasi ampikon gen 16S rRNA dengan metode elektroforesis, sekuensing dan analisis sekuens.

Ekstrasi DNA.

DNA isolat bakteri diektrasi dan purifikasi dengan Presto TM Bacteria Kit Geneaid dengan prosedur penelitian bakteri gram positif menurut protocol Kit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan Sampel Pupuk Organik Sistim Biopori

Sampel diambil dari hasil pupuk organik yang dihasilkan oleh sisitim biopori dan disimpan dalam plastik sampel yang sudah disterilkan terlebih dahulu pada suhu kamar (Gambar 2).



Gambar 2. Sampel pupuk organik sistim biopori

Isolasi dan Kultur Murni

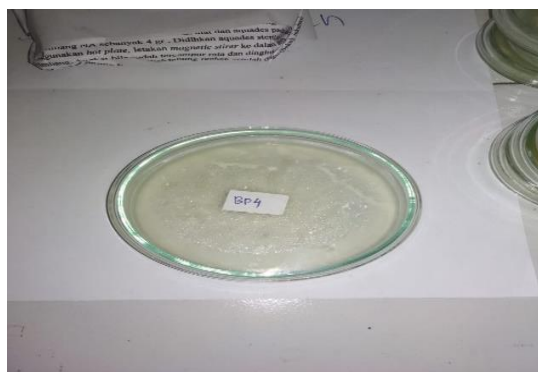
Isolasi bakteri dilakukan dengan menuangkan media NA yang sudah steril ke cawan petri steril, sesudah media padat sebanyak 1 gram sampel pupuk organik diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri dengan metode tabur, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam, sehingga ada terlihat koloni-koloni bakteri yang tumbuh (Gambar 3). Koloni bakteri yang tumbuh pada media NA disubkulturkan lagi pada cawan petri yang sudah di sterilkan yang berisi media NA dengan metode kuadran, kemudian

diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam sampai terlihat koloni-koloni tunggal tumbuh.



Gambar 3. Isolasi bakteri pupuk organik sistem biopori

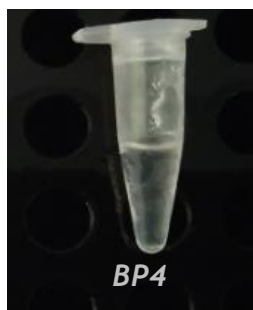
Sampel pupuk yang dihasilkan oleh sistim biopori (LRB) diisolasi pada media NA dengan metode tabur menghasilkan isolat BP4. Isolat tersebut dikulturkan kembali pada media NA yang baru dan didapat isolat murni yang dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Isolat murni bakteri pupuk organik sistim biopori.

Ekstraksi DNA

DNA dari pupuk organik sistim biopori di ekstrasi dan purifikasi berdasarkan protokol *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit Geneaid*. Ekstraksi DNA dilakukan dengan beberapa tahap yaitu Tahap Peningkatan DNA, Tahap Pengikatan DNA, Tahap Preparasi sample, Tahap Lisis, Tahap Pengikatan DNA, Tahap Pencucian, Tahap Pemisahan DNA setelah di ekstrasi diperoleh hasil akhir berupa dsDNA dengan volume 100 μ l dari isolat pupuk organik sistim biopori.



Gambar 5. dsDNA hasil ekstrasi isolate bakteri pupuk organic sistimbiopori bp4

Uji Kemurnian DNA Bakteri

Hasil pengukuran kemurnian DNA isolate bakteri dari bp4 adalah 0,01. Rasio kemurnian DNA

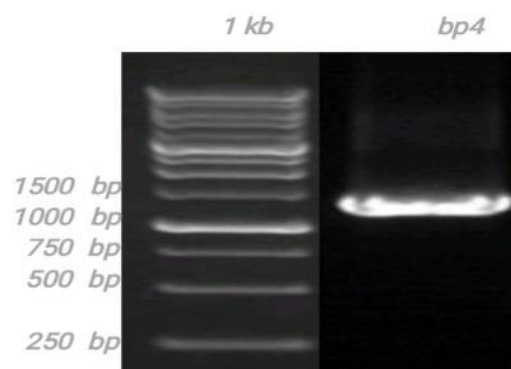
dias menunjukkan masih adanya sisa buffer yang terbawa selama proses isolasi.

Tabel 1. Uji Konsentrasi dan Kemurnian DNA

No Sampel	Konsentrasi		Kemurnian
	A260	A280	
1. Isolat bp4	0,001	0.062	0,01

Amplifikasi DNA Bakteri

dsDNA isolate bakteri hasil ekstraksi di amplifikasi memakai gen 16S rRNA dengan primer Forward (5'CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3') Reverse (5'TTT AAT CCA ACA TCG AGG 3'). Keberhasilan amplifikasi gen 16S rRNA di buktikan dengan visualisasi ampliko dengan Teknik elektroforesis 1,6 gel agarosa pada gambar 3, dari proses amplifikasi gen 16S rRNA isolate bakteri dari bp4 tervisualisasi pada 1024bp. Amplifikasi berlangsung dengan baik berdasarkan ketebalan amplikon sehingga dapat di lanjutkan ke tahap sekuensing.



