

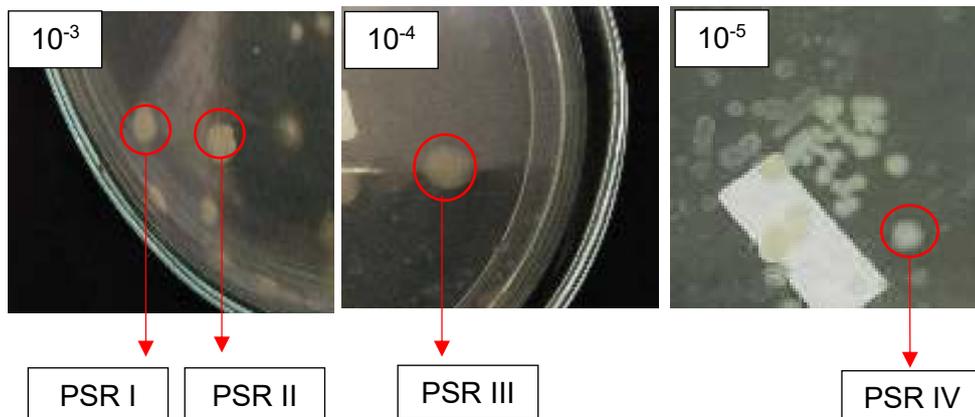
## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan melakukan isolasi bakteri yang diambil dari sampel sedimen Pantai Panggungrejo, telah didapatkan 4 koloni bakteri dari hasil penanaman pada pengenceran  $10^{-3}$  –  $10^{-5}$  pada media LBA. Pemilihan keempat koloni bakteri yang didapatkan dari hasil penanaman tersebut didasarkan dari beberapa kriteria, antara lain sebagai berikut :

- Perbedaan warna koloni bakteri yang tumbuh (putih susu, putih bening, atau putih kekuningan).
- Perbedaan bentuk tepian dari koloni yang tumbuh (bergerigi atau rata).
- Perbedaan bentuk koloni bakteri (cembung atau cekung seperti kawah).

Adapun gambar koloni bakteri yang tumbuh pada media LBA dapat dilihat pada Gambar 5. Kemudian keempat koloni bakteri tersebut dilakukan pemurniaan dengan metode streak T kuadran dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  demi mendapatkan isolat yang murni. Setelah itu dilakukan inokulasi pada media agar miring dan diinkubasi kembali selama 24 untuk dilakukan pengujian gelatinase.



**Gambar 1.** Hasil Penanaman Pada Media LBA

- Keterangan : PSR I : Isolat Koloni Bakteri pada Pengenceran  $10^{-3}$  a  
 PSR II : Isolat Koloni Bakteri pada Pengenceran  $10^{-3}$  b  
 PSR III : Isolat Koloni Bakteri pada Pengenceran  $10^{-4}$   
 PSR IV : Isolat Koloni Bakteri pada Pengenceran  $10^{-5}$

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi koloni bakteri dari isolat sedimen pantai Panggungrejo, dapat dilihat pada Tabel 1 sebagai berikut :

**Tabel 1.** Morfologi Isolat Bakteri

<b>Kode Sampel</b>	<b>Morfologi</b>
<b>PSR I</b>	Berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat, tepian bergerigi, konsistensi kering
<b>PSR II</b>	Berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat, tepian bergerigi atau bergelombang, konsistensi basah
<b>PSR III</b>	Berwarna putih kekuningan, berbentuk bulat, tepian rata, konsistensi basah
<b>PSR IV</b>	Berwarna putih susu, berbentuk bulat, tepian rata, konsistensi kering

Sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Fitri dan Yekki (2011), bahwa semua koloni bakteri yang berasal dari laut dan sungai berbentuk bulat. Kemudian untuk warna koloninya ada yang berwarna putih susu dan ada pula yang berwarna putih kekuningan. Pada isolat yang berwarna putih susu semuanya bersifat gram negatif dan selnya berbentuk basil. Sedangkan bentuk tepian koloninya ada yang bergerigi dan ada pula yang rata. Ukuran koloni bakteri dari laut berkisar antara 1,0 mm hingga 3,5 mm dan pada sungai berkisar antara 1,5 mm hingga 3,0 mm. Adapun gambar dari hasil inokulasi bakteri pada media miring dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 2.** Isolat Murni Pada Media Miring

