

IDENTIFIKASI DAN KLASIFIKASI BAKTERI AMILOLITIK ISOLAT TG12, TG19, DAN TG31 PENYEBAB KEMASAMAN PADA TEPUNG SAGU BASAH BERDASARKAN ANALISIS GEN 16SRDNA

Tri Gunaedi^{1*}, Sebastian Margino², Langkah Sembiring³, dan Rarastoeti Pratiwi⁴

¹ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih Jayapura, ² Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada,

³ Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta

E-mail: gunaeditri@yahoo.co.id

ABSTRACT

16SrDNA gene were known essentially for procaryotic life involved bacteria. The gene very conserved such as usefull for bacterial identification and classification in phylogeny tree constructed. The object of this research were identified and cclassified amylolitic bacteria TG12, TG19 and TG31 isolates, causes sourness on raw starch sago by 16SrDNA gene sequences analysis approach. The native isolates from raw starch sago under traditionality processing arround Jayapura and selected depend on activity amylolitic and organic acid productivity. Before DNA genom extraction, isolates were throught out generic assignment analysis. Futhermore DNA genom were amplified and purified by PCR with 27f and 1529r primers. The pure of DNA was sequenced by ABI PRISM 310 DNA sequencer with internal primers 27f, 357f, 790f and 1230f. The generic assignment resulted those isolates related with Bacillus. The 16S rDNA data were aligned with corresponding available Bacillus sequences retrieved from the NCBI data base using the CLUSTAL X software. Phylogeny tree was constructed by PHYLIP programme and visualized by Treeview programme. Phylogenetic trees were and the extended the value of 16S rDNA sequencing in amylolitic bacteria causing sourness on raw starch sago. Completed 16S rDNA sequence data showed that two of the tested isolate TG12 formed a distinct center of diversity with Bacillus substilis DSM 10 AJ276351, isolate TG19 with Bacillus substilis strain 1778 EU982544 and TG31 similar genetic with Bacillus cereus strain WJL-063 FJ527559. Identification based on 16S rDNA gene sequences of amylolitic bacteria causing sourness on raw sago starch provided a powerfull way of uncovering genetic of strain within the spesies Bacillus substilis and Bacillus cereus.

Key words: amylolytic bacteria, classification, identification, gene sequence 16SrDNA

PENGANTAR

Tepung sagu basah merupakan produk pengolahan batang tanaman sagu (*Metroxylon sago* Rottb) yang umum terdapat di Jayapura dan sekitarnya serta diusahakan secara tradisional. Pengolahan batang sagu menjadi tepung sagu memerlukan media pelarut air dalam jumlah banyak. Air diperoleh dari badan air sekitar tempat pengolahan atau dengan membuat sumur galian dekat tanaman sagu. Pada umumnya produk tepung sagu basah berbau masam, hal ini disebabkan terjadinya fermentasi asam organik secara alamiah yang dilakukan oleh mikroorganisme yang terikut selama proses pengolahan dan penyimpanan (Gram, *et al.*, 2002). Hasil isolasi dan seleksi mikroorganisme dari tepung sagu berdasarkan aktivitas amilolitik dan produktivitas asam organiknya, terpilih tiga isolat bakteri amilolitik yaitu isolat TG12, TG19 dan TG31 (Gunaedi *et al.*, 2009). Ketiga isolat masih perlu ditentukan kedudukan dalam klasifikasi bakteri, termasuk anggota spesies dari ketiga isolat tersebut. Untuk itu perlu dilakukan identifikasi pada tingkat spesies menggunakan analisis sekuen gen 16SrDNA. Telah diketahui bahwa gen rDNA sangat esensial bagi kehidupan semua jasad hidup, gen ini akan mengkode

rRNA yang akan menghasilkan untaian protein selanjutnya diekspresikan dalam bentuk fenotipik suatu jasad hidup sehingga dikatakan bersifat *conserved* (Priest *et al.*, 1995) Identifikasi secara molekular ini dapat menggambarkan hubungan kekerabatan/filogeni antara isolat uji dengan anggota strain acuan yang kita gunakan sesuai hasil dari *generic assignment* sehingga dapat dipastikan ketiga isolat tersebut termasuk anggota strain bakteri mana yang memiliki kemiripan secara genetis. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasi isolat bakteri amilolitik TG12, TG19, dan TG31 penyebab kemasaman pada tepung sagu basah, menggunakan analisis sekuense gen 16S rDNA.

