

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Karakteristik Molekuler Bakteri Asam Laktat Asal Feses Orangutan Berdasarkan Analisa Sekuen 16s rRNA

Isolat bakteri yang digunakan telah dikarakterisasi berdasarkan sifat morfologi, fisiologis dan biokimia yang berpedoman pada buku *Manual for the identification of medical bacteria* (Barrow & Feltham, 1993) untuk mengetahui genus sampel. Pendugaan spesies isolat BAL hasil karakterisasi dilakukan berdasarkan nilai *uji similaritas* untuk mengetahui jarak kedekatan antar isolat BAL hasil isolasi dengan isolat BAL acuan (Prasthani, 2012). Dugaan spesies bakteri yang digunakan berdasarkan karakterisasi sifat morfologi, fisiologi, biokimia, dan nilai uji similaritas tersaji pada Tabel 5.1 (Lampiran 2).

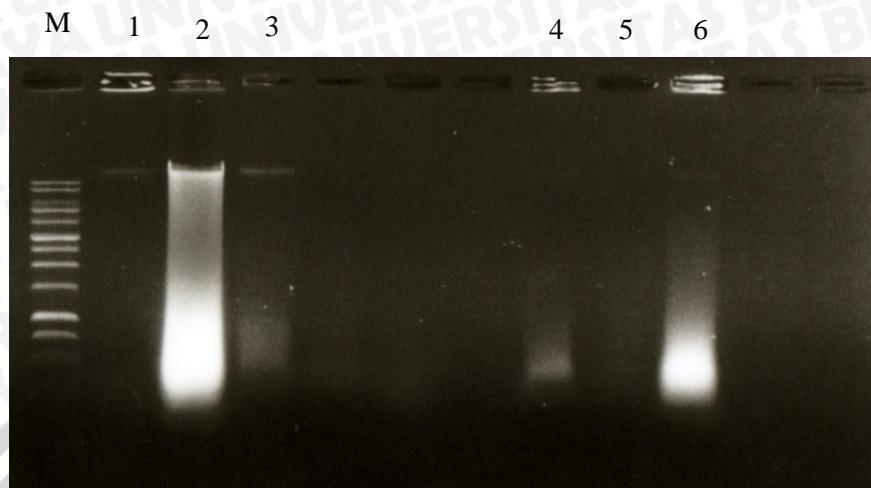
Isolasi DNA merupakan langkah awal untuk melakukan proses PCR. Isolasi DNA dilakukan berdasarkan Fatchiyah *et al.*, (2011) sehingga dihasilkan isolat DNA. Sebelum isolat DNA digunakan untuk PCR, dilakukan uji kuantitatif dan kualitatif isolat DNA. Uji kuantitatif dilakukan dengan uji kadar isolat DNA menggunakan *nanophotometer* dan uji kualitatif dilakukan dengan metode elektroforesis gel agarose. Pada uji kuantitatif, DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedang kontaminan protein atau phenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Dengan adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini, sehingga kemurnian

DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 ( $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ ), dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8 – 2,0 (Fatchiyah, 2011). Hasil uji kuantitatif bakteri asam laktat asal feses orangutan menunjukkan konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan kemurnian DNA ( $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ ) seperti yang tertera pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Nilai kuantitas DNA bakteri asam laktat asal feses orangutan hasil isolasi menggunakan *nanophotometer*

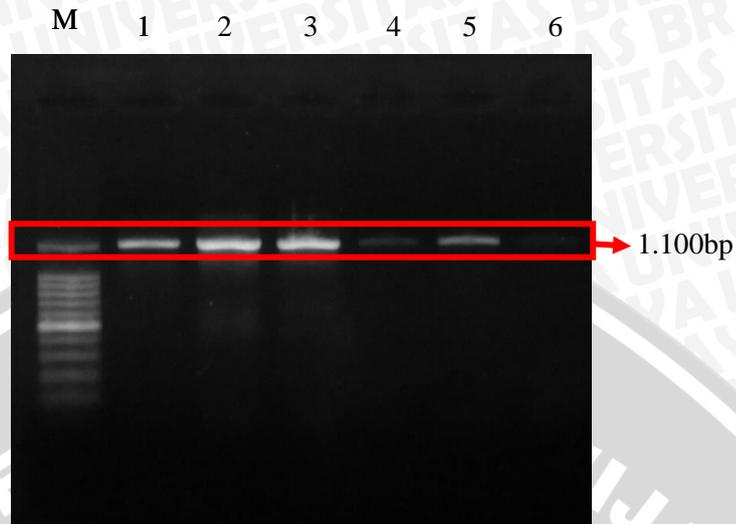
Sampel	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kemurnian DNA ( $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ )
A	56,9	1,781
F	1228	2,082
M	39,9	2,105
N	160	1,951
O	27,9	1,600
P	425	1,986

Uji kualitatif dilakukan dengan metode elektroforesis gel agarose. Hasil elektroforesis DNA menunjukkan munculnya pita DNA pada isolat DNA sampel seperti yang terlihat pada Gambar 5.1. Indikator keberhasilan isolasi DNA adalah terbentuk atau tidaknya pita DNA berdasarkan hasil elektroforesis DNA. Hasil uji kuantitatif dan kualitatif menunjukkan bahwa isolasi DNA berhasil dilakukan.