#### **4.2 Penapisan/ Skrining Bakteri Penghasil Enzim Gelatinase**

Hasil keempat isolat murni yang telah disimpan dalam media miring lalu diinokulasikan pada media gelatin untuk dilakukan skrining enzim gelatinase. Masing-masing isolat bakteri diinokulasikan pada media gelatin dan diinkubasi selama 3 hari dengan dilakukan pengamatan setiap 1 kali sehari untuk mengetahui isolat bakteri yang dapat menghasilkan enzim gelatinase. Terjadinya aktivitas hidrolisis gelatin oleh enzim gelatinase dapat ditunjukkan dari media gelatin yang tetap berwujud cair setelah dimasukkan kedalam lemari pendingin selama 30 menit. Sedangkan untuk isolat bakteri yang tidak menghasilkan enzim gelatinase, media gelatin akan membeku walau sudah dikeluarkan dari lemari pendingin. Dan dari keempat isolat bakteri yang telah dilakukan pengujian hanya terdapat 1 isolat yang positif mengandung bakteri penghasil enzim gelatinase dengan kode PSR IV. Adapun hasil skrining bakteri penghasil enzim gelatinase dapat dilihat pada Gambar 7.



**Gambar 3.** Isolat yang Positif Mengandung Gelatinase

Sesuai dengan hasil yang diutarakan oleh Dela Cruz, *et al.* (2012), gelatin biasanya akan berbentuk cair pada suhu diatas 28 °C dan diatasnya. Sehingga untuk mengetahui proses hidrolisis gelatin oleh bakteri penghasil enzim gelatinase perlu disimpan kedalam lemari pendingin selama 15 hingga 30 menit. bila telah terjadi proses hidrolisis gelatin oleh bakteri maka media gelatin akan tetap berbentuk cair setelah disimpan didalam lemari pendingin selama 30 menit. sedangkan bila tidak terjadi proses hidrolisis gelatin, maka media gelatin akan berubah menjadi padat atau membeku setelah disimpan didalam lemari pendingin.

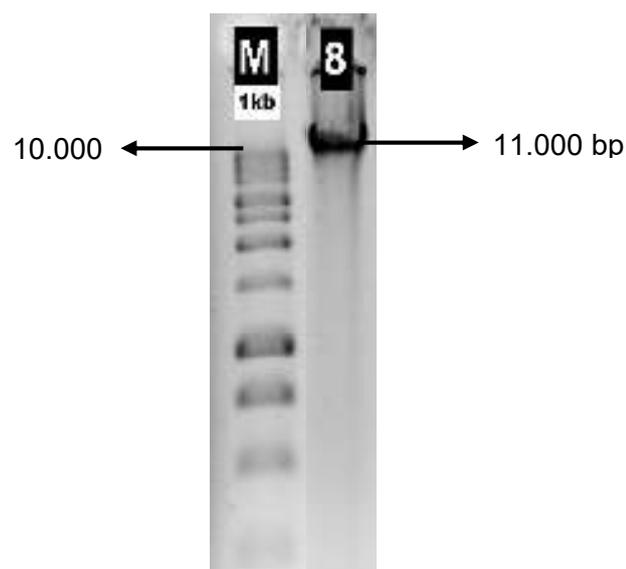
Menurut Cappuccino dan Natalie (2010), pada dasarnya gelatin akan berbentuk seperti agar-agar cair bila berada di atas suhu 25 °C dan akan berubah menjadi gel atau sebagai padatan saat berada di bawah suhu 25 °C. Akan tetapi gelatin juga akan tetap berbentuk cair bila terjadi proses degradasi atau proses hidrolisis yang merubah protein menjadi asam amino yang dilakukan oleh beberapa mikroorganismenya dengan menghasilkan enzim ekstraselulin proteolitik atau disebut sebagai gelatinase. Sehingga gelatin tidak akan bisa mempertahankan bentuk padatnya walaupun berada pada suhu 4 °C.