BAHAN DAN CARA KERJA

Identifikasi isolat diawali dengan menentukan kedudukan genera bagi tiap isolat/*generic assignment* dengan menentukan karakter morfologi sel, endospora, pewarnaan gram, aerobik atau fakultatif aerobik dan karakter katalase (Atlas *et al.*, 1984). Selanjutnya dilakukan isolasi DNA dari ketiga isolat dengan metode ekstraksi DNA untuk jasad prokariotik (Song *et al.*, 2004). Setelah

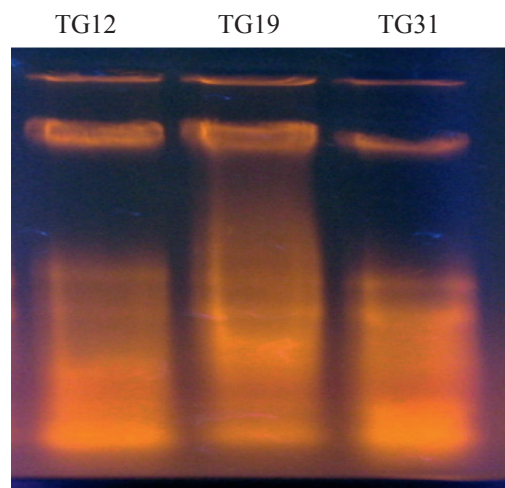
didapatkan produk genom 16SrDNA, selanjutnya dilakukan pengujian kemurnian dan konsentrasi produk genom DNA secara kuantitatif dan kualitatif (Sambrook *et al*, 1989) Produk murni DNA, selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan PCR-*Thermal Cycler*. Amplifikasi genom dilakukan dengan mencampur 1 μ l DNA dengan 1 μ l primer 27f ditambah 1 μ l primer 1529R dan ditambah 22 μ l *megamix blue*. Kondisi PCR, suhu denaturasi awal 94° C selama 5 menit, suhu denaturasi 94° C selama 30 detik, suhu *annealing* 52° C selama 30 detik, suhu *elongation* 72° C selama 1 menit, *elongation* lanjut 72° C selama 10 menit dengan siklus sebanyak 30 kali. Selanjutnya produk PCR dielektroforesis menggunakan agarose 2%, tegangan perangkat 80 volt selama 45 menit pada saat running sampel DNA ditambah DNA *loading dye stock* 5 \times , kemudian dilihat *single band*nya dengan ukuran 1,5 kbp di bawah sinar lampu UV. Produk PCR selanjutnya di sekuensing menggunakan 310 ABI PRISM DNA *Sequencer-Perkin Elmer* dengan *internal primer* 27f, 357f, 790f, dan 1230f. Data sekuen setiap isolat selanjutnya disejajarkan (*alignment*) menggunakan program CLUSTAL X dengan data sekuen genus *Bacillus* dan genus bakteri terdekat kemiripan genetisnya, diperoleh dari NCBI database lewat akses situs www.ncbi.gov.id. Hasil pensejajaran selanjutnya dibuatkan pohon filogeni menggunakan program PHYLIP dengan metode *neighbour-joining* (Saitou *et al.*, 1987) dan divisualisasi dengan program *Treeview* guna melihat kedudukan klasifikasi ketiga isolat bakteri amilolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah. Untuk melihat seberapa besar kemiripan genetisnya dan perbedaan jumlah nukleotida dengan berbagai strain uji dianalisis menggunakan program *Phydit*.

