

FILOGENI MOLEKULER BAKTERI DARI MEDIA PEMELIHARAAN ROTIFER YANG DIBERI OLAHAN LIMBAH IKAN SEBAGAI SUMBER NUTRISI***MOLECULAR PHYLOGENY OF BACTERIA FROM CULTURE MEDIA OF ROTIFER SUPPLIED WITH PROCESSED FISH WASTE AS A NUTRITIONAL SOURCE*****Herlin S. Hubu¹, Stenly Wullur¹, Veibe Warouw¹, Elvy L. Ginting¹, Robert A. Bara¹, Adnan S. Wantasen²**¹Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado²Jurusan Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, ManadoCorresponding Author : stenlywullur@unsrat.ac.id**Abstract**

This study aims to identify and construct molecular phylogeny of an isolate bacteria from culture media of rotifer *Brachionus rotundiformis* supplied with processed fishery waste feed as nutritional source. The use of fish waste-based food for rotifer showed positive effects on growth and nutrient content of the rotifers. Genomic DNA of the isolate bacteria BRLI-01 was extracted and the 16S rRNA gene was amplified using primers (8F and 1492F) and further sequenced using Sanger sequence technique. The 16S rRNA gene was analysed using SeqScanner® and MEGA® followed with BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analyses in the NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Amplification result of 16S rRNA gene bacteria s NCBI site as a reference for identification and phylogeny of bacterial species. BRLI-01 was successfully cultured on rotifer rearing media. The results of the 16S rRNA gene amplification of the isolate bacteria showed a DNA band with a length of 1400 bp. The BLAST result on the NCBI showed that the isolate bacteria BRLI-01 had a percent identity (98.46%) and is in the same phylogeny branching position with *Vibrio rotiferianus*

Keywords: Rotifers, Bacteria, Fish waste, 16S rRNA Genes, Phylogeny identification

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan posisi filogeni isolate bakteri BRLI-01 yang diisolasi dari media pemeliharaan rotifer *Brachionus rotundiformis* menggunakan olahan pakan limbah perikanan. Penggunaan sumber nutrisi rotifer berbasis ikan mentah memberi pengaruh positif terhadap pertumbuhan dan kandungan nutrisi rotifer. Genomik DNA isolat bakteri BRLI-01 diekstrak dan gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan primer (8F dan 1492F) yang dilanjutkan dengan sekuensing nukleotida menggunakan teknik Sanger Sekuensing. Hasil sekuens gen 16S rRNA isolate bakteri BRLI-01 dianalisis menggunakan software SeqScanner® dan MEGA® yang dilanjutkan dengan proses BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disitus NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri BRLI-01 menunjukkan adanya pita DNA pada panjang 1400 bp. Hasil BLAST pada situs NCBI menunjukan bahwa isolate bakteri BRLI-01 memiliki persentase kemiripan (98.46%) dan terletak pada posisi percabangan filogeny yang sama dengan bakteri *Vibrio rotiferianus*

Kata Kunci: Rotifer, Bakteri, Limbah ikan, Gen 16S rRNA, Identifikasi filogeni

PENDAHULUAN

Rotifer merupakan organisme yang tergolong dalam kelompok zooplankton yang berukuran mikroskopis dan biasanya bergerak secara aktif yang biasanya dikembangkan sebagai pakan ikan (Daud, 2015). Bagian tubuh rotifer terbagi atas 3 bagian yaitu : kepala, badan dan kaki. Mahkota rotifer adalah organ yang dimana tempat tumbuhnya benang-benang silia. Pergerakan pada korona eksternal (*cingulum*) yang berfungsi untuk berenang sedangkan silia yang terdapat pada bagian internal (*pseudotrochus*) yang berperan untuk mengambil partikel makanan dari alga, atau detritus dari material organik pada kolom air untuk asupan nutrisi rotifer (Wullur, 2017). Tingginya potensi yang dimiliki oleh rotifer baik segi sediaan bahan obat maupun segi pemanfaatan lainnya dibidang budidaya laut, banyak penelitian telah dilakukan dalam mengkultur massal rotifer spesies *Brachionus rotundiformis*. Pengembangan metode kultur rotifer telah dilakukan dengan menggunakan pakan ikan mentah sebagai sumber nutrisi. Dengan adanya ikan mentah yang dimasukkan pada wadah kultur rotifer diduga akan terjadi proses penguraian pada bangkai ikan yang akan menjadi bahan organik yang dilakukan oleh bakteri (Napitupulu, 2019). Identifikasi spesies melalui teknik BLAST (Basic Local Alignment Tool) yang dilakukan dengan cara memasukan sekuen DNA dari spesimen yang tidak dikenal kemudian dibandingkan dengan sekuen yang berasal dari individu yang telah diketahui identitasnya dalam database bank (NCBI, 2019). Filogeni juga dapat menggambarkan bentuk koloni, warna