Gambar 6. Visualisasi DNA bakteri pada pupuk organik sistim biopori di amplifikasi dengan Gen 16S rRNA

Sekuensing DNA

Sekuensing menggunakan jasa *First Base Malaysia*. Data hasil sekuensing di BLAST pada situs NCBI dan analisis menggunakan program MEGA dan Geneious. Dari *First Base Malaysia* dianalisis menggunakan program Geneious untuk mendapatkan urutan nukleotida gen 16S rRNA Bakteri dari pupuk organik sistim biopori. Data yang di peroleh berupa kromatogra dalam bentuk file dimana setiap nukleotida ditunjukkan oleh warna yang berbeda. Nukleotida Adenin (A) berwarna merah, Guanin (G) ditunjukkan dengan warna kuning, Timin (T) ditunjukkan dengan warna hijau dan Sitosin (C) ditunjukkan dengan warna biru. Program ini akan otomatis mengurutkan nukleotida sample sesuai dengan urutan posisi nukleotida.



Gambar 7. Kromatogram sekuens gen 16S rRNA isolate bp4

Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA bakteri

Isolate bakteri pupuk organik bp4 memiliki Panjang urutan basa nukleotida 1024bp, setelah dianalisis menggunakan program geneious dan program MEGA didapat urutan basa nukleotida gen 16S rRNA isolate bakteri pada pupuk organik sistim biopori dapat dilihat pada gambar 5.

```

1  AAATGGTGCTTTTCAACCTTATGGACCACTGAACGACGATTGGTCTACTGTCATGACATCGATGAAGAGAAAGTGGTATGC
2  CTCCATCGGGAAACCGATTGGAGTACAGCTGTATATGATTAGACGAGATTACACAGTACCACCTGGAGTAATGGTGAATTG
3  TATATTCGGGGGAGGGCTTCCGAACGGATTTAGGAAACCGAGTTAACGGCTGAACGGTTTGTGCAATCCTTATGGAAAC
4  AGGCAACGATGTACCGTACAGCGATCTAGTAAATGGCGCAAGATGGCTTCTAGAGTACATGAGCCCGCAGATCATCAAAATTA
5  AAATTCGTGGTTCCGAATTGAACGATGCTGAATGAAATGGTAGTACACGACATGAAAATATTAGCAACGAGTGGTATGGTACGA
6  GAAGCCGCTCCAAATGATAACGAATTCGTATATCTGTCGCAAGAGAGGAACGATTCATCTTCAGAAATTCCTTATGCT
7  TTCAGAAAGTTAGCGAATTTATGTTGGCCAGCAGATTGTTATGCTAGAGAAATTACCATTAAACCCAAATGGAAAGTTGATAGAA
8  AGAATTAACCTGCTCCAGATTATATGAATGAACAAATGAGAGAGTCTAGAAATCCGAAGAGAAATATTATGATTTATTTTCA
9  GAAGTACTTGGTGTTCGCAATTAGCATTGATGATAATTTCTTGAATGGGAGGACATTCGCTTTCATCTCTTTAATGGCAAG
10 AATTGCTGAACGTTAAGTGTGCACTAGGAATGGGAACATTTGAATGCCAATCTGCTGATTAAGCGAAACAAATGGATCAAG
11 CAAAAACGACGACCAATTAAGAAAGTAAGTAGACCAATGAAGTCCACCTTCAATTTGCGCAGCGTAGATTGTTCTTAAAT
12 TGTTAGAAGGACCAAGTCTCTCTATAATATTCCTGATGATT

```

Gambar 8. Urutan Basa Nukleotida Gen 16S rRNA Isolat bakteri bp4 menggunakan program geneious

Karakteristik Gen 16S rRNA Bakteri Pada Pupuk Organik Sistim Biopori

Sekuens sample bp4 setelah dianalisis contig untuk mendapatkan sekuens konsensus, dianalisis menyelaraskan pada sistus NCBI. Metode Basic Local Alignment Searching Test (BLAST). Digunakan untuk mendapatkan kesamaan sekuens 16S rRNA isolate Bakteri pupuk organik sistem biopori dari yang telah dilaporkan peneliti lain dari belahan dunia dan terdata di bank NCBI dapat dilihat pada tabel 1.