HASIL

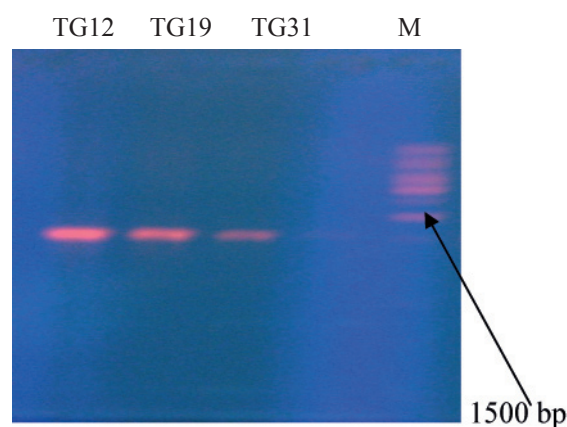
Identifikasi isolat TG 12, TG19 dan TG31

Identifikasi isolat diawali dengan menentukan kedudukan genera bagi tiap isolat/*generic assignment* dengan

menentukan karakter morfologi sel, endospora, pewarnaan gram, aerobik atau fakultatif aerobik dan karakter katalase. Berdasarkan analisis karakter seperti pada Tabel 1, ketiga isolat masuk ke dalam genus *Bacillus* (Holt, *et al*, 1994). Hasil isolasi genom DNA dan amplifikasi produk DNA murni menghasilkan *single band* dengan panjang sekitar 1500bp (Gambar 1, dan 2).



Gambar 1. Produk isolasi DNA



Gambar 2. Produk murni PCR

Tabel 1. *Generic assignment* isolat TG12, TG19 dan TG31

No	Karakter	Isolat			<i>Bacillus</i>
		TG12	TG19	TG31	
1.	Morfologi sel: batang lurus atau mendekati	+	+	+	+
2.	Endospora	+	+	+	+
3.	Motilitas	+	+	+	+
4.	Pewarnaan Gram (+)	+	+	+	+
5.	Aerobik atau fakultatif aerobik	+	+	+	+
6.	Katalase	+	+	+	+
7.	Bentuk sel berpasangan	+	+	+	+

Klasifikasi bakteri amilolitik isolat TG12, TG19 dan TG31

Phylogeny tree dikonstruksi berdasarkan data sequence 16S rDNA dari beberapa spesies bakteri. Data ini dapat diunduh dari bank data di <http://www.ncbi.nih.gov/Taxonomy>. Pada Gambar 3, setiap isolat bakteri amilolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah, berdasarkan analisis data sequence 16S rDNA mempunyai kedekatan genetik dengan spesies bakteri yang berbeda. Isolat TG12 memiliki kedekatan dengan *Bacillus subtilis* DSM 10 (AJ276351) dan isolat TG19 memiliki kedekatan dengan *Bacillus subtilis* strain 1778 (EU982544) sedangkan isolate TG31, memiliki kedekatan genetik dan berada satu *clade* dengan *Bacillus cereus* strain WJL-063 (FJ527559), terpisah dengan *clade* yang mencakup isolat TG12 dan TG19.

Berdasarkan Tabel 2, nilai similaritas 16S rDNA (%), isolate TG12 dengan *Bacillus subtilis* DSM 10 AJ276351 sebesar 98,98% dengan jumlah nukleotida yang berbeda sebanyak 15/1464 dan isolat TG19 dengan *Bacillus subtilis* strain 1778 EU982544 sebesar 99,65% dengan