**Gambar 5.1** Running gel agarose 0,8%. M. Marker, 1. Sampel A, 2. Sampel F, 3. Sampel M, 4. Sampel N, 5. Sampel O, 6. Sampel P

Karakterisasi molekuler BAL untuk tujuan identifikasi diperlukan amplifikasi gen 16s rRNA dengan menggunakan teknik PCR dan analisis urutan basa sedikitnya 500 pasang basa (Petrosino *et al.*, 2009). Gen 16s rRNA diamplifikasi menggunakan primer universal 16s rRNA 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1525r (5'-AAGGAGGTG(A/T)TCCA(A/G)CC-3') (Khunajakr *et al.*, 2008). Hasil amplifikasi DNA dengan teknik PCR berdasarkan sekuen 16s rRNA (Gambar 5.2) menunjukkan gen 16s rRNA dari sampel teramplifikasi dengan ukuran 1.100bp. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan metode elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi 1%. Konsentrasi 1% merupakan konsentrasi yang digunakan untuk visualisasi gen 16s rRNA karena dapat memisahkan gen dengan ukuran sekitar 250 bp – 12 kb (Sambrook dan Russell, 2001).



**Gambar 5.2** Amplifikasi BAL sampel menggunakan primer universal 16s rRNA dalam gel agarose 1%. M. Marker, 1. Sampel A, 2. Sampel F, 3. Sampel M, 4. Sampel N, 5. Sampel O, 6. Sampel P

Sekuensing sampel hasil PCR dilakukan menggunakan primer 27f dan 530r (5'-GGCAGAATGGTAACACCAGAGT-3') (Khunajakr *et al.*, 2008) untuk melihat sekuen pada sekitar 500 bp dari 5' terminal pada 16s rDNA (Tabel 5.3, Lampiran 4). Hasil sekuensing berupa urutan basa nukleotida yang kemudian dianalisis menggunakan program BLAST. Hasil analisis sekuen dengan program BLAST ditunjukkan pada Tabel 5.4.

**Tabel 5.4** Hasil Analisis Sekuen Menggunakan Program BLAST

Sampel	Identities	Spesies BAL
A	99%	<i>Pediococcus sp. IBUN 186 16S ribosomal RNA gene</i>
F	99%	<i>Lactobacillus acidophilus strain NKLFAT 16S ribosomal RNA gene</i>
	99%	<i>Lactobacillus acidophilus strain ZGP-Lac.18 16S ribosomal RNA gene</i>
M	100%	<i>Enterococcus sp. gene for 16S rRNA, partial sequence</i>
N	100%	<i>Lactobacillus sp. S459 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>
	100%	<i>Lactobacillus acidophilus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 1132</i>
O	100%	<i>Lactobacillus casei strain ZGP-Lca.25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>
	99%	<i>Lactobacillus casei strain PT433 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>
P	99%	<i>Lactobacillus casei strain IMAU11460 (DM18-2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>
		<i>Lactobacillus casei strain ZGP-Lca.25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>

Hasil analisis sekuen menunjukkan bahwa sampel memiliki nilai similaritas/homologi yang tinggi yaitu sebesar 95% sampai 100% dengan data dari *GeneBank* yang tersedia di NCBI, dimana nilai similaritas

nukleotida sekitar 80% termasuk cukup tinggi (Ramadhan *et al.*, 2012). Nilai similaritas (identities) hasil analisis sampel A sebesar 99% menunjukkan sampel tersebut merupakan bakteri asam laktat spesies *Pediococcus sp.*. Hasil analisis sampel F dan N sebesar 99% dan 100% menunjukkan sampel tersebut merupakan bakteri asam laktat spesies *Lactobacillus acidophilus*. Hasil analisis sampel M sebesar 100% menunjukkan sampel tersebut merupakan bakteri asam laktat spesies *Enterococcus sp.*. Hasil analisis sampel O dan P sebesar 100% dan 99% menunjukkan sampel tersebut merupakan bakteri asam laktat spesies *Lactobacillus casei*.

