

**IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI DALAM FESES KUCING
(*Felis domestica*) YANG DITUMBUHKAN PADA DE MANN ROGOSA
SHARPE AGAR (MRSA)**

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF BACTERIA IN CAT (*Felis
domestica*) FECES GROWN ON DE MANN ROGOSA SHARPE AGAR
(MRSA)**

Pingkan Stela Mende¹⁾, Johanis Pelealu¹⁾, Beivy Kolondam¹⁾

¹⁾Jurusan Biologi, FMIPA Unsrat Manado, 95115

ABSTRACT

*Bacteria has many important role in the digestive tract of animals. Beneficial bacteria in the digestive tract are thought to be able to inhibit the growth of pathogenic bacteria, while pathogenic bacteria can cause diseases and infections. This research aimed to grow bacteria living in cat feces and to identify it with molecular method. This study used molecular identification based on 16S rRNA gene as marker. There were three isolate if bacteria taken from the culture. Two isolates were identified as *Enterococcus faecalis* (with 99% and 100% in similarity compared with GenBank database). One isolate was identified as *Kurthia gibsonii* (100% in similarity).*

Keywords: *Bacteria, cat feces, MRS Agar, gen 16s rRNA*

ABSTRAK

Bakteri memiliki peran penting dalam saluran pencernaan hewan. Bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan dianggap mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, sedangkan bakteri yang merugikan dalam saluran pencernaan hewan dianggap mampu menyebabkan penyakit dan infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk menumbuhkan bakteri-bakteri yang ada dalam feses kucing dan mengidentifikasinya dengan metode molekuler. Penelitian ini menggunakan identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA sebagai penanda. Hasil penelitian ini mendapatkan tiga isolat bakteri. Dua diantaranya teridentifikasi sebagai *Enterococcus faecalis* (kemiripan 99% dan 100% dengan yang ada di GenBank). Satu isolat teridentifikasi sebagai *Kurthia gibsonii* (kemiripan 100%).

Kata kunci: Bakteri, feses kucing, Agar MRS, gen 16S rRNA

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan organisme yang jumlahnya paling banyak di bumi, umumnya bersel satu, tidak memiliki membran inti sel, berukuran sangat kecil, serta memiliki peran besar di bumi. . Secara umum, bakteri dapat dijumpai di berbagai habitat yang cukup luas, salah satunya dalam saluran pencernaan manusia dan hewan (Misgiyarti *et al.*, 2002). Berdasarkan peranannya, bakteri terbagi atas dua macam, yaitu bakteri yang merugikan dan bakteri yang menguntungkan. Bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan dianggap memiliki peran penting dalam saluran pencernaan karena dapat memberikan manfaat dalam meningkatkan kesehatan dan daya imunitas hewan (Ziemer dan Gibson, 1998), dapat mencegah infeksi saluran cerna (Saranraj *et al.*, 2013), dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dalam saluran pencernaan manusia dan hewan (Savadogo *et al.*, 2004).

Bakteri yang merugikan dianggap mampu menyebabkan penyakit dan infeksi saluran pencernaan. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengeksplorasi jenis-jenis bakteri yang ada dalam saluran pencernaan hewan, tetapi belum ada penelitian tentang jenis-jenis bakteri-bakteri yang terdapat dalam saluran pencernaan kucing liar, terutama yang ada di Indonesia.

Untuk mengetahui jenis-jenis bakteri yang ada dalam saluran pencernaan perlu adanya media. Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat dan nutrisi yang diperlukan mikroba untuk pertumbuhannya, untuk tujuan-tujuan seperti isolasi, seleksi dan diferensiasi

biakan yang didapat (Antonita, 2010). Berdasarkan sifat-sifatnya, media terbagi atas beberapa macam media salah satunya media umum dan media selektif (Dwidjoseputro, 1994). MRSA merupakan media selektif yang diperkenalkan oleh De Mann, Rogosa, dan Sharpe tahun 1960 untuk memperkaya, menumbuhkan dan mengisolasi jenis bakteri asam laktat dari seluruh jenis bahan. Di lain sisi, MRS agar tidak cukup selektif, karena ada kemungkinan jenis bakteri lain dapat tumbuh dalam media tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk menumbuhkan bakteri dalam feses kucing pada media MRSA. Bakteri-bakteri yang tumbuh pada media MRSA akan diidentifikasi menggunakan teknik molekuler berdasarkan sekuens gen 16S rRNA.