koloni dan sebagainya sedangkan filogeni modern menggunakan sumber informasi yang diambil dari materi DNA dengan urutan protein (Indramsa, 2013). Filogeni juga adalah tahap untuk melihat spesies, genus berdasarkan sekuen mitokondrianya dan melihat kerabat terdekat pada spesies lain dari genus yang berbeda dengan menggunakan pendekatan *in silico* (Seprianto, dkk, 2018).

METODE PENELITIAN

Ekstraksi DNA isolat bakteri BRLI-01 dilakukan dengan menggunakan *Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)*, dengan tujuan untuk mendapatkan DNA genom. Proses ekstraksi diawali dengan mensentrifugasi isolat bakteri pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Pelet hasil sentrifugasi ditambahkan 180 µl buffer ATL dan 20 µl Proteinase K selanjutnya divortex dan diinkubasi selama 1 jam, dengan interval vortex setiap 15 menit. Sampel kemudian ditambahkan 200 µl buffer dan divortex selama 30 detik, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 70°C dan ditambahkan 200 µl etanol 100%.

Sampel dipindahkan pada spin filter yang ditempatkan diatas 2 ml collection tube dan ditambahkan 500 µl AW1 kemudian di *sentrifuge* pada kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit Larutan selanjutnya melewati spin filter dan terkumpul di *collection tube*. Larutan tersebut dibuang dan kemudian pada spin filter Kembali ditambahkan 500 µl buffer AW2 dan disentrifuge kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Larutan yang terkumpul pada collection tube dibuang dan spin filter dipindahkan ke atas collection tube yang baru. Langkah

selanjutnya adalah menambahkan 200 μ l *buffer* AE, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruangan, dan di *sentrifuge* kembali dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Hasil ekstraksi DNA genom bakteri yang terkumpul pada *collection tube* selanjutnya digunakan dalam proses amplifikasi gen 16S rRNA bakteri menggunakan PCR.

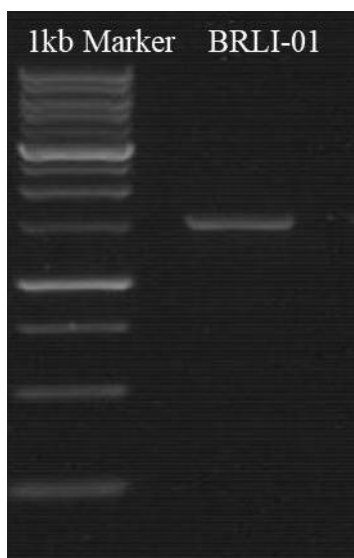
Proses amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan mencampur; μ 1 hotfirepoll, 1 μ l primer 10x 8F, 1 μ l primer 10x 1492R, 17 μ l ddH₂O dan 1 μ l DNA genom bakteri. Campuran dimasukan kedalam tube PCR, dengan siklus penyetelan PCR, sebagai berikut; (1) 95^oc selama 6 menit, (2); 95^oc selama selama 30 detik, (3); 52^oc selama 30 detik, (4); 72^oc selama 30 detik, (5); 72^oc selama 10 menit. Siklus PCR ini dilakukan sebanyak 35 siklus. Keberhasilan proses amplifikasi diamati menggunakan teknik elektroforesis. Gel elektroforesis dibuat dengan melarutkan 0,5 gram agarose, 5 ml TBE kedalam 45 ml ddH₂O. Hasil dari campuran tersebut dipanaskan sampai semua bahan tersebut terlarut dengan sempurna. Setelah itu campuran didinginkan selama 10 menit, dan di tambahkan 1 μ l Green I Nucleit acid Gel Strain 10.000x Concentrate pada DMSO. Larutan gel agarose tersebut dimasukan kedalam cetakan dan didiamkam selama 30 menit. Selanjutnya TBE buffer 500 ml dimasukan kedalam wadah elektroforesis dilanjutkan dengan meletakan gel agarose ke dalam elektroforesi hingga seluruh bagian terendam. Selanjutnya amplicon diambil menggunakan mikropipet dengan takaran 4 μ l dan dicampurkan 1 μ l Loading Dye, kemudian dimasukan menggunakan mikropipet kedalam