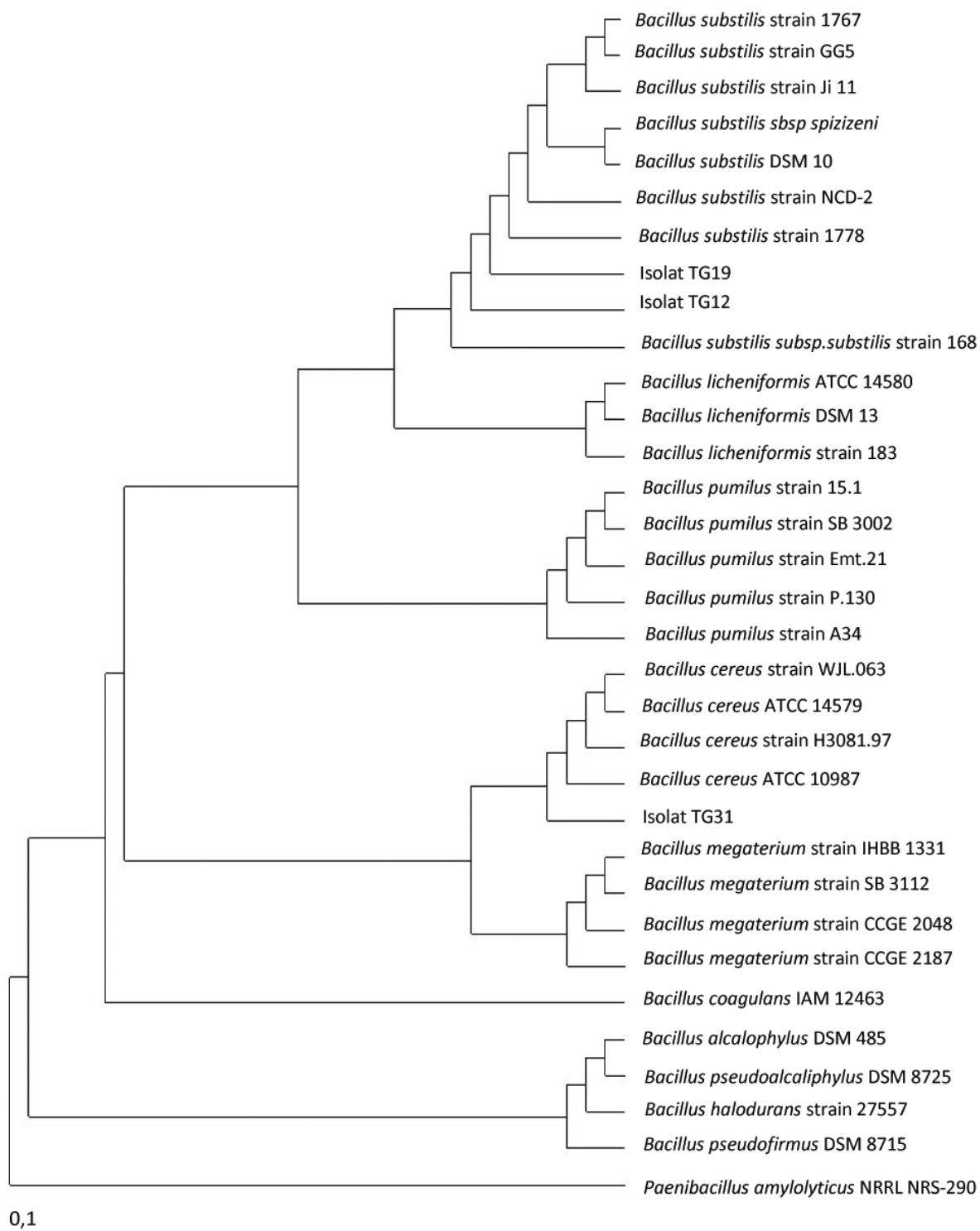
jumlah nukleotida yang berbeda sebanyak 5/1435. Untuk mendukung data genotipik pada Tabel 2, maka pada Tabel 1 disajikan data fenotipik yaitu deskripsi genus *Bacillus* dengan isolate TG12 dan TG19 (Holt *et al.*, 1994).

Pada Tabel 2. Terlihat bawa isolate TG12 dan isolat TG19 memiliki kesesuaian dengan data fenotipik pada Tabel 1 sehingga disimpulkan bahwa isolate TG12 dan TG19 termasuk ke dalam genus *Bacillus*.

