

## FILOGENI MOLEKULER ISOLAT BAKTERI F0-0-3-1 DARI MEDIA PEMELIHARAAN ROTIFER

(Molecular phylogeny of an isolate bacteria F0-0-3-1 from culture medium of rotifer)

Oktavianus Dalenoh<sup>1</sup>, Stenly Wullur<sup>1\*</sup>, Elvy L. Ginting<sup>1</sup>, Veibe Warouw<sup>1</sup>,  
Detty N. Rumampuk<sup>1</sup>, Henneke Pangkey<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK, Universitas Sam Ratulangi, Manado

<sup>2</sup>Program Studi Budidaya Perairan, FPIK, Universitas Sam Ratulangi, Manado

\*Corresponding Author: [stenlywullur@unsrat.ac.id](mailto:stenlywullur@unsrat.ac.id)

### Abstract

The aim of this study was to construct molecular phylogeny of bacteria suspected to involve in decomposing the fishery waste as diet for rotifer culture. The bacteria were isolated from culture of rotifer and propagated for molecular analysis. Genomic DNA of the bacteria was extracted using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). The 16S rRNA gene was amplified using primer pairs i.e. 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and 1492R (GGTACCCT GTTACGACTT) and sequenced. The sequences were analyzed using Sequence Scanner and MEGA 7, and BLASTed on the NCBI website ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Molecular phylogeny of the isolate was constructed using Neighbor Joining Tree method. Isolate bacteria F0-0-3-1 from culture of rotifer fed with fish waste diet was successfully propagated for molecular analysis. 16S rRNA gene of the isolate bacteria was successfully amplified and showed a DNA band at 1400 bp. Nucleotides sequence quality of the 16S rRNA gene i.e. QV<sup>+20</sup> and CRL were 995 and 941 nucleotides. BLAST result of the 16S rRNA gene showed 98.87% percent identity of the isolate bacteria F0-0-3-1 with bacterial species in the genus *Bacillus* i.e. *Bacillus weidmanni*, *Bacillus cereus* dan *Bacillus proteolyticus*. Molecular phylogeny analysis showed that the three species was in the same clade.

---

**Keywords:** Phylogeny, molecular, bacteria, rotifer, 16S rRNA gene

Penelitian ini bertujuan untuk mengkonstruksi filogeni molekuler bakteri yang diduga terlibat dalam proses penguraian limbah perikanan sebagai pakan untuk kultur rotifer. Isolat bakteri yang diperoleh dari kultur rotifer tersebut, dibiakkan dan DNA genomnya diekstrak menggunakan *DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)*. Gen 16S rRNA isolat bakteri tersebut, diamplifikasi menggunakan primer 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan 1492R (GGTACCCT GTTACGACTT) selanjutnya, disequens dan urutan nukleotida hasil sekuens dianalisis menggunakan program Sequence Scanner dan MEGA 7. Analisis homologi sekuens dilakukan dengan program BLAST *nucleotide blast*, pada situs NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) dan dilanjutkan dengan konstruksi filogeni molekuler menggunakan metode Neighbor Joining Tree. Isolat bakteri F0-0-3-1 berhasil disolasi dari kultur rotifer yang diberi pakan limbah ikan. Hasil amplifikasi Gen 16S rRNA isolat bakteri F0-0-3-1 terdeteksi dalam bentuk pita DNA pada posisi sekitar 1400 bp. Kualitas nukleotida gen 16S rRNA hasil sekuens menunjukkan nilai QV 995 dan CRL 941. Hasil BLAST sekuens gen 16S rRNA isolat bakteri F0-0-3-1 pada database menunjukkan kemiripan 98% dengan spesies *Bacillus weidmanni*. Hasil kontruksi filogeni menggunakan metode Neighbor Joining Tree menunjukkan posisi isolat bakteri F0-0-3-1 berada pada clade yang sama dengan *Bacillus weidmanni*, *Bacillus cereus* dan *Bacillus proteolyticus*.