sumur gel agarose. Pada ujung sebelah kiri sumur gel agarose, kemudian dimasukan Leader sebagai penandan dengan takaran 2 μ l. Setelah semua sampel dimasukan kedalam elektroforesis, wadah ditutup dan di tunggu selama 30 menit pada tegangan 80 volt. Setelah 30 menit hasil dari elektroforesis dikeluarkan dan tahap selanjutnya diamati menggunakan UV Transliminator untuk melihat posisi amplicon yang ada pada gel agarose. Pita DNA yang muncul pada posisi 1400 bp menandakan proses amplifikasi gen 16S rRNA bakteri telah berhasil dilakukan. Amplicon selanjutnya disekuens menggunakan teknik Sanger sekuensing, dengan menggunakan jasa sekuensing, First Base Malaysia.

Kromatogram hasil sekuens nukleotida gen 16sRNA selanjutnya dianalisis menggunakan program *Sequence scanner*[®] dan *MEGA7*[®]. Proses pensejajaran basa nukleotida dari hasil sekuensing pasangan primer *forward* dan *reverse* dilakukan dengan menggunakan program *Muscle*[®]. Hasil pensejajaran nukleotida tersebut kemudian diubah kedalam bentuk file fasta untuk digunakan dalam proses pencocokan sekuens DNA gen 16S rRNA dengan database spesies bakteri yang ada di situs NCBI (National Center for Biotechnology Information). Proses pencocokan sekuens tersebut dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yang tersedia di situs NCBI. Hasil BLAST selanjutnya diunduh dalam format fasta untuk dijadikan sebagai sekuens acuan dalam mengkonstruksi posisi filogeni isolat bakteri menggunakan metode maximum likelihood tree.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil gel elektroforesis yang divisualisasikan dengan menggunakan UV-Transluminator menunjukkan bahwa amplicon gen 16S rRNA isolat bakteri BRLI-01 teramati pada posisi 1400 bp. Beberapa peneliti melaporkan bahwa gen 16S rRNA merupakan gen yang terdapat pada inti sel bakteri dan memiliki jumlah pasangan basa sekitar 1400an bp (Akihary, *dkk*, 2020). Munculnya pita DNA amplicon gen 16S rRNA isolat bakteri BRLI-01 pada posisi 1400 bp mengindikasikan keberhasilan amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri BRLI-01 dalam penelitian ini.



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri BRLI-01

Hasil analisis kualitas sekuens gen 16S rRNA isolate bakteri BRLI-01 menggunakan program *Sequence scanner* menunjukkan adanya sebanyak 1.174 (*forward*) dan 1.429 (*reverse*) nukleotida yang berhasil tersekuens, dengan sebanyak 1.056 (*forward*) dan 1.225 (*reverse*) nukleotida berkualitas baik (QV>20). Tingginya jumlah nukleotida yang memiliki kualitas hasil

sekuens yang baik menunjukkan bahwa proses sekuensing hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolate bakteri BRLI-01 dalam penelitian ini telah dilakukan dengan baik sehingga dapat menghasilkan data hasil sekuens nukleotida yang umumnya berkategori baik. Analisis kualitas hasil sekuens tersebut digunakan sebagai acuan dalam menentukan DNA konsesus sekuens 16S rRNA isolat bakteri BRLI-01, yang mendapatkan panjang basa nukleotida sebanyak 1.421 nukleotida. Hasil BLAST DNA konsensus gen 16s rRNA isolat bakteri BRLI-01 di situs NCBI menunjukkan adanya kemiripan tertinggi dengan spesies bakteri dari genus yang *Vibrio* yang ada dalam database genbank (Tabel 1). Spesies-spesies bakteri dengan persentase kemiripan tertinggi dengan isolat bakteri BRLI-01, diantaranya adalah *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio campbellii* dan *Vibrio alginolyticus*.

