



Penentuan Spesies Bakteri Asam Laktat (BAL) Melalui Analisis Sekuen Gen 16S rRNA dan Pendekatan Bioinformatika

Novita Sari^{1*}, Fitri Fitri¹, Tito Nurseha¹, Irfan Suliansyah², Endang Purwati²

¹Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang, Indonesia

²Universitas Andalas, Indonesia

*e-mail korespondensi: novitasari_uin@radenfatah.ac.id

Abstract. *This study was aimed to determine the species of Lactic Acid Bacteria (LAB) through by sequence analysis and bioinformatics approach. DNA of LAB isolated by biogas sludge was sequenced at the location of gene 16S rRNA. Data sequence of LAB isolate processed to Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) feature which can be accessed at National Center Biotechnology Information (NCBI) cite to compare the similiarity of the query and the database sequence. BLAST file are used to constructing the phylogenetic tree to observed the relationship between the query and the database sequence using Molucular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 (MEGA6) software. Based on the research showed that can be concluded that the LAB isolate identified as *Lactobacillus fermentum*.*

Keyword: *sequence, DNA, LAB, bioinformatics*

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan spesies bakteri asam laktat (BAL) melalui analisis sekuen dan pendekatan bioinformatika. Deoxyribonucleic Acid (DNA) isolat BAL yang diisolasi dari sludge biogas dilakukan sekuensing pada lokasi gen 16S rRNA. Data sekuen DNA dari isolat BAL diproses dalam fitur Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) yang dapat diakses melalui situs National Center Biotechnology Information (NCBI) untuk membandingkan persamaan antara *query* dengan data sekuen yang ada di database tersebut. Dokumen BLAST digunakan dalam mengkontruksi pohon filogenetik untuk melihat hubungan kekerabatan antara *query* dan sekuen database dengan *software* Molucular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 (MEGA6). Berdasarkan hasil analisis menggunakan pendekatan bioinformatika dapat disimpulkan bahwa isolat BAL teridentifikasi sebagai spesies *Lactobacillus fermentum*.

Kata kunci: sekuen, DNA, BAL, bioinformatika

PENDAHULUAN

Identifikasi bakteri menggunakan teknik konvensional hanya dapat memberikan informasi mengenai morfologi sel, jenis Gram dan sifat biokimianya. Akan tetapi, dengan kemajuan ilmu bioteknologi saat ini, peneliti dapat menentukan spesies bakteri dengan menganalisis sekuen DNA. Analisis sekuen merupakan suatu teknik yang dianggap paling baik untuk melihat keanekaragaman hayati suatu kelompok organisme [1] dengan tingkat akurasi mencapai 99.9%. Fragmen DNA yang paling sering digunakan sebagai marka molekuler universal untuk kelompok bakteri adalah gen 16S rRNA karena bersifat ubikuitus dan lestari [2]. Gen 16S rRNA dari bakteri sampel dilakukan proses sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotidanya. Urutan nukleotida bakteri sampel inilah yang disebut sebagai

sekuen *query* yang akan dianalisis lebih lanjut menggunakan pendekatan bioinformatika.

Beberapa metode sekuensing DNA yang ada yakni metode Maxam Gilbert dan metode Sanger. Metode Sanger merupakan metode yang sering digunakan pada saat ini karena bersifat jauh lebih praktis dengan menggunakan dideoksi [3]. Pada tahap sekuensing produk PCR digunakan sebagai cetakan. Primer pada tahap PCR juga digunakan dalam sekuensing, hanya saja masing-masing primer digunakan secara terpisah dalam satu siklus sekuensing (*forward* saja atau *reverse* saja). Berbeda dengan PCR, produk yang dihasilkan dari sekuensing memiliki ukuran yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan karena pada sekuensing, ditambahkan ddNTP (*dideoxyribonucleoside Triphosphat*) atau disebut dengan dNTP terminator yang dilabel dengan zat warna. Terminator ini pada satu siklus akan berikatan secara acak dan menghentikan proses pembacaan. Pada tiap basa terminator (ddATP, ddGTP, ddCTP atau ddTTP) terdapat zat warna fluoresen yang dapat menyerap panjang gelombang yang berbeda sehingga basa terminator akan dapat dibaca dengan fluorometri [4].