METODE PENELITIAN

Preparasi Sampel

Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel. Sampel feses kucing jantan yang berumur 2 tahun 4 bulan diambil menggunakan sendok steril dan ditampung di botol kaca steril dengan menambahkan 5 mL aquades. Setelah itu mulut botol ditutup menggunakan aluminium foil kemudian dibawa ke laboratorium.

Isolasi Bakteri

Sebanyak 5 mg feces kucing yang telah dicampurkan aquades yang mengandung bakteri dipindahkan ke dalam tabung reaksi dengan menambahkan 10 ml aquades dan di homogenkan. Sebanyak 1 ml sampel dipipet ke dalam tabung reaksi yang baru dengan menambahkan 9 ml

aquades (pengenceran 10^{-1}), lakukan pengenceran ini dengan cara yang sama sampai ke (Pengenceran ke 10^{-5}) untuk memperkecil atau mengurangi jumlah mikroba (Wasteson *et al.*, 2009). Sebanyak 1 ml sampel dari masing-masing tabung reaksi dipindahkan dengan pipet ke dalam cawan petri yang berisi agar MRS, selanjutnya diinkubasikan selama 48 jam dengan suhu 37°C (Lawalata *et al.*, 2011). Diambil tiga koloni bakteri untuk dimurnikan pada agar MRS yang baru dengan metode *Streak plate*. Setelah itu, bakteri tunggal dipindahkan ke agar MRS miring untuk ditumbuhkan.

Ekstraksi DNA dan Amplifikasikan Gen 16S rRNA

Ekstraksi DNA bakteri dilakukan menggunakan Plant Genomic DNA mini kit (Geneaid). Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan kit My Taq HS Red Mix (Bioline). Primer yang digunakan yaitu BKXF (forward) dan BKXR (reverse) (Kolondam 2018, komunikasi pribadi). Sebelum memulai proses amplifikasi terlebih dahulu membuat Mastermix dengan komposisi MyTaq 20 μL , DNA 2 μL , primer forward dan reverse masing-masing 1,5 μL dan miliQ water 15 μL total reaksinya sebesar 40 μL . Pengaturan suhu untuk PCR: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus denaturasi

pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 50 detik dan tahap terakhir yaitu polimerisasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Fragmen DNA yang telah diamplifikasi beserta dengan primer dikirim ke First Base C.O Malaysia untuk di sekuensing.

Analisis Data

Analisis data hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan software Geneious V.5.6. Sekuens DNA dianalisis menggunakan software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk mencari sekuens yang serupa yang tersedia di GenBank.

