Repository University of Riau https://repository.unri.ac.id Hak cipta milik Universitas Riau

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

EKSTRAKSI DNA BAKTERI ENDOFIT *Enterobacter cloacae* LBKURCC146 DAN LBKURCC147

REPOSITORY

OLEH

GEA VINI ALAMANDA
NIM. 1403114807

PROGRAM STUDI S1 KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS RIAU
PEKANBARU
2019

Repository University of Riau https://repository.unri.ac.id Hak cipta milik Universitas Riau

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

EKSTRAKSI DNA BAKTERI ENDOFIT *Enterobacter cloacae* LBKURCC146 DAN LBKURCC147

Gea Vini Alamanda[1], Dewi Indriyani Roslim[2], Yuana Nurulita[3]

[1]Mahasiswa Program S1 Kimia FMIPA Universitas Riau
[2]Dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau
[3]Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Binawidya, Pekanbaru, 28293, Indonesia
gea.vini@student.unri.ac.id

ABSTRACT

LBKURCC146 and LBKURCC147 are endophytic bacteria that isolated from Harupat ferns stem in Pekanbaru, Riau that resistant to acidic pH. The purpose of this study was to extract the DNA of endophytic bacteria Enterobacter cloacae LBKURCC146 and LBKURCC147. DNA of LBKURCC146 and LBKURCC147 bacteria were isolated after culturing for 24 hours inccubation using *Geneaid Kit*. The size of bacterial DNA obtained from the isolation results is above 10037 pb. DNA can be used for further step such as amplification (PCR).

Keywords : endophytic, *Enterobacter cloacae*, isolation.

ABSTRAK

LBKURCC146 dan LBKURCC147 merupakan isolat bakteri endofit yang diisolasi dari batang tanaman paku harupat Pekanbaru, Riau yang tahan terhadap pH asam. Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi DNA bakteri endofit *Enterobacter cloacae* LBKURCC146 dan LBKURCC147. Molekul DNA bakteri LBKURCC146 dan LBKURCC147 diisolasi setelah kultur bakteri diinkubasi selama 24 jam menggunakan *Geneaid Kit*. Ukuran DNA bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi yaitu lebih besar dari 10037 pb. DNA dapat digunakan untuk langkah selanjutnya seperti ampifikasi (PCR).

Kata kunci : endofit, *Enterobacter cloacae*, isolasi.

Repository University of Riau https://repository.unri.ac.id Hak cipta milik Universitas Riau
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

PENDAHULUAN

Isolat bakteri LBKURCC146 dan 147 telah berhasil diisolasi oleh Sinaga (2016) dari batang tanaman paku harupat (*Nephrolepis bisserata*) yang berada di Jalan Gulama Ujung Pekanbaru, Riau dengan karakteristik tanah gambut dan disimpan di Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau. Isolat Bakteri endofit LBKURCC146 dan 147 telah diidentifikasi secara morfologi oleh Sinaga (2016) sebagai bakteri endofit *Enterobacter cloacae.*

Tidak semua spesies dapat dikarakterisasi atau diidentifikasi dengan mudah berdasarkan karakter morfologi terutama bakteri, karena beberapa kelompok bakteri memiliki karakter morfologi dan fisiologi yang sangat mirip sehingga sulit dipisahkan sebagai spesies yang berbeda sehingga perlu dilakukan identifikasi molekuler menggunakan urutan DNA pendek dari genom organisme yang disebut barkoding DNA (Hebert et al., 2003). Barkoding DNA adalah urutan pendek DNA yang digunakan untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat (Meier *et al.* 2006).

Selain itu, perlunya dilakukan identifikasi molekuler karena bakteri *E. cloacae* biasanya ditemukan hidup dan berkembang di dalam sistem pencernaan manusia yang merupakan bagian dari flora usus normal (Tham, 2012) sedangkan dalam penelitian ini *E. cloacae* ditemukan sebagai bakteri endofit pada jaringan tanaman batang paku harupat (Sinaga, 2016). Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan sekuens gen 16S rDNA atau 16S rRNA (Clarridge, 2004). Gen ini adalah gen yang mengkode RNA ribosomal pada sub unit kecil ribosom prokariot dan memiliki urutan yang khas dan berbeda pada setiap bakteri, sehingga dapat dijadikan penanda molekuler untuk proses identifikasi (Gonzalez *et al.*, 2005).

Identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rDNA dilakukan mengacu pada kekerabatan spesies yang sama pada tempat yang berbeda atau kekerabatan yang terdekat dengan menelusuri literatur, menggunakan DNA sekuenser dan BLASTn, serta basis data seperti GenBank. Gen 16S rDNA juga memiliki beberapa kelemahan, diantaranya kurang dapat membedakan dengan jelas suatu spesies dalam level genus karena beberapa bakteri memiliki sifat fisiologis yang berbeda tetapi memiliki sekuens 16S rDNA yang sama (Suarisma,2016). Untuk identifikasi molekuler, memerlukan tahap ekstraksi DNA. Ekstrak DNA yang baik akan mempengaruhi proses selanjutnya yaitu kesuksesan amplifikasi DNA menggunakan metode PCR.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Autoclaf (All America* model 1925/KY-23D), elektroforesis merek *Mupid-exu submarine electrophoresis*, UV *transilluminator*, PCR *machine* (*Thermal Cycler* Techne TC-312 dan *Multigene* Labnet International), serta peralatan gelas laboratorium lainnya yang dibutuhkan sesuai prosedur kerja.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *E. cloacae* isolat LBKURCC146 dan LBKURCC147 koleksi Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler Jurusan Kimia FMIPA

Repository University of Riau https://repository.unri.ac.id Hak cipta milik Universitas Riau

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

Universitas Riau yang telah diisolasi dan disimpan dalam media *Nutrient agar* pada suhu 4ºC. Bahan lainnya adalah akua DM (Brataco Chemical), *Nutrient agar* (NA), *Nutrient broth* (NB), alkohol 70%, *Geneaid Kit. Buffer* TBE, agarosa (*Analytical grade*), HyperLadder 1kb (Bioline) (Cat. No. 33053), Etidium bromida (Bio-Rad) (Cat. No. 161-0433), *My Taq Red Mix* (Bioline) (Cat. No. 25043), *Loading buffer* (Bioline) (Cat. No. 33053) dan Gel Red.

b. Peremajaan isolat

Isolat *E. cloacae* LBKURCC146 dan LBKURCC147 hasil isolasi dari batang tanaman paku harupat yang disimpan pada media NA miring untuk diremajakan kembali dalam media NA steril. Isolat diambil menggunakan jarum ose yang telah disterilisasi kemudian digores ke media NA steril, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, kultur bakteri diinokulasi ke media NB steril dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat bakteri yang telah diremajakan tersebut kemudian dibuat stok kultur pada media NA miring dan disimpan pada suhu 4°C.

c. Isolasi DNA

Sebanyak 20 mL media NB yang telah disterilisasi, disimpan di dalam *box* steril selama 24 jam. Keesokan harinya, bakteri *E. cloacae* diinokulasi ke dalam media tersebut dan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, diambil sebanyak 1,5 mL dari masing-masing isolat untuk isolasi DNA. Molekul DNA diisolasi menggunakan *Geneaid Kit*. Larutan kultur tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang hingga yang tersisa hanya pelet sel. Pelet sel ditambahkan 200 µL larutan *GT buffer* yang berguna untuk membantu proses pelisisan sel lalu divorteks. Pelet sel tersebut ditambahkan 20 µL Proteinase-K yang beguna untuk mendegradasi protein serta melisiskan sel lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit (dibolak-balik setiap 3 menit). larutan selanjutnya ditambahkan 200 µL *GT buffer* lalu diinkubasi kembali pada suhu 60°C selama 10 menit (dibolak-balik setiap 3 menit). Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit.

Supernatan dipindahkan ke tabung baru sebanyak 1 mL dan ditambahkan 200 µL etanol absolut. Larutan tersebut kemudian dipindahkan ke GD kolom dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. *Debris cell* dibuang dan DNA yang sudah tersangkut pada filter ditambahkan 400 µL W1 *buffer* dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Air yang terdapat pada CT kolom dibuang dan selanjutnya ditambahkan sebanyak 600 µL larutan *wash buffer* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Air yang terdapat di CT kolom dibuang sama halnya dengan perlakuan sebelumnya dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 13.000 rpm untuk mengeringkan matriks. Selanjutnya tambahkan 50 µL *elution buffer* yang sudah diinkubasi pada suhu 70°C dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit sebanyak 2 kali pengulangan. Molekul DNA dielektroforesis untuk menentukan keberhasilan isolasi DNA dan berat molekul DNA kedua isolat tersebut.

Repository University of Riau https://repository.unri.ac.id Hak cipta milik Universitas Riau
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