### 4.3 Identifikasi Mikroorganisme

#### 4.3.1 Identifikasi Bakteri Secara Molekuler 16S rDNA

##### A. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan prosedur dari Kit Isolasi DNA (*Wizard Genomic DNA Purification Kit* dari Promega). Prinsip-prinsip isolasi DNA yang diterapkan pada *Wizard Genomic DNA Purification Kit* dari Promega antara lain adalah lisis, ekstraksi, homogenisasi, presipitasi protein, dan rehidrasi DNA. Proses lisis memiliki tujuan untuk menghancurkan dinding sel maupun membran sel dari bakteri. Kemudian proses ekstraksi dilakukan untuk mengeluarkan materi yang terdapat didalam sel dengan cara menghancurkan sel tersebut. Setelah itu dilakukan proses homogenisasi dengan mencampurkan zat yang dapat menjaga materi sel bakteri. Kemudian dilakukan pemisahan antara *supernatant* dengan *pellet* yang disebut presipitasi atau pengendapan. Dan yang terakhir, proses rehidrasi DNA yang dilakukan dengan cara mengeringkan atau menguapkan endapan untuk memurnikan DNA (Promega, 2017). Adapun hasil elektroforesis isolasi



**Gambar 4.** Hasil Elektroforesis Isolasi DNA Kromosom

DNA isolat PSR IV dapat dilihat pada Gambar 8.

Berdasarkan hasil pembacaan elektroforesis tersebut didapatkan hasil bahwa nilai pita DNA isolat PSR IV yang berada pada daerah 11.000 bp lebih tinggi/besar dibandingkan dengan nilai pita dari pita maker yaitu sebesar 10.000 bp. Dan molekul yang tertahan pada daerah 11.000 bp merupakan molekul DNA kromosom bakteri. Didukung dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Nuronyah dan Surya (2012), bahwa molekul bakteri biasanya akan terpisah pada daerah diatas 10.000 bp dan biasanya akan berkisar antara 21.000 bp hingga 23.000 bp. Dan ukuran pita yang jelas serta tebal dapat menunjukkan bahwa molekul bakteri yang terseparasi atau tertahan pada daerah tersebut tinggi.

#### **B. Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi DNA**

Demi mengetahui tingkat kemurnian dan konsentrasi dari DNA yang telah diisolasi, dilakukan pengukuran dengan menggunakan mesin UV spektrofotometer *Biorad* yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Adapun hasil pengukuran kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil Pengukuran Kemurnian DNA

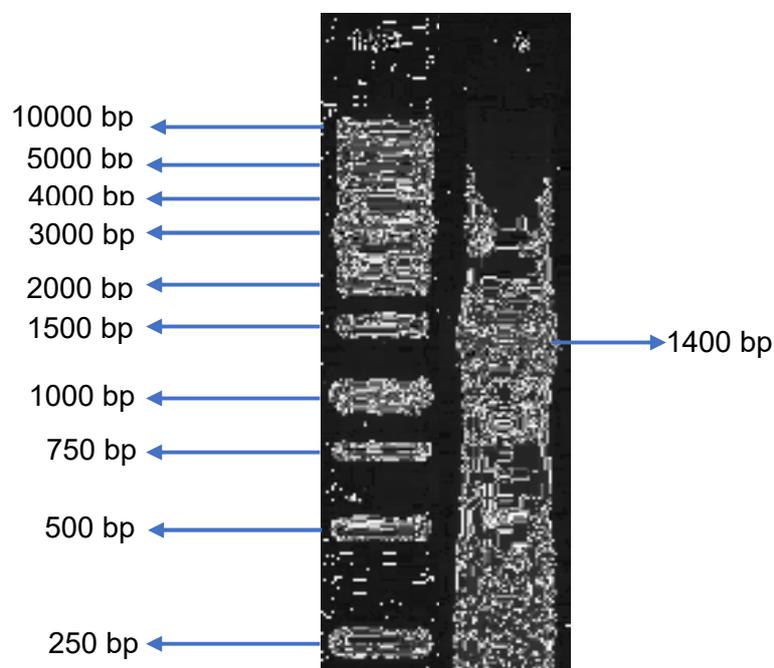
Sampel	Tipe	Absorbansi		260/280
		260	280	
PSR IV	Dsdna	12,51	10,01	1,25