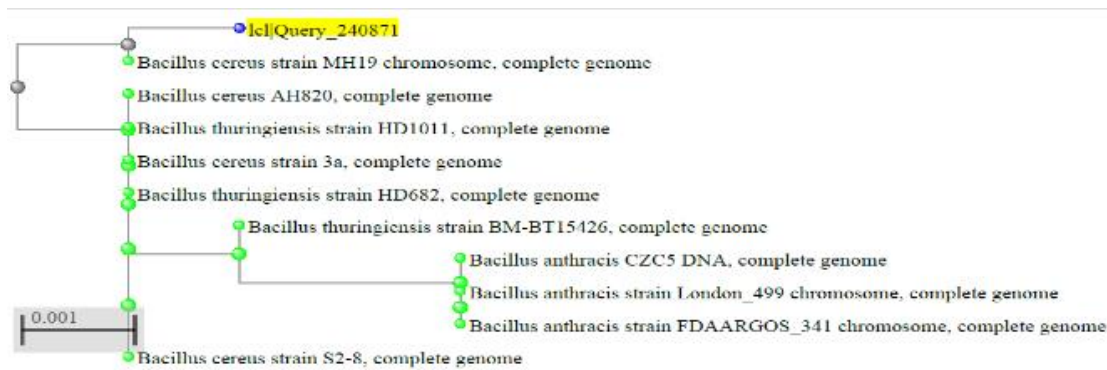
Tabel 2. Karakteristik Sekuens Gen 16S rRNA bakteri isolat BP4

Pupuk Organik Sitim Biopori BP4		
karakteristik	Freq	%
Komposisi Basa N		
A	341	33,3
C	165	16,1
G	236	23,0
T	282	27,5
GC	401	39,2
Panjang Sekuens	1024bp	100,0 %

Berdasarkan hasil BLAST isolate dari bp4 mempunyai skor tertinggi dimiliki *Bacillus cereus* strain MH19 yaitu 1866. Nilai identifikasi tertinggi untuk isolat dari bp4 dimiliki oleh *Bacillus cereus* strain MH19 yaitu sebesar 99.71%.

Rekonstruksi Filogeni Bakteri Pupuk Organik Sistem Biopori

Rekonstruksi filogeni berdasarkan sekuens 16S rRNA isolate bp4 dilakukan pada situs NCBI menggunakan program MEGA. Rekonstruksi filogeni pada situs NCBI dilakukan dengan metode Neighbor Joining menggunakan sepuluh sekuens termirip hasil BLAST untuk isolat bp4.



Gambar 9. Pohon Filogeni Isolat bp4 Metode Neighbour Joining menggunakan situs NCBI

Visualisasi pohon filogenetik isolate bakteri bp4 serupa/terdekat dengan *Bacillus cereus*. Dan memiliki evolusi dan kekerabatan dari *Bacillus sp* dan membentuk sub kelompok spesies *Bacillus cereus*. Hasil rekonstruksi filogeni pada situs NCBI menempatkan isolate bakteri pupuk organik sistem biopori dari bp4 memiliki hubungan evolusionis terdekat dengan *Bacillus cereus*.

PEMBAHASAN

Menurut penelitian Kamir R. Brata & Anne Nelistya (2008) peresapan air kedalam tanah pada lubang resapan biopori terbentuk karena adanya aktivitas organisme didalam tanah. Organisme yang hidup didalam tanah mencakup bakteri, jamur, akar tumbuhan, cacing tanah, rayap, semut dll. Berbagai jenis dan ukuran organisme tanah (biodiversitas tanah) menghuni berbagai ukuran pori yang dapat menyediakan ruang cukup. Selain menjadi tempat hunian, ruang pori tersebut juga menyuplai air, oksigen dan makanan yang cukup bagi kehidupan dan perkembangan organisme penghuninya. Bahan organik yang dapat digunakan sebagai sumber pupuk organik dapat berasal dari limbah hasil pertanian dan nonpertanian (limbah kota dan limbah industri) (Kurnia *et al.*, 2001). Semua bahan yang berasal dari makhluk hidup atau bahan organik dapat dibuat menjadi pupuk kompos. Salah satu metode untuk membuat pupuk kompos adalah membuat lubang resapan biopori.

Teknik molekuler untuk identifikasi spesies suatu bakteri yaitu dengan menggunakan analisis 16S rRNA. 16S rRNA berupa sekuens untuk mengidentifikasi bakteri dan urutan pasangan basanya, sehingga diperoleh hasil yang lebih akurat (Kusumawati 2004). Sekuens 16S rRNA digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan strain bakteri melalui proses penyejajaran (Cole *et al.* 2013). Sekuens 16S rRNA bersifat spesifik untuk prokariot, sehingga kesalahan yang terjadi selama proses penyejajaran nukleotida

dapat diminimalisir, yang membedakannya dengan eukariot. Kemiripan urutan basa nukleotida gen 16S rRNA mampu digunakan untuk mengidentifikasi bakteri pada tingkat spesies (Armougom dan Raoult 2009).