Hasil analisis *phylogeny tree* (Gambar 3) menunjukkan bahwa ke dua isolat bakteri aminolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah terletak pada kelompok berbeda. Nilai similaritas 16 S rDNA antara isolat bakteri amilolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah, isolat TG12 dan isolat TG19 dalam *phylogeny tree* dapat digunakan untuk mengetahui hubungan filogenetik. Kelompok yang terbentuk dalam *phylogeny tree* menggambarkan kekerabatan masing-masing bakteri secara evolusioner dan hal itu ditunjukkan dengan nilai similaritas 16S rDNA. Isolat bakteri TG31 (Tabel 3) memiliki nilai similaritas 98,62% dengan spesies *Bacillus cereus* WJL-063 (FJ527559), dengan jumlah nukleotida yang berbeda sebanyak 20/1450.

Tabel 2. Nilai similaritas 16S rDNA (%) dan jumlah nukleotida yang berbeda antara bakteri amilolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah isolat TG19 dan TG12 dengan beberapa anggota strain bakteri *Bacillus subtilis*

Strain code	<i>Bacillus subtilis</i> subs 074970FA spizizieni	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 AJ276351	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis strain 168 NC000964	<i>Bacillus subtilis</i> strain 1778 EU982544	<i>Bacillus subtilis</i> strain GG5 FJ573186	<i>Bacillus subtilis</i> strain Ji11 FJ544352	Isolat TG19	Isolat TG12	<i>Bacillus subtilis</i> strain 1767 EU982541	<i>Bacillus subtilis</i> strain NCD-2 FJ624484
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizieni AF074970	---	2/1409	4/1409	2/1397	16/1402	11/1400	12/1402	17/1368	4/1342	2/1340
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 AJ276351	99.86	---	2/1517	0/1438	28/1448	9/1405	10/1498	15/1464	2/1370	0/1436
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis strain 168	99.72	99.87	---	2/1438	30/1448	11/1405	19/1517	19/1481	4/1370	2/1455
<i>Bacillus subtilis</i> strain 1778 EU982544	99.86	100.00	99.86	---	20/1432	9/1402	5/1435	15/1409	2/1370	0/1381
<i>Bacillus subtilis</i> strain GG5 FJ573186	98.86	98.07	97.93	98.60	---	21/1404	34/1446	32/1412	7/1367	15/1386
<i>Bacillus subtilis</i> strain Ji11 FJ544352	99.21	99.36	99.22	99.36	98.50	---	13/1403	21/1373	8/1347	6/1345
Isolat TG19	99.14	99.33	98.75	99.65	97.65	99.07	---	16/1481	3/1367	10/1456
Isolat TG12	98.76	98.98	98.72	98.94	97.73	98.47	98.92	---	11/1351	16/1437
<i>Bacillus subtilis</i> strain 1767 EU982541	99.70	99.85	99.71	99.85	99.49	99.41	99.78	99.19	---	2/1368
<i>Bacillus subtilis</i> strain NCD-2 FJ624484	99.85	100.00	99.86	100.00	98.92	99.55	99.31	98.89	99.85	---



Gambar 3. *Phylogeny tree* dibuat berdasarkan algoritme *Neighbour-joining* (Saitou dan Nei, 1997) yang menunjukkan hubungan antara strain acuan dan 3 isolat bakteri amilolitik penyebab kemasaman pada tepung sagu basah hasil penyediaan secara tradisional

Tabel 3. Nilai similaritas 16S rDNA (%) dan jumlah nukleotida yang berbeda antara bakteri penyebab kemasaman pada tepung sagu basah isolat TG31 dengan strain bakteri lain