Menurut Mustafa, *et al.* (2016), informasi mengenai kemurnian dan konsentrasi DNA sangat diperlukan untuk mengetahui tingkat kontaminasi dari suatu sampel sehingga sampel tersebut dapat dikategorikan baik untuk dilanjutkan pada tahap selanjutnya. Tingkat kemurnian DNA dapat diketahui dengan menghitung rasio antara nilai absorbansi pada A260 dengan A280 (A260/A280). Dan bisa dikatakan benar-benar murni bila nilai rasio absorbansinya berada diantara 1,8 hingga 2,0. Pada hasil pengukuran kemurnian DNA dapat diketahui nilai A260/A280 sebesar 1,25. Nilai tersebut menunjukkan bahwa DNA sampel

masih terkontaminasi berbagai zat pada saat proses isolasi. Menurut Gardenia dan Isti (2011), nilai rasio pada absorbansi pada 260nm dengan 280nm dapat digunakan sebagai pengukuran dari asam nukleat. Apabila hasilnya lebih tinggi atau lebih rendah dari skala, maka masih ada bahan reagen yang tercampur saat proses isolasi. Zat yang mengkontaminasi DNA dapat dihilangkan dengan enzim RNase yang mampu membantu mendenaturasi RNA (Liana, 2017).

### C. Amplikasi Gen 16S rDNA Menggunakan Teknik PCR

Tahapan berikutnya setelah dilakukan pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA, maka dilanjutkan dengan proses amplikasi gen 16S rDNA menggunakan Teknik PCR. Dan pada penelitian ini primer digunakan untuk melakukan proses amplikasi gen 16S rDNA didesain berdasarkan pada gen (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') dengan lokus spesifik gen (5'-TACGGCTACCTTGTTACGA-3'). Adapun hasil elektroforesis gel agaros amplikasi gen 16S rDNA sampel PSR IV dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 5.** Hasil Elektroforesis Amplikasi Gen 16S rDNA

Pada Gambar 9 diketahui bahwa hasil elektroforesis fragmen gen 16S rDNA menunjukkan hasil dibawah 1500 bp atau pada daerah 1400 bp. Hasil

amplikasi yang berada di daerah 1400 bp menandakan bahwa masih terdapat molekul pengotor yang menempel pada fragmen gen tersebut. Namun proses amplikasi fragmen gen isolat bakteri PSR IV berhasil dilakukan dengan primer dan kondisi PCR yang digunakan mampu mengamplikasi ampikon dengan cukup baik. Sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Suryani, *et al.* (2009), bahwa ukuran fragmen gen 16S rDNA kurang lebih 1,5 kb atau 1500 bp. Dan apabila terdapat hasil dibawah 1,5 kb dapat menunjukkan proses *annealing* primer yang belum spesifik. Biasanya kejadian tersebut disebabkan oleh suhu *annealing* yang terlalu rendah. Kemudian pita pada hasil amplikasi gen bakteri terlihat tebal dan melebar yang dapat mengindikasikan bahwa komposisi reagen-reagen yang digunakan pada proses implikasi fragmen gen 16S rDNA tersebut telah optimal tetapi masih terdapat protein dan berbagai molekul pengotor yang masih menempel. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Nuroniyah dan Surya (2012), pita pada hasil amplikasi terlihat tebal, tunggal dan tidak melebar yang menunjukkan bahwa produk aplikasi fragmen gen yang dilakukan telah bersih dari molekul pengotor dan protein yang menempel.