HASIL DAN PEMBAHASAN

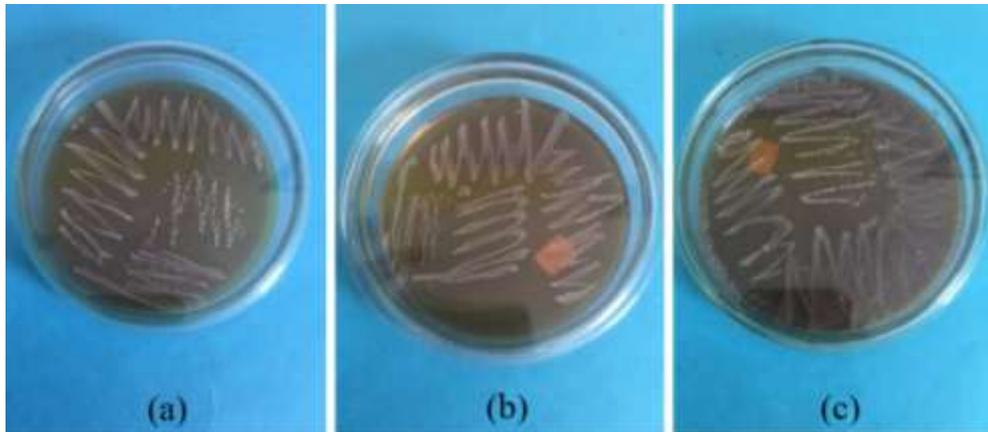
Pengamatan Morfologi Koloni

Bakteri diisolasi dari sampel feses kucing dengan menggunakan metode pengenceran berseri. Dari hasil pengenceran, setelah diamati ada tiga isolat dengan morfologi koloni yang berbeda. Isolat tersebut terdapat pada pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} yang kemudian diberi nama PSM1, PSM2 dan PSM3 (Gambar 1). Morfologi koloni dapat dilihat dalam (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Pengamatan morfologi koloni bakteri dari feses kucing pada media MRSA

Isolat Bakteri	Morfologi Koloni			
	Warna	Tepi	Bentuk	Bentuk Permukaan
PSM1	Putih Susu	Bergerigi	Bulat	Cembung
PSM2	Putih Krem	Rata	Bulat	Cembung

PSM3	Putih bening	Bergerigi	Bulat	Cembung
------	--------------	-----------	-------	---------

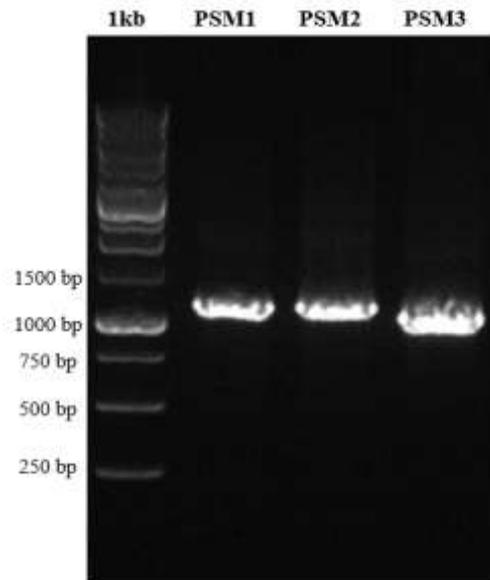


Gambar 1. Isolat hasil pemurnian bakteri: (a) PSM1 (b) PSM2 (c) PSM3

Identifikasi Bakteri Menggunakan Gen Penanda 16S rRNA

Berdasarkan hasil elektroforesis fragmen DNA bakteri yang telah diamplifikasikan dengan gen 16S rRNA, dapat diketahui bahwa panjang fragmen DNA berada pada kisaran 100-1100 bp (Gambar 2). Dari hasil sekuensing, dicari sekuens-sekuens gen 16S rRNA yang mirip dengan sekuens PSM1, PSM2 dan PSM3 dengan menggunakan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Dari

hasil pencarian ini diketahui PSM1 memiliki kemiripan 99% dengan *Enterococcus faecalis* (nomor akses: MH819482.1), PSM2 memiliki kemiripan 100% dengan *E. faecalis* (nomor akses: MH779826.1), dan PSM3 memiliki kemiripan 100% dengan *Kurthia gibsonii* (nomor akses: MH619509.1). Dua dari tiga bakteri ini merupakan bakteri yang berjenis sama berdasarkan data di GenBank.