Strain Code	<i>Bacillus cereus</i> strain WJL-063 FJ527559	Isolat TG31	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987 NC003909	<i>Bacillus cereus</i> strain H308197 NCABDC02	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 AF290547	<i>Bacillus megaterium</i> strain IHBB 134 GU18611	<i>Bacillus megaterium</i> strain CCGE 2048 EU867366	<i>Bacillus megaterium</i> strain CCGE 2187 EU867358	<i>Bacillus megaterium</i> strain SSB 3112 GU19198
<i>Bacillus cereus</i> strain WJL-063 FJ527559	---	20/1450	3/1508	2/1508	1/1482	82/1513	75/1382	70/1353	80/1542
Isolat TG31	98.62	---	20/1440	19/1439	18/1405	91/1426	76/1316	71/1287	90/1448
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987 NC003909	99.80	98.61	---	1/1506	2/1471	80/1493	73/1382	68/1353	78/1507
<i>Bacillus cereus</i> strain H308197 NCABDC02	99.87	98.68	99.93	---	1/1473	80/1495	73/1382	68/1353	78/1507
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 AF290547	99.93	98.72	99.86	99.93	---	80/1480	74/1382	69/1353	79/1480
<i>Bacillus megaterium</i> strain IHBB 134 GU1861	94.58	93.62	94.64	94.65	94.59	---	4/1384	1/1355	2/1515
<i>Bacillus megaterium</i> strain CCGE 2048 EU867366	94.57	94.22	94.72	94.72	94.65	99.71	---	3/1355	3/1384
<i>Bacillus megaterium</i> strain CCGE 2187 EU867358	94.83	94.48	94.97	94.97	94.90	99.93	99.78	---	0/1355
<i>Bacillus megaterium</i> strain SSB 3112 GU19198	94.81	93.78	94.82	94.82	94.66	99.87	99.78	100.00	---

Berdasarkan identifikasi dengan metode *profile matching*, maka dilakukan *generic assignment* isolat bakteri TG31 ke dalam genus *Bacillus* (Tabel 1). Dengan demikian disimpulkan bahwa isolat bakteri TG31 juga termasuk genus *Bacillus*.

PEMBAHASAN

Identifikasi secara molekuler menggunakan sekuen gen 16SrDNA untuk menentukan kedudukan klasifikasi isolat bakteri amilolitik TG12, TG19 dan TG31 mampu mengungkap secara genetis kemiripan ketiga isolat dengan *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus*. Penggunaan gen 16SrDNA ini sangat berarti karena gen ini mengkode rRNA yang merupakan elemen penting dalam sintesis protein fungsional maupun fenotipik jasad hidup selain itu juga bersifat *conserved*, yaitu molekul-molekulnya sangat kecil perubahannya selama evolusi (Priest *et al.*, 1995). Dilihat dari tingkat similaritas genetis isolat TG12 dan TG19 di atas 99%, isolat TG12 dengan *Bacillus subtilis* DSM 10 AJ276351 sebesar 98,98% dan isolat TG19 dengan *Bacillus subtilis* strain 1778 EU982544 sebesar 99,65%. isolat tersebut kemiripannya sangat dekat dan susah untuk dibedakan. *Bacillus subtilis* strain 1778 EU982544,

merupakan bakteri yang berasal dari pupuk kandang (*stable manure*) di daerah provinsi Hunan, Cina (Duan, 2008). Sedangkan isolat TG31 dengan tingkat similaritas genetis 98,62% dengan anggota spesies *Bacillus cereus* strain WJL-063 (FJ527559), masih ada kemungkinan berbeda dengan strain acuannya. Hal ini dikarenakan apabila tingkat similaritas sekuen 16SrDNA suatu isolat antara 99–100% maka sekuen rRNA tersebut dikatakan tidak dapat membedakan antara sekuen isolat uji dengan sekuen strain isolat acuan (Ash *et al.*, 1991). *Bacillus cereus* strain WJL-063 (FJ527559), merupakan bakteri yang berasal dari tanah yang terpolusi oleh *chlomyritos* di daerah provinsi Hainan, China (Wang *et al.*, 2009). Sama dengan isolat TG31, berasal dari tanah di sekitar tempat penyediaan tepung sagu secara tradisional di daerah Jembatan Dua. Dengan demikian kemasaman pada tepung sagu basah disebabkan oleh karena adanya anggota strain *Bacillus* yang mampu menggunakan tepung sagu sebagai substrat pertumbuhannya dengan produk metabolisme berupa asam-asam organik. Strain anggota *Bacillus* memang bersifat amilolitik (Apun *et al.*, 2000) sehingga mampu mengubah tepung menjadi produk gula, selanjutnya diubah menjadi produk asam organik sesuai jalur metabolisme yang dimilikinya (Todar, 2004). Habitat asal dari *Bacillus*