#### **D. Hasil Sekuensing DNA Ampikon Gen**

Pembacaan hasil sekuensing DNA sampel PSR IV dapat dilihat dengan bantuan *software* yang bernama "Bioedit". Adapun hasil sekuen DNA sampel PSR IV adalah sebagai berikut :

>\_Forward

CAAATTGCGGTGACTACCATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAGAAGCTTGC  
TTTCTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCC  
GATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATGACGTCT  
ACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAACCCAT  
ATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTA  
GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG  
ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTT  
CAGCGGGGAGGAAGGTGATAAAGTTAATACCTTTATCAATTGACGTTACCC  
GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGT  
CAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATCTGA  
AACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC  
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGT  
CTTGAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCT  
TGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTG  
AAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTA  
AGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTAATGGC  
GGGAACTCAAAGGAACTGCCGGGGATAAACCGGAGGTAGGTGGGGATG  
ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGAGTAGGGATACCCCGTGGAATATG  
GCAAAAATAACAGAACGGACCTCCCAGAAGCTAGGGCAACCCAAAAGCAC

GTGTAATTCCGGATTGGATTTCCGGAT

>\_Reverse

CCCCTTGGATCAAAGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTC  
TTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG  
AACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCA  
TGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGAGTTC  
CGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATCTGCCATTGTAGCACGTG  
TGAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCC  
TCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGCCATTACGCGCTGGC  
AACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACA  
ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGCGTTCCCGAAGGC  
ACTCCTCTATCTCTAAAGGATTCGCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCT  
TCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCC  
GTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTIONCCAGGCGGTCGAT  
TTAACGCGTTAGCTCCAGAAGCCACGGTTCAAGACCACAACCTCTAAATCG  
ACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA  
CGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCAC  
CGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCTAC  
CCCCCTCTACAAGACTCTAGCCAACCAGTTTCAGATGCAATTCCCAAGTTA  
AGCTCGGGGCTTTCACATCTGACTTAATTGACCGCCTGCGTGCGCTTTACG

```

CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGG
CACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGATAAAGGTA
TTAACTTTATCACCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCTAAGGCCT
TCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAAAT
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGGGGCCGGGTCTCAGTCCCAGG
GGGGCTGAACATCCTCTCAAACCAGCTAAGGATCGTTGCCTAGGTGAACC
ATTACCTCACCTACAAGCTAATCCCATAGGGGTTTCATCCGAAAGCCCAAGG
TCCCAAAAACCCCTGCTTTGGTCCGTAAAACCTTATGGGGGTTTAACCCCG
TTTCCAGAATTTTCCCCCTTATGGGGGAATCCCCAAATTTAACACCCGTC
CCCCCTTCTCCAACAAAACAAATTTTTCTTGTAGCCCCACCTTCGGTTTAG
GCCGGCCCGGTTATTGTTTGGCCCGTTCCTTTAAAA

```

Kemudian hasil kedua sekuen DNA yang berupa sekuen DNA *Forward* (hasil pembacaan urutan DNA dari depan ke belakang) dan DNA *Reverse* (hasil pembacaan urutan DNA dari belakang kedepan) tersebut digabungkan menjadi satu. Akan tetapi sebelum dilakukan penggabungan kedua sekuen, hasil dari sekuen DNA *Reverse* masih perlu dilakukan perubahan bentuknya menjadi *Reverse Complement*, yaitu merubah urutan DNA *Reverse* dari belakang ke depan dengan menggantikannya menggunakan pasangan basa yang sesuai dengan urutan DNA *Reverse* tersebut. Proses perubahan bentuk sekuen DNA *Reverse* menjadi *Reverse Complement* dapat dilakukan menggunakan *software* yang bernama "Bioedit". Hasil sekuen DNA *Reverse Complement* sebagai berikut :

```

>_Reverse Complement
TTTTAAAGGGAACGGGCCAAACAATAACCGGGCCGGCCTAAACCGAAGGTG
GGGGCTACAAGAAAATTTGTTTTGTTGGAGAAGGGGGACGGGTGTTAAA
TTTGGGGATTCCCCATAAGGGGGGAAAATTCTGGAAACGGGGGTAAACC

```

CCCATAAGTTTTACGGACCAAAGCAGGGGTTTTTGGGACCTTGGGCTTTTCG  
GATGAACCCCTATGGGATTAGCTTGTAGGTGAGGTAATGGTTCACCTAGGC  
AACGATCCTTAGCTGGTTTGAGAGGATGTTTCAGCCCCCTGGGACTGAGAC  
CCGGCCCCAGATTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGCACAATGG  
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTT  
GTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAAGTTAATACCTTTATCAAT  
TGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCAC  
GCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAAT  
TGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAC  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC  
GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA  
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTTAGAGGT  
TGTGGTCTTGAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAATCGACCGCCTG  
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT  
ACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAAC  
GCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGG  
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTAAT  
GGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA  
TGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACCTATAAAG  
TCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT  
CGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  
TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGC  
TTAACCTTCGGGAGGGCGCTACCACTTTGATCCAAGGGG