---

**Kata kunci:** Filogeni, molekuler, bakteri, rotifer, Gen 16S rRNA

## PENDAHULUAN

Sejak tahun 1960-an, rotifer telah dimanfaatkan dalam bidang budidaya perikanan untuk digunakan sebagai pakan alami bagi larva ikan. Peran penting rotifer sebagai konsumen primer dalam rantai makanan menjadikan rotifer sebagai penyedia nutrient penting bagi larva biota laut yang dibudidayakan. Sebagai pakan alami yang umum digunakan dalam pemeliharaan larva berbagai jenis ikan laut, rotifer memasok berbagai jenis nutrisi, seperti; asam amino, asam lemak esensial, mineral dan vitamin yang memberi efek positif dalam pertumbuhan dan perkembangan larva (Knuckey et al., 2004; Ogello et al., 2020, 2019, 2018; Wullur et al., 2009, 2011, 2013, 2017, 2018, 2019). Sehubungan dengan hal tersebut diatas, sejumlah penelitian telah dilakukan dalam upaya untuk memproduksi massal rotifer dengan cara yang mudah dan murah, seperti dengan menggunakan limbah ikan pada media kultur rotifer (Napitupulu et al, 2019; Rumengan *et al.*, 2017; Ogello et al., 2020, 2019, 2018; Wullur et al, 2019, 2020). Penambahan olahan limbah ikan ke dalam media pemeliharaan rotifer, menjadi sumber terjadinya proses penguraian nutrisi yang melibatkan mikroorganisme seperti bakteri, yang kemudian menjadi sumber nutrisi bagi rotifer untuk tumbuh dan berkembang (Napitupulu et al, 2019; Rumengan *et al.*, 2017; Ogello et al., 2020, 2019, 2018; Wullur et al, 2019, 2020).

Dalam penelitian ini, telah dilakukan isolasi bakteri dari dalam media pemeliharaan rotifer yang dipelihara menggunakan limbah ikan sebagai pakan. Isolat bakteri tersebut kemudian diidentifikasi menggunakan hasil sekuens gen 16S rRNA yang menjadi gen rujukan dalam identifikasi bakteri (Napitupulu 2019, Wullur, 2020).

## METODE PENELITIAN

Ekstraksi DNA total isolat bakteri F0-0-3-1, dilakukan menggunakan *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Proses ekstraksi DNA total diawali dengan mensentrifus hasil perbanyakan isolat bakteri F0-0-3-1 pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Pellet hasil sentrifuse selanjutnya dilisis dengan menambahkan sebanyak 180 µl *buffer* ATL, 20 µl proteinase K, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam disertai dengan proses vortex setiap 15 menit sekali. Proses lysis dilanjutkan dengan menambahkan sebanyak 200 µl *buffer* AL dan diinkubasi pada suhu 70 °C .

Binding DNA genom dilakukan dengan menggunakan *spin filter* yang diletakkan pada posisi di atas 2 ml *collection tube*. Larutan sampel dipindahkan ke spin filter kemudian disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Pada proses sentrifuse tersebut, DNA menempel pada spin filter dan larutan sampel hasil filter yang terkumpul pada *collection tube* dibuang. Tahap selanjutnya adalah memisahkan residu contaminant DNA melalui proses washing, menggunakan buffer AW1 dan AW 2. Proses washing diawali dengan menambahkan 500 µl *buffer* AW1 ke dalam spin filter dan disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit dilanjutkan dengan menambahkan kembali sebanyak 500 µl *buffer* AW2 pada spin filter dan disentrifuge dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Tahap selanjutnya adalah proses elution, yaitu proses pemisahan DNA dari spin filter dengan cara menambahkan sebanyak 200 µl *buffer* AE ke dalam spin filter, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruangan dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. DNA total pada spin filter selanjutnya berpindah pada *collection tube* yang siap untuk diamplifikasi.