cereus dan *B. subtilis* adalah dari tanah (Holt *et al.*, 1994), bersifat mesofilik dan mampu menghasilkan amilase secara ekstraseluler untuk merombak tepung menjadi gula sederhana yang diperlukannya (Bakshi *et al.*, 1992). Selain itu pula keberadaan *B. cereus* dalam tepung sagu basah merupakan peringatan dini untuk mencegah timbulnya diarea bagi konsumen, dikarenakan *B. cereus* bersifat *poisonous* untuk sistem pencernaan dalam jumlah sel 10^6 (Rhodehamel *et al.*, 1998). Sedangkan *B. subtilis* dikenal nonpatogenik. Dilihat dari habitat asal dari *Bacillus* yaitu dari tanah, ini berarti bakteri yang menyebabkan kemasaman pada tepung sagu basah berasal dari tanah sekitar tempat pengolahan sagu dan terikut selama proses pengolahan dan penyimpanan.

KEPUSTAKAAN

- Apun K, Jong BC, Salleh MA, 2000. Screening and Isolation of a Cellulolytic and Amylolytic *Bacillus* from Sago Pith Waste, *Short Communication*, University Malaysia Sarawak.
- Ash C, Farrow JAE, Dorsch M, Stackebrandt E and Collins MD, 1991. Comparative Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and Related Species on The Basis of Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol* 41: 343–6.
- Atlas RM, Brown AE, Dobra KW, and Miller L, 1984. *Experimental Microbiology Fundamentals and Application*, Macmillan Publishing Company, New York.
- Bakshi JA, Gupta K, and Patnaik PR, 1993. Pullulanase and α Amylase Production by a *Bacillus cereus* Isolate *Applied Microbiology* 14: 210–3.
- Duan S, 2008. *16S rDNA of the Herba ceous Extraction Microorganism*, Un published, Microbe Engineering, Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural sciences, Hunan, China.
- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, and Givskov M, 2002. Food Spoilage-Interaction between Food Spoilage Bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 78(1–2): 79–97.
- Gunaedi T, Margino S, Sembiring L, Pratiwi R, 2009. Isolasi dan Seleksi Bakteri Amilolitik Penyebab Kemasaman Pada Tepung Sagu Basah Hasil Penyediaan Secara Tradisional, *Proseding Seminar Nasional: Penelitian Pendidikan dan Penerapan MIPA & FMIPA UNY* 16 Mei 2009.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, and Williams ST, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Lipincot. Williams and Vilkins, Baltimore.
- Priest F, and Brian A, 1995. *Modern Bacterial Taxonomy*, 2nd. Chapman & Hall, Great Britain.
- Rhodehamel EJ, and Harmon SM, 1998. *Bacillus cereus*. Ch.14. In *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed. (revision A), (CD-ROM version. R.L. Merker Ed.). AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Saitou N and Nei M, 1987. The Neighbour Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, *Molecular Biology & Evolution* 4: 406–26.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Song JW, Lee SC, Kang JW, Back HJ and Suh JW, 2004. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. Isolated from Potato Scab Lesion in Korea on the Basis 16S-23SrDNA Internally Transcribed Spacer Sequences, *International Journal of Systematics & Evolutionary Microorganism* 54: 203–209.
- Todar K, 2004. *The Diversity of Metabolism in Prokaryotes*, University of Wisconsin, Madison, USA
- Wang L, Yu XM, and Zheng FC, 2009. *Chlopyrifos Degrading Bacteria Bacillus Cereus 16S rDNA*, Submitted (03 Dec 2008), Environmental and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan, China.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**