Berdasarkan hasil sekuen DNA *Forward* dan *Reverse Complement*, lalu dilakukan penggabungan kedua sekuen. Proses penggabungan kedua sekuen tersebut dapat dilakukan melalui program *software* Bioedit atau dapat juga dengan cara menyamakan urutan basa dari kedua sekuen tersebut. Kemudian hasil penggabungan tersebut dapat disimpan dalam bentuk PASTA untuk dilakukan BLAST. Adapun hasil penggabungan kedua sekuen adalah sebagai berikut :

```
>_Assembly
```

```
CAAATTGCGGTGACTACCATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAGAAGCTTG
CTTTCTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGC
CCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATGACG
TCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCGCTATCGGATGAAC
CCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGAT
CTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTA
AAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAAGTTAATACCTTTATCAATTG
ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGG
AATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCTGA
TTTAGAGGTTGTGGTCTTGAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAAAT
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCG
```

```

AAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGA
GTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT
TGTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGA ACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTA
GGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG
AGAGCAAGCGGA ACTCATAAAGTCTGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA
ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTA
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG
AGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACC
ACTTTGATCCAAGGGG

```

Menurut Rinanda (2011), secara umum hasil penggabungan sekuens DNA juga dapat disebut sebagai sekuen consensus (*consensus sequence*) yang didapatkan dari hasil pensejajaran pembacaan primer *reverse dan forward*. Hasil sekuen konsens ini lalu dibandingkan dengan database yang dimiliki oleh GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory ([www.ebi.ac.uk/embl/](http://www.ebi.ac.uk/embl/)), Smart Gene IDNS ([www.smartgene.ch](http://www.smartgene.ch)) atau pada Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) ([www.ridom.com](http://www.ridom.com)). Sangat perlu dilakukan pembacaan keseluruhan dari gen 16S rDNA yaitu sekitar 1500 pb untuk mengidentifikasi adanya suatu spesies baru. Tetapi pada sebagian besar spesies hanya dengan melakukan pembacaan 500 pb sudah dapat dilakukan identifikasi jenis spesiesnya.

## **E. BLAST**

Langkah selanjutnya adalah melakukan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yaitu suatu aplikasi untuk menemukan kesamaan atau kesesuaian urutan nukleotida DNA bakteri dengan *GenBank* yang dimiliki oleh situs *online* NCBI dengan alamat [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi). Adapun hasil BLAST dapat dilihat pada Tabel 3 sebagai berikut :

**Tabel 3.** Hasil BLAST Sampel PSR IV

<i>Description</i>	<i>Total Score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
<i>Proteus penneri</i> strain wf-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2623	98%	0.0	99%	KT029130.1
<i>Proteus penneri</i> strain ALK055 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2617	98%	0.0	99%	KC456573.1
<i>Proteus penneri</i> strain NSPPN01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2608	98%	0.0	99%	KT361197.1
<i>Proteus penneri</i> strain HB16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2608	98%	0.0	99%	KM659222.1
<i>Description</i>	<i>Total Score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
<i>Proteus penneri</i> strain ALK311 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2608	98%	0.0	99%	KC456527.1
Uncultured <i>Proteus</i> sp. Clone W60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2606	98%	0.0	99%	JF733467.1
<i>Proteus vulgaris</i> strain N-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	98%	0.0	99%	KP135421.1
<i>Proteus</i> sp. L29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	98%	0.0	99%	KC135421.1
<i>Proteus penneri</i> strain ALK423 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	98%	0.0	99%	KC884685.1
<i>Proteus vulgaris</i> gene for 16S, partial sequence, strain: NBRC 3988	2601	98%	0.0	99%	AB680195.1
<i>Proteus vulgaris</i> strain SP13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2601	98%	0.0	99%	JN409462.1