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sebelum dilakukan amplifikasi, dibuat larutan reaksi PCR dengan total sebanyak 25 µl, yang terdiri atas: 5 µl 5x Hotfirepool, 17 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl Primer 8F, 1 µl Primer 1492R dan 1 µl sampel. Larutan reaksi PCR tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam PCR *tube eppendorf* dan diletakkan dalam mesin PCR untuk amplifikasi gen 16S rRNA. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus yang terdiri atas: (1) 95°C selama 6 menit; (2) 95°C selama 30 detik; (3) 52°C selama 30 detik; (4) 72°C selama 30 detik; (5) 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA tersebut dikirim ke jasa pelayanan sekuensing FIRST BASE, Malaysia.

Kualitas hasil sekuens gen 16S rRNA dianalisis menggunakan Sequence Scanner software ver.2 (<http://appliedbiosystems.com>), dengan menentukan QV+20 (nukleotida yang memiliki nilai kualitas nukleotida lebih besar dari 20) dan CRL (continuous read length, deretan panjang nukleotida kualitas baik (>20) yang berada pada posisi berurutan dan tak terpotong)

Penjajaran nukleotida dilakukan dengan menggunakan software MEGA 7. Proses penjajaran nukleotida diawali dengan melakukan penyuntingan nukleotida sehingga yang digunakan hanyalah nukleotida berkualitas baik (QV>20). Adapun nukleotida dengan kualitas kurang baik dihilangkan dengan cara memotong menggunakan fasilitas *mask upstream* dan *mask downstream* sedangkan penyuntingan posisi nukleotida lainnya dilakukan secara manual menggunakan MEGA 7. Penjajaran nukleotida antar primer dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas *reverse compliment* yang dilanjutkan dengan proses *alignment* memanfaatkan fasilitas penjajaran nukleotida *Muscle* pada MEGA 7. Hasil alignment tersebut selanjutnya

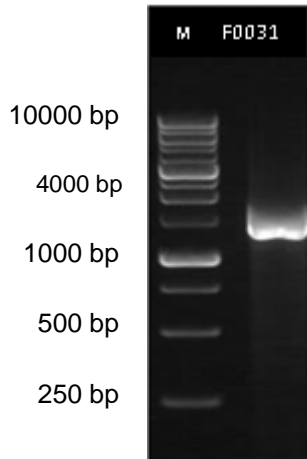
disimpan dalam bentuk file berektensi *fasta*.

File *fasta* selanjutnya di BLAST di situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). memanfaatkan fasilitas *nucleotide blast*, dengan pilihan analisis menggunakan data bakteri 16S rRNA yang ada pada situs tersebut. Hasil pencocokan nukleotida dengan database yang ada di situs NCBI, menjadi acuan utama dalam penentuan spesies bakteri.

Konstruksi filogeni isolat bakteri F0-0-3-1 dilakukan dengan terlebih dahulu menjajarkan hasil BLAST nukleotida dari situs GenBank, menggunakan MEGA 7. Proses penjajaran nukleotida tersebut dilakukan menggunakan bantuan software *Muscle*. Kontruksi filogeni dilakukan dengan menggunakan metode *maximum likelihood tree*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil gel elektroforesis yang divisualisasi menggunakan UV-Transluminator dapat dilihat adanya pita DNA muncul pada lintasan gel sampel di posisi 1400 bp. Keberadaan pita DNA pada posisi tersebut menandakan keberhasilan amplifikasi Gen 16S rRNA pada isolat bakteri F0-0-3-1 dalam penelitian ini.



Gambar 1. Pita DNA hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri F0-0-3-1 menggunakan marker 1kb

Kualitas nukleotida hasil sekuens gen 16S rRNA menggunakan primer forward F8 memiliki nilai  $QV^{+20}$  dan CRL masing-masing sebanyak 995 dan 941 nukleotida, sedangkan primer 1492R masing-masing sebanyak 1139 dan 1184 nukleotida. Tingginya jumlah nukleotida yang memiliki nilai  $QV^{+20}$  dan jumlah CRL yang panjang mengindikasikan kualitas hasil sekuens yang baik dalam penelitian ini. Adanya kualitas hasil sekuens kurang baik pada posisi nukleotida di posisi awal maupun akhir urutan sekuens untuk masing-masing primer pada penelitian ini, merupakan hal yang umum terjadi dalam proses sekuensing.