Sekuen DNA yang terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer *reverse* dan *forward* dan umumnya disebut sebagai sekuen konsensus. Sekuen konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuen yang tersedia di database menggunakan *software*. Beberapa database digunakan untuk membandingkan sekuen 16S rRNA yang diperoleh dalam penelitian dengan sekuen yang telah terdaftar di database tersebut, salah satunya adalah *GenBank*. Untuk menemukan spesies baru, sekuensing keseluruhan gen 16S rRNA sangat diperlukan. Akan tetapi, pada sebagian besar isolat bakteri, fragmen pendek berkisar 500 bp dibagian awal gen 16S rRNA dinilai sudah cukup informatif dalam mengidentifikasi spesiesnya [4]. Analisis sekuen DNA untuk menentukan spesies bakteri disajikan dalam bentuk pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan antara isolat bakteri dengan beberapa bakteri yang data sekuennya tersimpan di dalam *GenBank*, disebut juga sebagai sekuen pembanding. Beberapa tahapan umumnya yang perlu dilakukan yaitu dimulai dari *installing* program, *editing* data sekuen dan dilanjutkan dengan *alignment* [5].

Filogenetik merupakan ilmu yang mempelajari hubungan evolusi beberapa kelompok organisme yang berbeda (contohnya spesies atau populasi). Dalam studi filogenetik, cara yang paling tepat untuk menghubungkan beberapa kelompok organisme adalah dengan membuat atau mendesain pohon filogenetik. Pohon filogenetik digunakan untuk membatasi taksa masing-masing kelompok individu yang saling terhubung. Sebuah pohon filogenetik terdiri dari *node* dan cabang. Masing-masing *node* mewakili unit taksonomi berupa individu, spesies dan populasi. Masing-masing cabang mendefinisikan hubungan antar unit taksonomi. Satu cabang pada pohon filogenetik dapat menghubungkan dua *node* yang mempunyai kekerabatan. Pola percabangan pohon ini disebut dengan topologi. Untuk menunjang pembuatan pohon filogenetik digunakan suatu program yang dikenal dengan nama BLAST yang berfungsi untuk membandingkan urutan terpenting dari semua urutan yang tersimpan dalam *GenBank* yang terdapat dalam website NCBI. Jika nama ilmiah atau hubungan kekerabatan suatu organisme tidak diketahui, NCBI menyediakan *link* langsung ke beberapa organisme yang umum digunakan dalam proyek penelitian molekuler [6].

METODOLOGI PENELITIAN

Analisis Data Sekuen

Sekuen *query* dibandingkan dengan sekuen yang telah ada pada database *GenBank* melalui *NCBI internet site* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tepatnya pada menu BLAST. Tipe BLAST yang digunakan adalah *nucleotide BLAST*. Database yang dipilih adalah *other* dengan *organism bacteria bacteria*. Program yang dipilih adalah *Mega Blast*. Data yang diperoleh berupa sekuen bakteri yang pernah ditemukan dan berkerabat dekat dengan sekuen isolat. Sekuen digabungkan dan disimpan dalam format FASTA. Kemudian, dilakukan penjajaran sekuen (*multiple sequence alignment*) menggunakan *software* BioEdit tepatnya pada menu *ClustalW Multiple alignment* dengan memilih opsi *Run ClustalW*. Simpan hasil *alignment* dalam format FASTA untuk analisis selanjutnya [7].