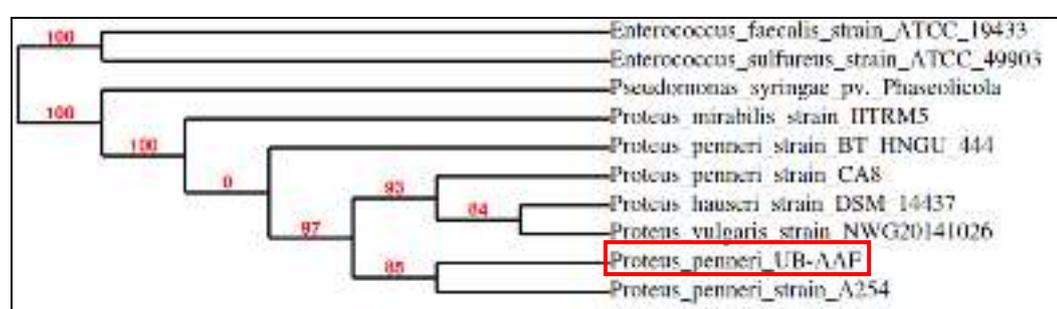
Pada tabel 3 diketahui bahwa hasil isolat bakteri dengan kode PSR IV

memiliki skor tertinggi sebesar 2623 dan ke identikan/kesamaan sebesar 99% dengan spesies *Proteus penneri* galur wf-1 16S ribosomal. Hasil tingkat kesamaan gen sebesar 99% dengan bakteri *Proteus penneri* galur wf-1 menunjukkan bahwa isolat bakteri PSR IV memiliki hubungan kekerabatan genus dan spesies tetapi berbeda jenis strain/ galurnya dengan bakteri tersebut, karena tidak ada tingkat kecocokan sebesar 100% pada hasil BLAST tersebut. Dan dapat diindikasikan pula bahwa isolat bakteri PSR IV adalah spesies *Proteus penneri* galur baru, sehingga perlu dilihat kekerabatannya melalui pohon filogenik. Seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Nuronyah dan Surya (2012), tingkat kecocokan yang didapatkan juga hanya berkisar antara 98-99%. Dan karena tingkat kecocokannya tidak dapat mencapai angka 100% antara gen bakteri yang diteliti dengan gen bakteri yang telah didaftarkan pada GenBank, dapat dikatakan bahwa spesies tersebut termasuk dalam galur/strain baru.

Menurut Brenner, *et al.* (2005), melaporkan bahwa bakteri *Proteus penneri* diatas suhu 22 °C dapat memproduksi enzim gelatinase untuk menghidrolisis gelatin. Dan hal ini sesuai dengan hasil BLAST tersebut bahwa isolat bakteri PSR IV dapat dikatakan sebagai spesies *Proteus penneri* yang termasuk dalam galur baru. Sehingga penamaan isolat bakteri tersebut dapat dirubah menjadi *Proteus penneri* UB-AAF.

### G. Filogenik Sekuen DNA

Analisis kekerabatan dengan pohon filogenik dilakukan menggunakan program *software* "MEGA5". Dan dikarenakan hasil BLAST isolat bakteri tersebut ternyata menunjukkan termasuk dalam spesies *Proteus penneri* dengan jenis galur/strain baru, maka penamaan dari isolat bakteri tersebut telah dirubah menjadi *Proteus penneri* UB-AAF untuk mempermudah dalam proses



pembacaan. Kemudian untuk sekuen DNA spesies jenis lainnya diperoleh dari GenBank NCBI yang telah disimpan dalam format PASTA. Adapun hasil penyusunan pohon filogenik dapat dilihat pada Gambar 10.