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA sampel bakteri dalam elektroforesis gel agarosa 0.8%

PSM1 dan PSM2 memiliki koloni yang berbeda tetapi diidentifikasi menghasilkan jenis yang sama yaitu *E. faecalis*. Perbedaan morfologi koloni diduga karena adanya variasi koloni pada saat pertumbuhan *E. faecalis*. Variasi koloni juga terjadi sesuai dengan yang digambarkan oleh penelitian Proctor *et al.* (2006). Penelitian ini membahas tentang variasi koloni, yakni populasi koloni yang berkembang lambat dengan karakter fenotip yang khas. Ditemukan variasi berupa ukuran koloni, tingkat pertumbuhan dan morfologi koloni yang atipikal pada *E. faecalis*.

Deskripsi Bakteri Yang Tumbuh Pada Media MRSA

E. faecalis merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, fakultatif anaerob, kokus, dan tidak menghasilkan reaksi katalase dengan hidrogen peroksida (Rollins *et al.*, 2009). Bakteri ini bersifat homofermentatif yang mengubah glukosa menjadi asam laktat (de Vos *et al.*, 2009). Selain hidup dalam

dalam saluran pencernaan manusia dan hewan, *E. faecalis* juga dapat dijumpai dalam saluran kemih dan dapat juga berkoloni dalam rongga mulut manusia. Secara filogenetik, *Enterococcus* termasuk dalam Divisi Firmicutes, Ordo Lactobacillales dan famili Enterococcaceae (Dian, 2005).

Kurthia gibsonii merupakan bakteri Gram positif, tidak berspora dan berbentuk batang (Keddie, 1991). Selain hidup dalam saluran pencernaan hewan, bakteri ini juga dapat ditemui di lingkungan dengan bahan organik yang membusuk seperti bangkai babi (Shaw and Keddie, 1993), kotoran hewan ternak, dan makanan lainnya (Pin and Baranyi, 1998). Pada penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa *K. gibsonii* juga telah berhasil diisolasi dari feses orang dewasa yang mengalami diare akut. Genus *Kurthia* tidak dianggap sebagai bakteri patogen. *Kurthia* termasuk dalam divisi Firmicutes, ordo Bacillales dan famili Planococcaceae (Shaw dan Keddie, 1993).

KESIMPULAN

Bakteri hasil isolasi dari feses kucing yang tumbuh pada media MRSA yang diidentifikasi secara molekuler menunjukkan sampel PSM1 memiliki kemiripan 99% dengan *Enterococcus faecalis* (MH819482.1), PSM2 memiliki kemiripan 100% dengan *Enterococcus faecalis* (MH779826.1) dan PSM3 memiliki kemiripan 100% dengan *Kurthia gibsonii* (MH619509.1).

DAFTAR PUSTAKA

- Dwidjoseputro. 1990. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Keddie, RM. 1981. *The Prokaryotes: A Handbook tentang Habitat, Isolasi dan Identifikasi Bakteri* (1 ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lawalata, H.J., Sembiring, L., and Rahayu, E.S. 2011. Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Agents from Bakasang, An Indonesian Traditional Fermented Fish Product. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 16 (2): 93-99.
- Misgiyarta dan Widowati. 2005. *Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor.
- Pin C, Baranyi J. 1998. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *Int J Food Microbiol*. 41:59–72.
- Proctor, R. A., C. von Eiff, B. C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, and G. Peters. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol*. 4:295-305.
- Rollins, D. M. dan Joseph, S. W., 2000, *Enterococcus Summary, Pathogenic Microbiology, J Microbiol*. 2:13-28
- Salvado, A. 2006. Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria-a minireview. *African Journal of Biotechnology* 5(9):678-683.
- Shaw, S. and Keddie, R. M. 1983. A numerical taxonomic study of the genus *Kurthia* with revised description of *Kurthia zopfi* and a description of *Kurthia gibsonii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 253-276.
- Wasteson, Y, and Hornes, E. 2009. Pathogenic *Escherichia Coli* Found in Food. *International Journal of Food Microbiology* 12: 103-114
- Ziemer, C.J., and Gibson, G.R (1998). An Overview of Probiotic, Prebiotics and Synbiotic in Functional Food Concept: Perspectives and Future Strategies. *International Dairy Journal*. 8:473-479.