Analisis Filogenetik

Pohon filogenetik sebagai hasil akhir dari sebuah analisis filogenetik penentuan spesies bakteri dibuat berdasarkan hasil *alignment* menggunakan *neighbor-joining* melalui *software* MEGA6 [8].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri sampel (Kode Isolat=B1.2) dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia, Genetika Lab, Indonesia untuk dilakukan sekuensing fragmen DNA dimana laboratorium tersebut menggunakan metode Sanger. Hasil proses sekuensing harus melalui proses *contig* terlebih dahulu menggunakan *software* DNASTar yang disimpan dalam format FASTA. Kata *contig* berasal dari kata *contiguous* dapat didefinisikan sebagai rekonstruksi dari serangkaian bagian DNA yang tumpang tindih. Keterbatasan mesin sekuensing membuat tidak semua bagian DNA dapat diketahui urutan basanya, mesin sekuensing memiliki kemampuan mengurut basa nukleotida maksimal dengan ukuran 1000 bp, untuk mengatasi hal tersebut maka dilakukan sekuensing dua arah yakni *forward* dan *reverse*. Kedua hasil sekuensing tersebut selanjutnya dapat digabungkan dan direkonstruksi kembali untuk mendapatkan sebuah gen utuh melalui proses *contig* [9]. Dalam penelitian ini, proses *contig* langsung dilakukan oleh pihak laboratorium. Data sekuen fragmen DNA isolat B1.2 yang sudah melalui proses *contig* dapat dilihat pada Gambar 1.

```
CGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGAACAGATGC
TAATACCGCATAACAGCGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCAC
TTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCCTACCAAGGCGATGAT
GCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCCGCTGA
GTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACT
GTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTTC
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGA
GTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACTATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCCAGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGAGAGTACGACCGCAAG
TTGAAACTCAAGGATTGACGGGGGCCGCACAGCGGTGGAGCTGTGGTTTTATTCAAGCTACGC
GAAGAACTTACCAGTCTTGACTCTTGCGCCAACCTAAAATAGGCGTTCTCTCGGAACGCATG
ACA
```

Gambar 1. Sekuen Gen 16S rRNA Isolat B1.2

Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat urutan basa gen 16S rRNA dari isolat B1.2. Gen 16S rRNA bersifat lestari dan selalu dijumpai pada setiap prokariota sehingga paling tepat digunakan dalam analisis filogenetik yang didasarkan pada DNA sebagai unit dasar yang mengkode informasi suatu organisme, relatif mudah untuk diekstrak maupun dianalisis, mudah untuk dibuat sebagai model yang komparatif dan menghasilkan informasi yang banyak dan beragam meskipun analisis sekuensing membutuhkan biaya yang lebih mahal namun ketepatan identifikasi yang dihasilkan sangat baik [4]. Selain itu, sekuen dari fragmen DNA ini menghasilkan data yang akurat melalui pengujian homologi yang lebih baik dan menghasilkan *neighbor-joining* yang lebih alami. Ada tiga tahap yang harus dilakukan dalam analisis filogenetik yakni *sequence alignment*, rekonstruksi pohon filogenetik, evaluasi pohon filogenetik [10]. Langkah awal analisis sekuen dengan pendekatan bioinformatika adalah pengujian homologi suatu isolat bakteri menggunakan program BLAST sehingga dapat melihat besaran nilai persentase *similarity* antara *query* dengan beberapa sekuen bakteri yang telah terdaftar pada database NCBI. Hasil BLAST isolat B1.2 dapat dilihat pada Gambar 2.

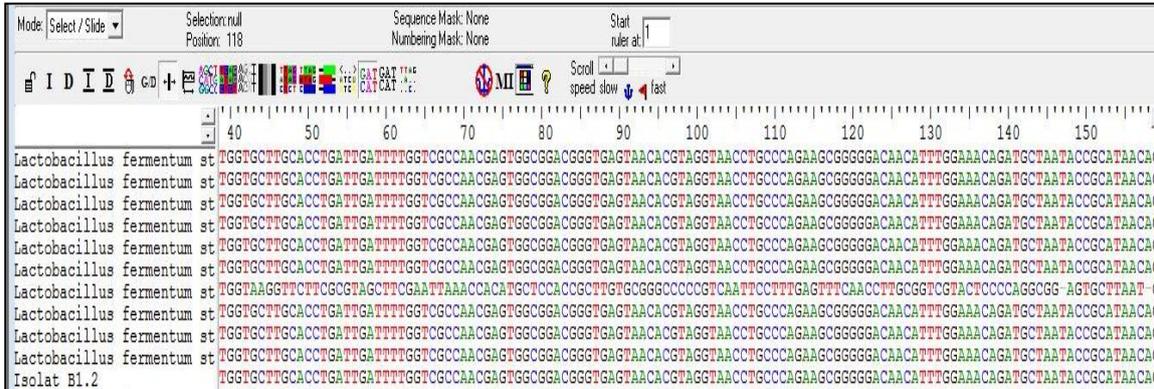
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain AdF7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1680	1680	100%	0.0	98%	HQ677597.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain SM38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1674	1674	100%	0.0	98%	KJ690753.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain SFCB2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1671	1671	100%	0.0	98%	DQ399352.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum DNA, complete genome, strain: MTCC 25067	1669	8312	100%	0.0	98%	AP017973.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus delbrueckii strain L38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1669	1669	100%	0.0	98%	KP317707.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain L37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1669	1669	100%	0.0	98%	KP317706.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain L18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1669	1669	100%	0.0	98%	KP317688.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain 47-7 genome	1669	8294	100%	0.0	98%	CP017712.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain CSL55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1669	1669	100%	0.0	98%	KT800405.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Lactobacillus fermentum strain NCC2970, complete genome	1669	8330	100%	0.0	98%	CP017151.1