Hasil BLAST sekuens gen 16S rRNA isolate bakteri F-0-0-3-1 ditampilkan pada Tabel 1. Sebanyak lima spesies teratas yang memiliki kemiripan tertinggi dengan isolat bakteri F0-0-3-1, yaitu: *Bacillus wiedmanni*, *Bacillus proteolyticus* dan *Bacillus cereus* yang tergolong dalam genus *Bacillus*

Dari hasil analisis DNA yang didapatkan, *Bacillus* yang berhasil dikultur merupakan bakteri halofilik. Bakteri

halofilik merupakan bakteri yang hidup pada lingkungan yang memiliki kadar garam. Bakteri ini tergolong dalam famili *Halobacteriaceae*. Bakteri halofilik pada umumnya tahan dalam kondisi lingkungan bersalinitas tinggi sehingga mampu mendegradasi bahan organik. Selain itu, bakteri halofilik memiliki toleransi yang tinggi terhadap pencemar (Nilawati *et al.*, 2015).

Dalam pemeliharaan rotifer, jenis bakteri yang memiliki manfaat penting untuk pertumbuhan rotifer dan sering disebut sebagai bakteri probiotik, adalah jenis bakteri dari genus *Bacillus*. Hal tersebut dikarenakan bakteri dalam genus *Bacillus* mampu menghasilkan senyawa antimikroba alami yang mampu mengurangi jumlah bakteri patogen seperti *Vibrio* sp. (Zink, 2011). Selain itu, *Bacillus* juga dapat bermanfaat bagi pertumbuhan populasi rotifer karena memproduksi vitamin B12 dan mengurangi konsentrasi ammonia (Zink, 2011).

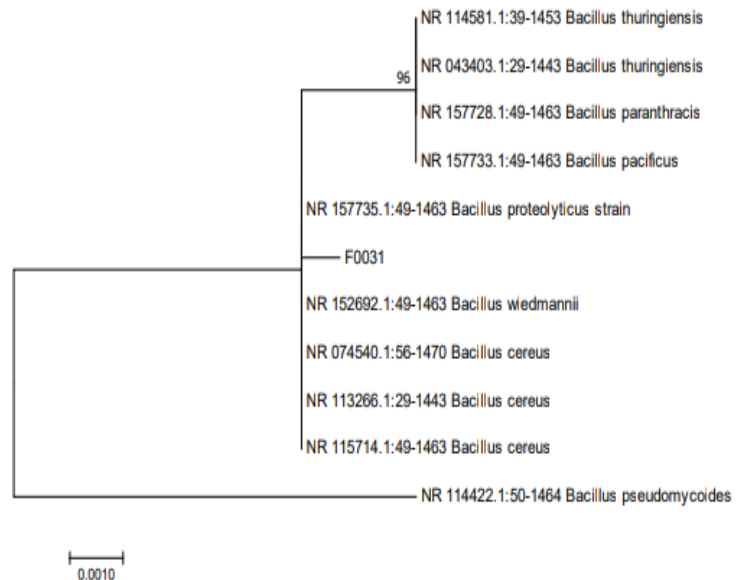
Contohnya *B. cereus* yang mampu melakukan aktivitas enzimatik yang penting dari esterase lipase (C8), leucine arylamidase, dan asam fosfat yang memiliki efek positif dalam pencernaan lipid. Selain itu, produksi  $\beta$  1,3 glukonase dari bakteri *B. clausii* juga memberikan potensi untuk menghidrolisis  $\beta$  1-3 glukon. Produksi enzim-enzim tersebut dapat meningkatkan efisiensi penyerapan nutrisi yang sangat bermanfaat bagi rotifer (Murillo and Villamil, 2011).