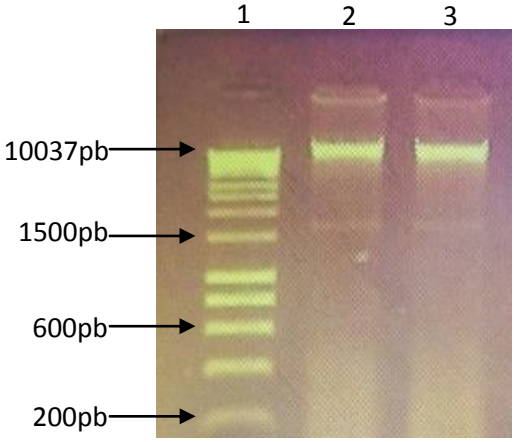
d. Elektroforesis

Sebanyak 0,50 g gel agarosa dilarutkan dalam 50 mL *buffer* TBE lalu dimasak sampai mendidih. Setelah ± 30-40 menit, ditambah 1 µL larutan etidium bromide dan homogenkan kemudian larutan tersebut dituang ke dalam tray elektroforesis. Setelah gel memadat, maka gel dapat digunakan. Molekul DNA dielektroforesis dengan volume total 4 µL yaitu 2 µL DNA ditambah 2 µL *loading dye*. Larutan 1 kb DNA Ladder sebanyak 2 µL dicampurkan dengan 2 µL *loading dye* untuk DNA standar. Campuran isolat DNA dan DNA standar dimasukkan ke dalam sumur yang telah dicetak menggunakan sisir pada gel agarosa. Proses elektroforesis dijalankan selama lebih kurang 30 menit dengan arus listrik 75 volt. Setelah migrasi DNA selesai, pita-pita DNA pada gel diamati menggunakan sinar UV pada transiluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA kromosomal bakteri *E. cloacae* LBKURCC146 dan LBKURCC147 yang diisolasi menggunakan *Geneaid Kit* telah berhasil dilakukan. Hal ini dibuktikan melalui proses elektroforesis menggunakan gel agarosa. Hasil elektroforesis DNA *E. cloacae* LBKURCC146 dan 147 dapat dilihat pada **Gambar 1.** dengan ukuran DNA lebih besar dari 10037 pasang basa.

Isolasi DNA bakteri LBKURCC146 dan LBKURCC147 dilakukan menggunakan metode *Geneaid Kit*. Enzim proteinase-K dan larutan garam yang terkandung di dalam kit membantu melisis sel dan mendegradasi protein (Roslim dkk, 2017). Sebelum isolasi DNA dilakukan, bakteri diinkubasi terlebih dahulu selama 24 jam yang merupakan waktu optimal pertumbuhan bakteri. Proses isolasi DNA menggunakan teknik sentrifugasi yaitu teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya (Roslim dkk, 2017).



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA *E. cloacae* LBKURCC146 dan LBKURCC147. Keterangan: Jalur 1: HyperLadder 1 kb (Bioline), Jalur 2: *E. cloacae* LBKURCC146, Jalur 3: *E. cloacae* LBKURCC147.

Hasil isolasi DNA *E. cloacae* LBKURCC146 dan LBKURCC147 yang dilihat menggunakan bantuan sinar UV transiluminator pada gel elektroforesis memiliki tingkat kemurnian yang tinggi dapat dilihat dengan adanya pita seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 1**. Pita yang dihasilkan memiliki ketebalan yang cukup untuk proses sekuensing. Pita tebal dan tunggal dari produk PCR akan menghasilkan urutan yang baik (Nugraha dkk., 2014; Roslim dkk., 2016; Roslim, 2016). Ukuran DNA bakteri *E. cloacae* yang didapat dari hasil isolasi yaitu lebih besar dari 10037

Repository University of Riau https://repository.unri.ac.id Hak cipta milik Universitas Riau

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber:
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan Universitas Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Universitas Riau.

pasang basa. Hal ini diperoleh dari letak pita yang berada diatas 10037pb. Menurut Gong dkk (2015), bakteri *Enterobacter cloacae* memiliki ukuran DNA sebesar 4,8 Mb.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lab Genetika Jurusan Biologi FMIPA untuk kesempatan menggunakan fasilitas penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Journal of Clinical Microbiology Reviews*. (4) : 840-862.

Gonzalez, J. M & Saiz-Jimenez, C. 2005. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related mikroorganism by thermal denaturation tempertures. *Extremophiles*. 9 : 75-79.

Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Meier R, Shiyang K, Vaidya G, dan Peter. 2006. DNA barcoding and taxonomy in diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst Biol* 55(5): 715-728.

Roslim DI., Herman., Elvyra, R., Sofiyanti, N & Chahyadi, E. 2017. Prosedur laboratorium dan analisis bioinformatika. UNRI Press, Pekanbaru.

Sinaga, N. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Batang Tanaman Paku Harupat (*Nephrolepis bisserata*). *Skripsi*. FMIPA UNRI, Pekanbaru.

Suarisma, D. 2017. Analisis DNA Probe *Enterobacter cloacae* Endofit Batang Tanaman Paku Harupat (*Nephrolepis bisserata*) Penghasil Selulase Tahan pH Asam. *Skripsi*. FMIPA UNRI, Pekanbaru.

Tham, J., 2012. Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Enterobacteriaceae: Epidemiology, Risk Factors and Duration of Carriage. Lund University. Available from: *http://lup.lub.lu.se/record/3045564/file/3045665.pdf*. Accesed on 23 October 2018.