Gambar 2. Hasil BLAST Gen 16S rRNA Isolat B1.2

Pada Gambar 2 dapat dilihat beberapa parameter BLAST yakni QC, EV dan ID. *Query coverage* (QC) menunjukkan persentase nukleotida yang serasi dengan sekuen yang ada di database sedangkan *expectation value* (EV) menunjukkan jumlah perbedaan antara sekuen isolat yang di *entry* dengan sekuen yang terdapat pada database yang dinyatakan dengan skor. Semakin tinggi nilai EV maka semakin tinggi perbedaan sekuennya sedangkan nilai EV yang mendekati nilai 0 menunjukkan tingkat homologi sekuen yang tinggi. *Identify* (ID) menunjukkan persentase kesamaan tertinggi dari suatu fragmen sekuen DNA dengan subyek sekuen yang sama [11]. Berdasarkan Gambar 2 menunjukkan bahwa isolat B1.2 memiliki tingkat homologi yang signifikan dengan beberapa spesies bakteri yang terdapat pada database *GenBank* di situs NCBI dimana isolat B1.2 memiliki persentase tingkat *similarity* sebesar 98%. Persentase homologi sekuen dengan kisaran 91% atau lebih kecil dari 91% dikatakan tidak signifikan, kisaran 92% hingga 96% menunjukkan cukup signifikan dan kisaran 97% hingga 100% menunjukkan signifikan [12].

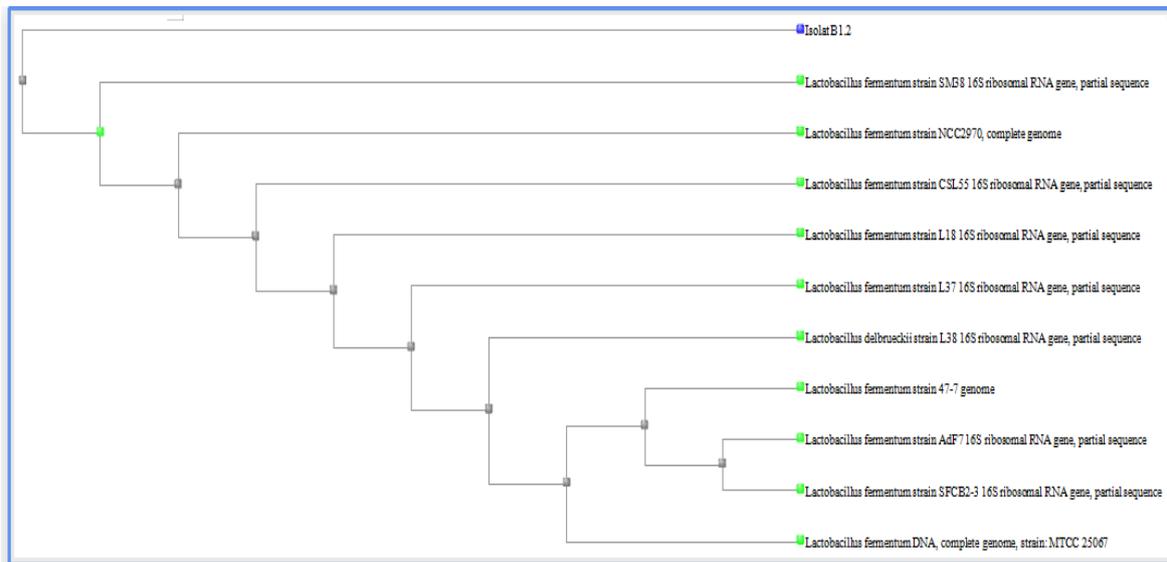
Tahap selanjutnya adalah melakukan penjajaran sekuen yang bertujuan untuk menyelaraskan data karakter yang pada dasarnya tidak hanya diperuntukkan bagi data molekuler tetapi juga non molekuler dimana pada data non molekuler dapat

dilakukan dengan mengurutkan karakter *state* berdasarkan pada hipotesis evolusi. Penjajaran sekuen (*sequence alignment*) dilakukan dengan menggunakan *software* BioEdit yang sebagian dari hasil penjajaran sekuennya dapat dilihat pada Gambar 3.