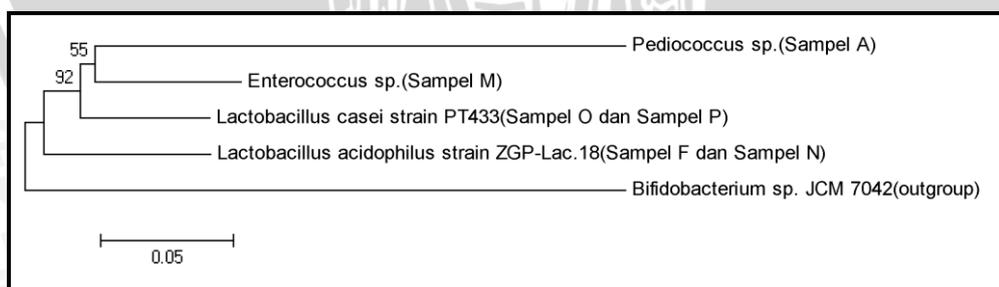
Nilai similaritas sekuen DNA sebesar 100% menunjukkan bahwa isolat-isolat uji merupakan satu strain. Nilai similaritas sebesar 99% menunjukkan bahwa isolat uji merupakan satu spesies. Jika nilai similaritas isolat uji sebesar 89 - 99%, maka isolat tersebut termasuk dalam genus yang sama. Perbedaan sekuen DNA dalam satu spesies hanya berkisar antara 0,2 - 1% (Shenoy *et al.*, 2007).

Hasil analisis sekuen menunjukkan bahwa bakteri asam laktat asal feces Orangutan yang diidentifikasi berdasarkan sekuen 16s rRNA adalah spesies *Pediococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Lactobacillus casei*. Hasil ini sesuai dengan penelitian Prasthani (2012) dimana sampel dikarakterisasi berdasarkan sifat morfologi, fisiologis dan biokimia yang berpedoman pada buku *Manual for the identification of medical bacteria* (Barrow & Feltham, 1993) untuk mengetahui genus sampel dan pendugaan spesies isolat BAL hasil karakterisasi yang dilakukan

berdasarkan nilai *uji similaritas* untuk mengetahui jarak kedekatan antar isolat BAL hasil isolasi dengan isolat BAL acuan.

## 5.2 Profil Kekerabatan Bakteri Asam Laktat Asal Feses Orangutan Berdasarkan Analisa Sekuen 16s rRNA

Pendekatan filogenetik merupakan sistem terbaru taksonomi bakteri. Identifikasi filogenetik untuk bakteri dapat menggunakan analisis sekuen 16s rRNA. Analisis kekerabatan dilakukan dengan menggunakan software Mega5 (Tamura *et al.*, 2013). Metode analisis yang digunakan untuk mengkontruksi pohon filogenetik adalah *Maximum Likelihood*. Metode ini menggunakan kalkulasi untuk menentukan pohon yang memiliki perhitungan variasi terbaik dalam data sekuen. Metode ini dapat digunakan untuk mengetahui hubungan antara sekuen yang lebih beragam (Weisburg *et al.*, 1991). Analisis kekerabatan filogenetik yang tergambar pada pohon filogenetik pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 5.3.



**Gambar 5.3** Hasil Analisis Filogenetik dari sampel A, F, M, N, O, P

Berdasarkan hasil analisis filogenetik menggunakan software Mega5 yang ditampilkan pada Gambar 5.3 dapat diketahui bahwa, sekuen DNA dengan gen 16s rRNA dari keempat spesies merupakan *ingroup* yang berarti

bahwa keempat spesies tersebut memiliki kekerabatan yang dekat satu sama lain. Pohon filogenetik di atas menunjukkan bahwa spesies *Lactobacillus acidophilus* (sampel F dan sampel N) berdasarkan gen 16s rRNA memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan *Lactobacillus casei* (sampel O dan sampel P). Spesies *Lactobacillus casei* (sampel O dan sampel P) berdasarkan gen 16s rRNA memiliki kekerabatan yang dekat dengan spesies *Enterococcus sp.* (sampel M) dengan nilai *bootstrap* sebesar 92%. Spesies *Enterococcus sp.* (sampel M) berdasarkan gen 16s rRNA memiliki kekerabatan yang dekat dengan spesies *Pediococcus sp.* (sampel A) dengan nilai *bootstrap* 55%.

Nilai *bootstrap* pada percabangan menunjukkan nilai keakuratan percabangan pada pohon filogenetik, dengan perhitungan sebanyak 1000 kali pengacakan untuk menghasilkan prediksi filogenetik yang valid (Tamura *et al.*, 2013). Prediksi filogenetik yang valid menggunakan metode *bootstrap 1000*. Nilai *bootstrap* pada Gambar 5.2 menunjukkan bahwa topologi percabangan tersebut kurang akurat dan mungkin akan berubah jika dilakukan dengan metode penyusunan pohon filogenetik lainnya. Topologi percabangan pohon filogenetik sangat akurat, konsisten atau tidak akan berubah walaupun dilakukan dengan metode penyusunan pohon filogenetik lainnya jika nilai *bootstrap* pada percabangan sebesar 95% atau lebih (Janda and Abbot, 2007).

Hasil analisis pohon filogenetik berdasarkan gen 16s rRNA menunjukkan spesies bakteri asam laktat *Pediococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Lactobacillus casei* yang diisolasi dari feses orangutan memiliki kekerabatan yang dekat.