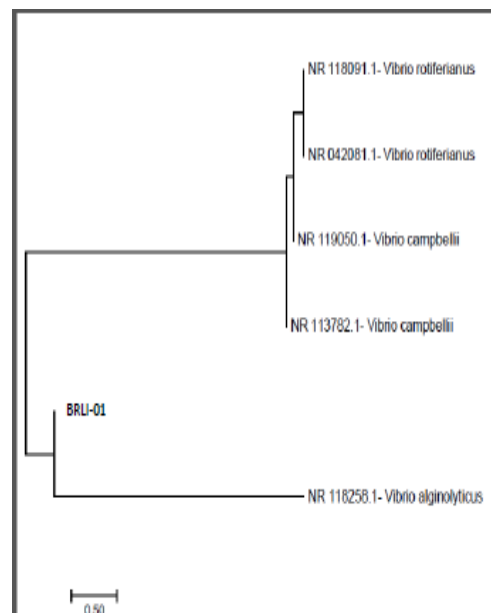
V. rotiferianus memiliki tingkat kemiripan dengan *V. campbellii*, *V. harveyi* dengan presentasi 99% serta memiliki urutan yang sama pada gen 16S rRNA, ditemukan dalam kultur dan mikro organisme ditemukan dalam kultur rotifer (Chowdhury, et. al., 2011; Wullur et al., 2020a; Wullur et al., 2020b). Menurut laporan bahwa bakteri *V. alginoliticus* sering ditemukan di perairan yang beriklim sedang, dan

V. alginolitus merupakan bakteri yang bersifat patogenik (Molitoris, et. al., 1985). Menurut institut ilmu kedokteran Universitas Tokyo bahwa *V. alginoliticus* memiliki toksisitas pada pertumbuhan rotifer (Narita, et. al., 1986).

Spesies	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	Per Indent	Accession
<i>Vibrio rotiferianus</i>	2501	2501	100%	0.0	98.46%	NR_118091.1
<i>Vibrio rotiferianus</i>	2501	2501	100%	0.0	98.46%	NR_042081.1
<i>Vibrio campbellii</i>	2490	2490	99%	0.0	98.38%	NR_119050.1
<i>Vibrio campbellii</i>	2481	2481	100%	0.0	98.10%	NR_113782.1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2464	2464	100%	0.0	98.03%	NR_118258.1

Tabel 1. Hasil NCBI BRLI-01

Hasil dari filogeni dengan menggunakan gen 16S rRNA pada isolate BRLI-01 menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk dalam kelompok bakteri *Vibrio rotiferianus* dan *Vibrio campbellii*. Menurut Gil, et. al., 2003 *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* merupakan satu kelompok dengan bakteri *Vibrio rotiferianus*. Gil, et. al., 2003 juga menambahkan dimana hasil strain menunjukkan bahwa *Vibrio harveyi* adalah *Vibrio campbellii*, hal ini diperkuat dengan adanya nilai akhir yang ditemukanya dan *Vibrio campbellii* adalah salah satu spesies yang menyebabkan penyakit pada organisme air. Menurut Ke, et. al., 2017 bahwa *Vibrio harveyi*, *Vibrio Campbellii* memiliki urutan kesamaan dalam urutan rRNA dengan *Vibrio rotiferianus*.



Gambar 2. Posisi filogeni molekuler isolat bakteri BLTI-01 yang dikonstruksi menggunakan metode Maximum Likelihood