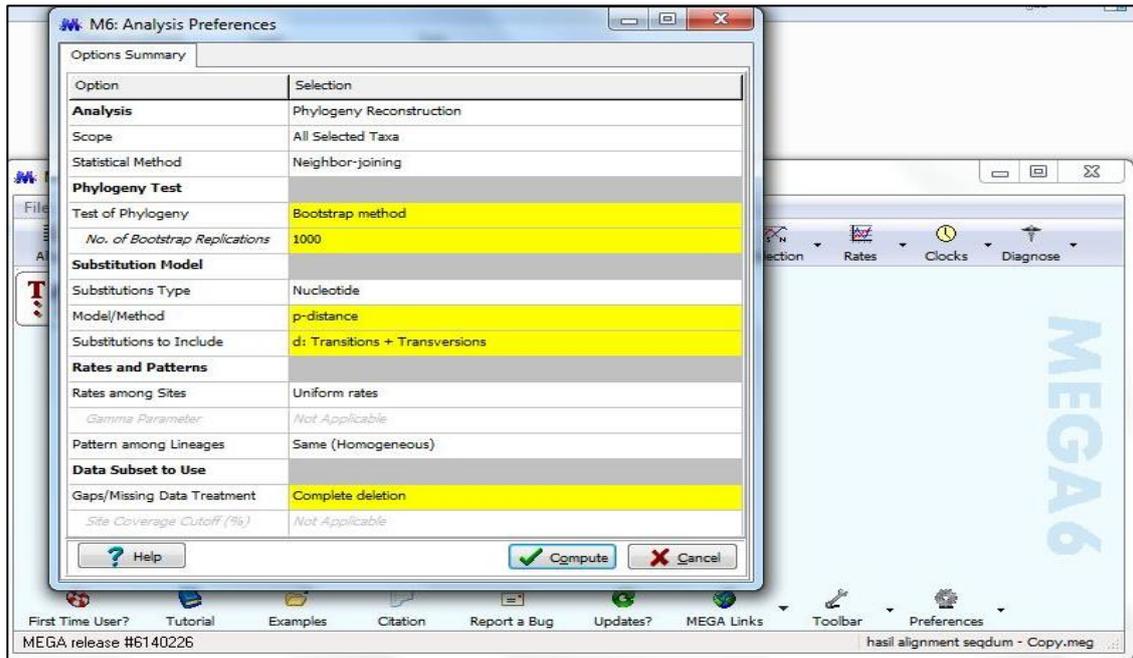


Gambar 3. Hasil Penjajaran Sekuen dengan *Software* BioEdit

Berdasarkan Gambar 3 dapat dilihat bahwa penjajaran sekuen akan menunjukkan dimana posisi sekuen yang tidak berubah atau disebut dengan *conserved* dan dimana posisi sekuen yang berbeda atau berkembang menjadi berbeda dari *common ancestor*, yang disebut dengan *divergent*. Metode *multiple sequence alignment* menggunakan program *ClustalW* paling banyak digunakan untuk penjajaran sekuen dikarenakan dapat menjajarkan beberapa sekuen sekaligus. Dalam hasil penjajaran sekuen juga sering dijumpai gap yang diandai dengan tanda *dash* (-). Gap menunjukkan adanya mutasi dalam bentuk insersi (penyisipan) ataupun delesi (pegurangan) suatu nukleotida [13]. Selanjutnya, dilakukan rekonstruksi sebuah pohon filogenetik menggunakan *software* *MEGA6* dengan metode berdasarkan jarak yang disebut *neighbor joining*, metode ini memanfaatkan banyaknya perbedaan antar sekuen untuk membuat sebuah pohon filogenetik. Topologi pohon filogenetik isolat B1.2 dapat dilihat pada Gambar 4.