Tabel 1. Hasil BLAST nukleotida gen 16S rRNA isolat bakteri F0-0-3-1 pada situs NCBI Genbank

	Spesies	Max score	Total score	Query cover	E value	Per Indent
<b>F0-0-3-1</b>	<i>Bacillus wiedmanni</i> strain FSL W8-0169 16S ribosomal RNA, partial sequence	2519	2519	99%	0.0	98.87%
	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365 16S ribosomal RNA, partial sequence	2519	2519	99%	0.0	98.87%
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rnnA), partial sequence	2519	2519	99%	0.0	98.87%
	<i>Bacillus cereus</i> strain JCM 2152 16S ribosomal RNA, partial sequence	2519	2519	99%	0.0	98.87%
	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 16S ribosomal RNA, partial sequence	2519	2519	99%	0.0	98.87%

Hasil konstruksi filogeni berdasarkan data molekuler gen 16S rRNA bakteri isolat F0-0-3-1, menunjukkan bahwa isolat bakteri ini berada pada kelompok bakteri dalam satu percabangan dengan *B. cereus*, *B. weidmannii* dan *B. proteolyticus*. Menurut Liu et al., 2017 *B. cereus*, *B. wiedmanni* dan *B. proteolyticus* bersama dengan sembilan species dari genus *Bacillus* lainnya (seperti *B. Paranthracis*, *B. Pacificus*, *B. tropicus* *B. Albus*, *B. mobilis*, *B.luti*, *B. Proteolyticus*, *B. Nitratireducens*, dan *B. paramycoides*), merupakan kelompok species bakteri yang digolongkan dalam kelompok species *B. cereus*. Liu et al.,2017 menambahkan bahwa bakteri kelompok *B. cereus* adalah kelompok bakteri sensu lato, yaitu kelompok taksonomi yang memiliki anggota species yang masih terkelompok ditaxa lain, sehingga kelompok taxa ini diduga memiliki jumlah

spesies yang lebih besar dari yang terdata saat ini.



Gambar 2 . Posisi filogeni molekuler isolat bakteri F0-0-3-1 yang dikonstruksi menggunakan metode Neighbor Joining Tree

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil filogeni molekuler yang telah dilakukan dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa Isolat bakteri F0-0-3-1 merupakan spesies bakteri yang tergolong dalam spesies *B. cereus* sensu lato

### DAFTAR PUSTAKA

- Erick, O. O., Wullur, S., & Hagiwara, A. (2019). Blending fishwastes and chicken manure extract as low-cost and stable diet for mass culture of freshwater zooplankton, optimized for aquaculture.
- Knuckey, R. M., Rumengan, I., & Wullur, S. (2004). SS-strain rotifer culture for finfish larvae with small mouth gape. *Advances in Grouper Aquaculture*.
- Liu, Y; J. Du; Q. Lai; R. Zeng; D. Ye; J. Xu Z. Shao (2017). TAXONOMIC DESCRIPTION *Int J Syst Evol Microbiol* ;67:2499–2508
- Leboffe, M. J dan B. E. Pierce. (2012). *Brief Microbiology. Laboratory Theory & Application 2<sup>nd</sup> Edition. Englewood: Morton Publishing.* 103- 105 pp
- Murillo, I. dan L. Villamil. (2011). *Bacillus cereus and Bacillus subtilis Used as Probiotics in Rotifer (Brachionus plicatilis) Cultures.* *Journal of Aquaculture Research and Development*S1:007.DOI:10.4172/2155-9546.S1-007. Nilawati; Marihati; Susdawanita; N. I.Setianingsih. (2015). *Kemampuan Bakteri Halofilik Untuk Pengolahan Limbah Industri Pemindangan Ikan.* *Jurnal Riset Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri* Vol. 5, No. 2, November 2014. Hal 23-28
- NCBI, (1988). National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.[Computer software]. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). diakses 2019
- Napitupulu, G. H; I. F. M Rumengan; S. Wullur; E. L. Ginting; J. Rimper; B. H. Toloh; (2019). *Bacillus* sp. As a Decomposition Agent in The Maintenance of *Brachionus rotundiformis* Which Uses Raw Fish As a Source of Nutrition. *Jurnal Ilmiah Plantax*, 7(1) : 164.
- Ogello, E. O., Wullur, S., Sakakura, Y., & Hagiwara, A. (2018). Composting fishwastes as low-cost and stable diet for culturing *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff (Rotifera): Influence on water quality and microbiota. *Aquaculture*, 486, 232-239.
- Ogello, E. O., Wullur, S., Yoshitaka, S., & Hagiwara, A. (2020, February). Dietary value of waste-fed rotifer *Brachionus rotundiformis* on the larval rearing of japanese whiting *Sillago japonica*. *E3S Web of Conferences*.
- Ogello, E. O., Wullur, S., & Hagiwara, A. (2019, July). Blending fishwastes and chicken manure extract as low-cost and stable diet for mass culture of freshwater zooplankton, optimized for aquaculture. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 567, No. 1, p. 012022). IOP Publishing
- Rumengan, I. F. M. (1997). *Marine Rotifers (Brachionus spp) As Biokapsule for Larvae of Various Marine Fauna.* *Warta-Wiptek*, 19. 34 – 43 pp
- Rumengan, I. F. M; E. Kaligis; V. Warouw; S. Wullur (2017). *Karakteristik Morfologi Telur Dorman Rotifer (Brachionus rotundiformis) Hasil Kultur Masal.* *Jurnal Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat*. 240 – 246.