Pada gambar pohon filogenik bakteri *Proteus penneri* galur UB-AAF berada pada satu cabang dengan bakteri *Proteus penneri* strain A254 dengan nilai bootstrap sebesar 85%. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua bakteri tersebut memiliki tingkat kekerabatan yang tinggi dalam satu genus dan

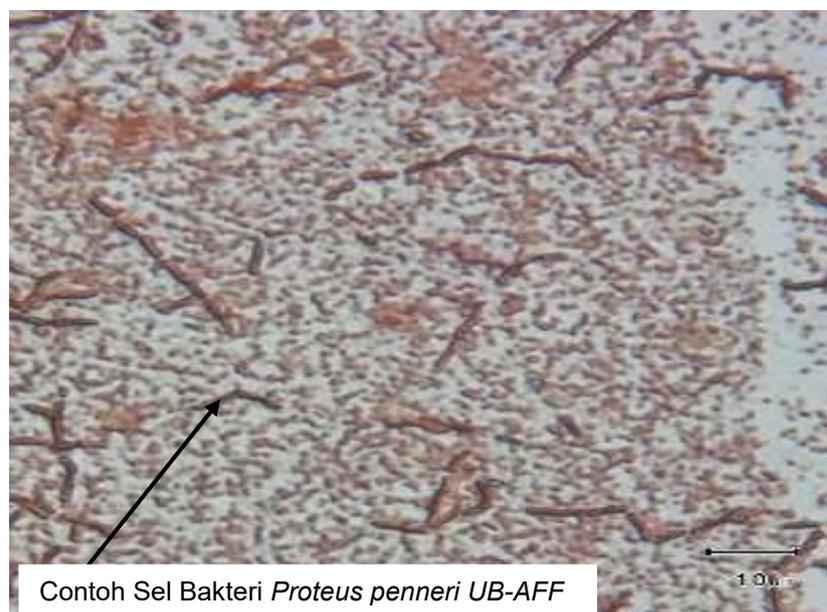
**Gambar 6.** Pohon Filogenik *Proteus penneri* UB-AAF kemiripan DNA sebesar 85%. Menurut Mardiyah (2012), angka yang terdapat pada cabang-cabang pohon filogenik disebut sebagai nilai bootstrap. Bootstrap adalah suatu nilai yang dapat menunjukkan tingkat kepercayaan dari sebuah titik cabang dalam sebuah topologi dengan menggunakan komputer. Jika nilai bootstrap pada suatu cabang berada di antara 95-100% maka dapat dikatakan bahwa percabangan tersebut mempunyai tingkat kepercayaan dan tingkat kemiripan yang tinggi dari kedua bakteri yang terdapat pada cabang tersebut.

#### 4.3.2 Pewarnaan Gram

Menurut Fitri dan Yekki (2011), pewarnaan gram merupakan salah satu cara untuk mengidentifikasi bakteri termasuk kedalam jenis bakteri gram positif atau negatif dan untuk mengetahui bentuk morfologi dari sel bakteri yang diidentifikasi. Melalui pewarnaan gram juga dapat diketahui adanya perbedaan struktur dinding sel antara bakteri gram positif dengan negatif. Pada bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan yang sangat tebal, sehingga dapat mempertahankan zat warna ungu (kristal violet) walaupun telah diberikan larutan pemucat berupa aseton. Sedangkan pada bakteri gram negatif struktur dinding selnya terdiri dari lipid yang sangat tinggi, sehingga zat kristal violet akan larut saat diberikan aseton dan tergantikan oleh zat warna

merah (safranin).

Berdasarkan hasil identifikasi bakteri melalui pewarnaan gram yang diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x didapatkan hasil bahwa bakteri *Proteus penneri* galur UB-AAF memiliki morfologi sel berbentuk basil atau batang dengan sifat gram negatif yang ditunjukkan dengan hasil pewarnaan gram yang berwarna merah. Sesuai dengan yang diutarakan oleh Bergey, *et al.* (2005), bahwa *Proteus penneri* merupakan salah satu spesies *Proteus* spp. yang termasuk jenis bakteri gram negatif dan memiliki bentuk sel berupa basil/batang. *Proteus penneri* biasanya berukuran sebesar 0,4-0,8 x 1,0-0,3  $\mu\text{m}$ . *Proteus penneri* dapat ditemukan pada urin dan feses dari manusia serta juga dapat ditemukan pada tempat-tempat yang terdapat endapan dari urin dan feses manusia. Adapun hasil pengujian gram bakteri *Proteus penneri* UB-AAF dapat dilihat pada Gambar 11.



**Gambar 7.** Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Proteus penneri* UB-AAF