Sampel pupuk organik yang diambil dari lubang resapan biopori diisolasi pada media NA dengan metode tabur dan menghasilkan isolate BP4. Pada gambar 4 menunjukkan isolate dari pupuk organik BP4 dikulturkan kembali pada media NA yang baru dan menghasilkan isolate murni. Gambar 5 menunjukkan hasil akhir pada Ekstraksi DNA total menjadi amplicon atau dsDNA. Pada tabel 1 menunjukkan hasil pengukuran kemurnian DNA isolate bakteri dari bp4 adalah 0,01. Berdasarkan hasil BLAST isolate bp4 mempunyai skor tertinggi dimiliki oleh *Bacillus cereus* strain MH19 yaitu 1866. Hal tersebut menyatakan bahwa sekuensnya sangat mirip dengan sekuens yang dicari. *Query coverage* kesepuluh sekuens termirip menunjukkan nilai hingga 99% untuk sampel isolate. Nilai identifikasi tertinggi untuk isolate BP4 dimiliki oleh *Bacillus cereus* strain MH19, yaitu sebesar 99,7%.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa visualisasi pohon filogenetik isolate bakteri BP4 serupa/terdekat dengan *Bacillus cereus* dan memiliki evolusi dan kekerabatan dari *Bacillus sp* dan membentuk sub kelompok spesies *Bacillus cereus*. Hasil rekonstruksi filogeni pada situs NCBI menempatkan isolate bakteri pupuk organik sistem biopori dari BP4 memiliki hubungan evolusionis terdekat dengan *Bacillus cereus*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian didapat isolat bakteri pupuk organik dari sistem biopori BP4, sekuens isolat bakteri dari BP4 menunjukkan kemiripan (98%) dengan *Bacillus cereus* strain MH19 dari 10 sekuens termirip di NCBI dengan panjang sekuens 1024b. Hasil rekonstruksi filogeni dengan neighbour joining, urutan gen 16S rRNA menempatkan isolat bakteri dari BP4 menunjukkan hubungan terdekat dengan *Bacillus cereus* strain MH19.

DAFTAR PUSTAKA

- Aris. M. Sukenda. Harris. E. Ssukadis. M. F. Yuhana. M. 2013. Identifikasi molekular bakteri patogen dan desain primer PCR. Program Studi Budidaya Perairan FPIK-UNKHAIR Ternate, Maluku Utara.
- Azhar. A. 2015. Identifikasi molekular isolat bakteri Pendegradasi inulin dari Rizosfer Umbi tanaman dahlia. Laporan akhir penelitian percepatan Profesor. Universitas Negeri Padang.
- Armougom F, Raoult D (2009) Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *J Comput Sci Syst Biol* 2:074–092. doi: 10.4172/jcsb.1000019
- Brata, Kamir R dan Anne Nelistya, 2008. Lubang Resapan Biopori, Bogor.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM (2013) Ribosomal database project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:D633–642. doi: 10.1093/nar/gkt1244
- Kurnia, U., D. Setyorini, T. Prihatini, S. Rochayati, Sutono dan H. Muh. Alwi Akbar, Et al / Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian, Vol. 4 (2018) : 68-76
- Suganda. 2001. Perkembangan dan Penggunaan Pupuk Organik di Indonesia. Rapat Koordinasi Penerapan Penggunaan Pupuk Berimbang dan Peningkatan Penggunaan Pupuk Organik. Direktorat Pupuk dan Pestisida, Direktorat Jendral Bina Sarana Pertanian, Jakarta, Nopember 2001.

- Kusumawati DE (2014) Isolasi dan karakteristik senyawa antibakteri dari bakteri endofit tanaman miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth.). *Curr. Biochem.* 1:45–50. doi: 10.29244/cb.1.1.45-50
- Pangastuti. A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.
- Permatasari, L. 2015. Bioinfiltration Hole: "One Day For Biopore" as an Alternatif Prevent Flood. *International Journal of Advances in Science*
- Rau. H. C. Yudistira. A. Simbala. H. E. I. 2018. Isolasi, identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA, dan uji aktivitas antibakteri bakteri simbiosis endofit yang diisolasi dari alga halimeda *Opuntia*. *Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* Vol. 7 No. 2 MEI 2018
- Rinanda. T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA Di Bidang Mikrobiologi. <http://www.jurnal.unsyiah.ac.id/JKS/article/viewFile/3484/3238> (diakses 14 oktober 2018)
- Wantania, L. L., Ginting, E. L., Wullur, S. 2016. Isolasi Bakteri Simbiosis dengan Spons dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi.* 1(3): 57- 65.