- Rumengan, I. F. M; M. Sulung; Z. Lantiunga; J. Kekenusa (2007). *Morfometri Rotifer Brachionus rotundiformis Strain SS Asal Tambak Minanga Dan Tambak Watulney Sulawesi Utara yang Dikultur Pada Salinitas Berbeda*. Jurnal Riset Akuakultur Vo.2 No.2 Tahun 2007.
- Rumengan, I. F. M; E. Suryanto; R. Modaso; S. Wullur; T. E. Tallei; D. Limbong (2013). *Karakteristik Struktur Kitin Dan Kitosan Yang Diisolasi Dari Biomassa Rotifer Brachionus rotundiformis Hasil Kultur*. Seminar Tahun Ke-2 & Workshop Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Serta Kongres Forum Biofarmasi Kelautan Indonesia.
- Wullur,S., Napitupulu, H., Wantania, L. L., Ginting, E. L., Warouw, V., TILAAAR, S., & Rumengan, I. F. M. (2020). Molecular identification of bacteria isolated from culture medium of rotifer fed on fishery waste diet. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(6).
- Wullur, S., Ginting, E. L., Waraow, V., Rumengan, I. F. M., Ogello, E. O., & Hagiwara, A. (2019, July). Growth response of rotifers on a bacterial-based diet made from fishwastes. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 567, No. 1, p. 012030). IOP Publishing.
- Wullur S, Ginting EL, Waraow V, Rumengan IFM, Ogello EO, Hagiwara A. 2019. Growth response of rotifers on a bacterial-based diet made from fishwastes. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 567: 012030. DOI: 10.1088/1757-899X/567/1/012030.
- Wullur S, Kumagai S, Sakakura Y, Hagiwara A. 2018. Assessment of different minute zooplankton in the larval rearing of rusty angelfish *Centropyge ferrugata*. *AAFL Bioflux* 11 (5): 1495-1501.
- Wullur S, Sakakura Y, Hagiwara A. 2011. Application of the minute monogonont rotifer *Proales similis* de Beauchamp in larval rearing of seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture* 315 (3-4): 355-360.
- Wullur S, Yoshimatsu T, Tanaka H, Ohtani M, Sakakura Y, Kim HJ, Hagiwara A. 2013. Ingestion by Japanese eel *Anguilla japonica* larvae on various minute zooplanktons. *Aquac Sci* 61 (4): 341-347.
- Wullur S. 2017. Rotifer dalam Perspektif Marikultur. LPPM Press, Manado. [Indonesian]
- Zink, I. C.; P. A. Douillet; D. D. Benetti. (2011). *Improvement of Rotifer Brachionus plicatilis Population Growth Dynamics With Inclusion of Bacillus spp. Probiotics*. *Aquaculture Research*, 2011, 1 –12. DOI : 10.1111/j.1365-2109.2011.03023.x