Berdasarkan Gambar 4 dapat dilihat pohon filogenetik membentuk dua klad besar dimana pada klad pertama dapat dilihat bahwa isolat B1.2 berada dalam satu kluster besar dengan *L. fermentum* strain SM38, *L. fermentum* strain NCC2970, *L. fermentum* strain CSL55, *L. fermentum* strain L18, *L. fermentum* strain L37, *L. fermentum* strain L38, *L. fermentum* strain 47-7, *L. fermentum* strain AdF7, *L. fermentum* strain SFCB2-3 dan *L. fermentum* strain MTCC 25067. Berdasarkan hasil analisis filogenetik keseluruhan dapat diketahui bahwa isolat B1.2 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* yang merupakan salah satu spesies bakteri asam laktat.



Gambar 5. Pengaturan Option Summary pada Software MEGA6

Evaluasi pohon filogenetik diuji secara statistik menggunakan metode *bootstrap* yang dapat dilihat pada Gambar 5 dengan model pendekatan statistik yang familiar digunakan dalam analisis preferensi *p-distance* dengan pengulangan sebanyak 1000 kali dengan tujuan untuk memperkirakan tingkat kepercayaan dari sebuah pohon filogenetik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis sekuen dan analisis filogenetik melalui pendekatan bioinformatika, bakteri sampel teridentifikasi sebagai bakteri asam laktat spesies *Lactobacillus fermentum* dengan tingkat *similarity* sebesar 98%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) dibawah naungan Kementerian Keuangan Republik Indonesia atas dukungan dana penelitian melalui Beasiswa Tesis Disertasi Tahun Anggaran 2016 dan Tim Pascasarjana Bioteknologi Universitas Andalas yang terlibat dalam penelitian.



DAFTAR RUJUKAN

- [1] A. Ahmad, "Bioteknologi Dasar," *Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin*, 2014.
- [2] S. Sunarto, A. Pangastuti dan E. Mahajeno, "Karakteristik Metanogen Selama Proses Fermentasi Anaerob Biomassa Limbah Makanan," *Jurnal Ekosains*, vol. 5, no.1, pp. 44-58, 2013.
- [3] D. Suryanto, "Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler," *Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara*, 2003.
- [4] T. Rinanda, "Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi," *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, vol. 11, no. 3, 2011.
- [5] H. Yuniarti, S. B. Cholis dan A. Rinanti, "Diagram Filogenetik Hasil Sekuens Basa DNA Menggunakan Program MEGA7," *Jurnal Pendidikan dan Karya Ilmiah* vol. 1, no. 2, pp. 109-117, 2016.
- [6] S. D. Sukartiningrum, "Penentuan Pohon Filogenetik Bakteri Xilanolitik Sistem Abdominal Rayap Tanah Berdasarkan 16S rRNA," *Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga*, 2012.
- [7] S. Melia, E. Purwati, Y. F. Kurnia and D. R. Pratama, "Antimicrobial Potential of *Pediococcus acidilactici* from Bakasam, Fermentation of Sepat Rawa Fish (*Tricopodus trichopterus*) from Banyuasin, South Sumatera, Indonesia," *Jurnal Biodiversitas*, vol. 20, no. 12, pp. 3532-8, 2019.
- [8] A. Z. Mustopa, "Koleksi Protokol Laboratorium Bioteknologi Virologi Molekuler," *Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia*, 2009.
- [9] D. S. Fitri, "Analisis Contig dari Sekuen Hasil Sekuensing," *diansagitafitri.blogspot.com*, 2016.
- [10] T. Hidayat dan A. Pancoro, "Sistematika dan Filogenetika Molekuler. Kursus Singkat Aplikasi Perangkat Lunak PAUP dan Mr-Bayes untuk Penelitian Filogenetika Molekuler" *SITH-ITB*, 2006.
- [11] N. Sofiyanti dan M. N. Isda. "Club Moss *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. (*Lycopodiaceae-Lycopodiaceae*) from Riau Province – Morphological Study and Its DNA Sequence Based on RBCL Primer." *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, vol. 7, no. 1, pp. 43-50, 2019.
- [12] M. J. Bhattacharjee, B. A. Laskar, B. Dhar and S. K. Ghosh, "Identification and Re-Evaluation of Freshwater Catfishes through DNA Barcoding," *Journal PLOS ONE* vol. 7, no. 11, pp. 1-7, 2012.
- [13] N. L. P. I. Dharmayanti, "Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi," *Jurnal WARTAZOA* vol. 21, no.1, pp. 1-10, 2011.