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolate bakteri BRLI-01 yang diisolasi dari media pemeliharaan rotifer menggunakan limbah ikan sebagai sumber nutrisi rotifer, menunjukkan bahwa sekuens DNA gen 16S rRNA isolat bakteri BRLI-01 memiliki kemiripan (98.46%) dengan spesies bakteri *V. rotiferianus*. Hasil analisis filogeni menunjukkan bahwa isolat bakteri BRLI-01 ini berada pada percabangan yang sama dengan *V. rotiferianus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Akihary, V. C.; Kolondam, J. B., 2020. Pemanfaatan Gen rRNA Sebagai Perangkat Identifikasi Bakteri Untuk Penelitian-Penelitian Di Indonesia. Jurnal Ilmiah Farmasi. Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Sam Ratulangi. Vol.9 No. 1. ISSN 2302-2493.
- Chowdhury, R. P.; Boucher, Y.; Hassan, A. K.; Paulsen, T. I.; Stokes, W. H.; Labbate, M., 2011. Genome Sequence of *Vibrio rotiferianus* Strain DAT722. Journal Of Bacteriology. The i3 Institute, University Of Technologi. P.3381-3382. DOI:10.1128/JB.05089-11.
- Daud, M., 2015. Tehnik Kultur Massal Rotifer(*Brachionus rotundiformis*) Tanpa Menggunakan Bio Alga Di Balai Benih Ikan Pantai Simeulue-Aceh. Program Pascasarjana, Universitas Terbuka, Jakarta.
- Gil, G. B.; Rodriguez, S. S.; Gasca, G. A.; Roque, A.; Juarez, V. R.; Thompson, L. F.; Swings, J., 2003. Molecular Identification of *Vibrio harveyi*-related Isolates Associated With Diseased Aquatic Organisms. Journal Microbiology. CIAD/Mazatlan Unit For Aquaculture, AP 711. Mexico. 150, 1769-1777. DOI 10.1099/mic.0.26797-0
- Indramsa. 2013. Peran Sistematis Mikrobial Dalam Mengungkap Keanekaragaman Mikroorganisme. Jurnal Keluarga Sejahtera Staf pengajar. Jurusan FMIPA UNIMED. Vol 11(22). ISSN: 163-1157. Hal 58-63.
- Ke, M. H.; Prachumwat, A.; Yu, P. C.; Yang, T. Y.; Promsri, S.; Liu, F. K.; Lo, F. C.; Lu, J. Y. M.; Lai, C. M.; Tsai, J. I., Li, H. W., 2016. Comparative Genomics of *Vibrio campbellii* Strain and Core Species of the *Vibrio harveyi* clade. Journal Scientific Reports. Program In Microbial Genomics, National Chung Hsing University and Academia, Sinica, Taiwan. 7:41394. DOI:10.1038/srep41394.
- Molitoris, E.; Joseph, W. S.; Krichevsky, I. M.; Sinuhardja, W.; Colwell, R. R., 1985. Characterization and Distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* Isolated in Indonesia. Journal Applied And Environmental Microbiology. Departement of Microbiology,

- University of Maryland, Collage Park, Maryland. p 1388-1394. 0099-2240/85/121388-0702.00/0
- Napitupulu, H. G.; Rumengan, M. F. I.; Wullur, S.; Ginting, L. E.; Rimper, L. S. T. R. J.; Toloh, H. B., 2019. *Brachilus* sp. Sebagai Agenia Pengukuran Dalam Pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* Yang Menggunkan Ikan Mentah Sebagai Sumber Nutrisi. Jurnal Ilmiah Platax. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado. Vol. 7:(1).
- Narita, H.; Matsubara, S.; Miwa, N.; Akahane, S.; Murakami, M.; Goto, T.; Nara, M.; Noguchi, T.; Saito, T.; Shida, Y.; Hashimoto, K., 1986. *Vibrio alginolyticus*, a TTX-Producing Bacterium Isolated from the starfish *Astropecten polyacanthulus*
- Seprianto.; Wahyuni, D. F., 2018. Analisis Bionformatika Gen Potensial Penyakit *Halichondrinb* Dari Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker. Program Studi Bioteknologi, Universitas Esa Unggul, Jakarta. IJBB Volume 2, Nomor 2.
- Wullur, S., 2017. Rotifer Dalam Perspektif Marikultur. Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Sam Ratulangi Manado, (LPPM UNSRAT). ISBN 978-602-60359-4-3.
- Wullur, S., Napitupulu, H., Wantania, L. L., Ginting, E. L., Warouw, V., Tilaar, 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., Napitupulu, H., Ginting, L. L., Mamangkey, N. G. F., Louisiana Lantania, L., Smolak, R., & Ogello, E. (2020). Molecular identification of bacteria isolated from culture medium of the gold-lipped pearl oyster *Pinctada maxima* larvae. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(11).