



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI KEANEKARAGAMAN GENETIK BAKTERI DARI
USUS IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) MELALUI TEKNIK
METAGENOM *SEQUENCE-BASED***

SKRIPSI

**ADHITYA BAYU PERDANA
0706263624**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
DESEMBER 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI KEANEKARAGAMAN GENETIK BAKTERI DARI
USUS IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) MELALUI TEKNIK
METAGENOM *SEQUENCE BASED***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ADHITYA BAYU PERDANA
0706263624**

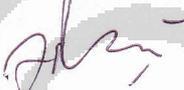
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
DESEMBER 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Adhitya Bayu Perdana

NPM : 0706263624

Tanda Tangan : 

Tanggal : 29 Desember 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Adhitya Bayu Perdana
NPM : 0706263624
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Studi Keanekaragaman Genetik Bakteri dari Usus Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) melalui Teknik Metagenom *Sequence-Based*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Irvan Faizal, M. Eng. (.....)

Pembimbing II : Dr. Abinawanto (.....)

Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....)

Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 29 Desember 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur Penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala nikmat, rahmat dan karuniaNya sehingga Penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI). Begitu banyak bantuan moril dari berbagai pihak dalam membantu kelancaran skripsi ini, sehingga Penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Irvan Faizal, M. Eng. dan Dr. Abinawanto selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing dan memberi saran bagi Penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M. Sc. dan Dr. Anom Bowolaksono, M. Sc. selaku Penguji I dan II, dan Dra. Lestari Rahayu K, M. Sc. selaku Ketua Ujian Sidang, serta Dra. Setiorini, M. Kes. selaku Koordinator Seminar yang telah memberikan saran dan perbaikan kepada Penulis dalam pembuatan skripsi ini.
3. Retno Lestari, M.Si. selaku Pembimbing Akademis yang telah memberikan doa, dukungan, dan saran untuk penulis.
4. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI, dan segenap staf pengajar FMIPA UI atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada Penulis selama menempuh pendidikan di Biologi. Terima kasih pula kepada Mbak Asri, Ibu Ida, Pak Ana, Pak Ono, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas segala bantuan yang telah diberikan.
5. Ir. Nenie Yustiningsih, M. Sc., selaku Direktur Teknologi Produksi Pertanian BPPT yang telah memberikan ijin kepada Penulis untuk melakukan penelitian.

6. Keluarga besar Laboratorium Bioakuakultur, Mbak Tanti, Mbak Novi, Mbak Kiki, Mas Bagus, Mas Yogi, Mas Deni, Pak Wisnu, Pak Ayub, dan Om Rahmat yang telah banyak memberikan masukan dan bantuan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Terima kasih juga kepada rekan kerja laboratorium, Taufiq Soekarno dan Rizky Priambodo yang telah membantu dan memberikan semangat kepada Penulis.
7. Keluarga tercinta, Bapak, Ibu, dan adikku Nurma yang telah membantu secara moril. Terima kasih telah mendoakan dan memberikan perhatian kepada Penulis selama penulisan skripsi ini.
8. Sahabat terbaik Fahreza, Fajar, Nikki, Merry, Putsan, dan teman-teman di Laboratorium Genetika Biologi UI, Maridha, Ikrimah, Fika, Tiwi, serta teman-teman BLOSSOM atas semua dukungan, semangat, perhatian, waktu, pengalaman, dan persaudaraan yang telah diberikan kepada Penulis.
9. Rekan-rekan seperjuangan D'mentor di Youth Take Action (Eja, Bregas, Gita, Pepeb, Tiara, Once) serta adik-adik warga Gedong yang telah memberikan inspirasi dan keberanian untuk bermimpi. Kepengurusan COMATA UI 2010--2011, Sasha, Wei, Sendy, Dedi, Divo, terimakasih atas segala dukungan, doa dan petualangan yang tak akan terlupakan. Serta untuk kepengurusan HIMBIO 2009--2010, CANOPY UI, dan SIGMA B-UI.
10. Seluruh mahasiswa Departemen Biologi FMIPA UI mulai dari Baliveau, Bee05phere, Felix, Biosentris, Zygomorphic, dan B10genesis terima kasih atas persahabatan selama Penulis kuliah di Biologi.

Penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari sempurna, kritik dan saran demi peningkatan kualitas di masa depan sangat diharapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 29 Desember 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Adhitya Bayu Perdana
NPM : 0706263624
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Studi Keanekaragaman Genetik Bakteri Dari Usus Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) melalui Teknik Metagenom *Sequence-Based*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 29 Desember 2011
Yang menyatakan



(Adhitya Bayu Perdana)

ABSTRAK

Nama : Adhitya Bayu Perdana
Program studi : Biologi
Judul : Studi Keanekaragaman Genetik Bakteri Dari Usus Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) melalui Teknik Metagenom *Sequence-Based*

Penelitian untuk mengetahui keanekaragaman genetik bakteri dari usus ikan nila melalui teknik metagenom *sequence-based* telah dilakukan. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA dari usus sebesar 1550 pb, kemudian dilakukan *sequencing* pada isolat dari Kolam Laboratorium PTPP, Serpong (L1, L2); Tambak Ikan Nila Salin, Karawang (Mu, Pu); dan KJA Waduk Cirata, Purwakarta (A1, C1). Identifikasi ke-6 isolat bakteri berdasarkan BLAST menunjukkan bahwa terdapat similaritas terhadap 4 spesies bakteri dengan nilai *max identity* tertinggi. Hasil analisis pohon filogenetik menggunakan metode *neighbor-joining* memperlihatkan bahwa isolat L1, L2 dan C1 diduga berkerabat dekat dengan bakteri *Ochrobactrum anthropi*, isolat A1 diduga berkerabat dekat dengan *Lysinibacillus boronitolerans*, isolat Pu diduga berkerabat dekat dengan *Stenotrophomonas maltophilia*, sementara isolat Mu diduga berkerabat dekat dengan *Cetobacterium somerae*. Berdasarkan hasil yang didapat, maka terbukti bahwa terdapat keanekaragaman gen 16S rRNA dari usus ikan nila yang dianalisis melalui teknik metagenom *sequence-based*.

Kata kunci : Bakteri, gen 16S rRNA, metagenom, usus ikan nila.

xi + 63 halaman; 14 gambar; 8 lampiran; 8 tabel
Daftar Referensi 85 (1970--2012)

ABSTRACT

Name : Adhitya Bayu Perdana
Study Programme : Biology
Title : Genetic Diversity of the Intestinal Bacterial from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) gut with metagenome Sequence-Based Technique

Research to know the genetic diversity of intestinal bacterias in Tilapia gut had been done using sequence-based metagenome. 16S rRNA gene amplification produced PCR fragment with 1550 bp length, then followed by sequencing of isolates from Outdoor Laboratory, Serpong (L1, L2); Saline Tilapia Ponds, Karawang (Mu, Pu); and Cirata Reservoir, Purwakarta (A1, C1). Identification six bacteria isolates based on BLAST showed that there are 4 different species of bacteria with the highest value of max identity. Phylogenetic analysis using neighbor-joining method showed that L1, L2, and C1 isolates is close relatives to *Orchrobacterum anthropi*, while A1 isolates is close relative to *Lysinibacillus boronitolerans*, Pu isolate is having close relationship with *Stenotrophomonas maltophilia*, and Mu isolates with *Cetobacterium somerae*. Thus, based on the results, it is proven that there is 16S rRNA gene diversity from tilapia intestines using metagenome sequence-based method.

Keywords : 16S rRNA gene, bacteria, metagenome, tilapia gut.

xi + 63 pages; 14 pictures; 8 appendixes; 8 tables
Bibliography 85 (1970--2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Metagenom	4
2.2 Gen 16S rRNA	6
2.3 Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	7
2.4 Keanekaragaman Bakteri Pada Usus Ikan Nila	8
2.5 Teknik Biologi Molekular	9
2.5.1 Isolasi DNA genom dari sampel jaringan	9
2.5.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	10
2.5.3 Elektrofesis	11
2.5.4 Pengklonaan DNA rekombinan.....	11
2.5.4.1 Plasmid sebagai vektor pengklonaan.....	11
2.5.4.2 Transformasi	13
2.5.4.3 Penapisan.....	13
2.5.5 <i>Sequencing</i>	14
2.6 BLAST	15
2.7 Analisis Filogenetik	15
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	17
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	17
3.2 Alat	17
3.3 Bahan	18
3.3.1 Sampel.....	18
3.3.2 Sel kompeten.....	18
3.3.3 Primer	18
3.3.4 Bahan kimia dan bahan habis pakai.....	19
3.4 Perangkat Lunak	19

3.5 Cara Kerja	20
3.5.1 Pembuatan larutan <i>buffer</i>	20
3.5.2 Preparasi sampel	20
3.5.3 Isolasi gen 16s rRNA dengan Terra PCR <i>Direct Kit</i> <i>Polymerase</i>	21
3.5.4 Perhitungan kemurnian dan konsentrasi DNA	21
3.5.5 PCR gen 16S rRNA	22
3.5.6 Elektroforesis	23
3.5.7 Purifikasi gel agarosa	24
3.5.8 Pembuatan sel kompeten	24
3.5.9 Ligasi	25
3.5.10 Transformasi	26
3.5.11 Isolasi DNA rekombinan	26
3.5.12 PCR <i>cycle sequencing</i>	27
3.5.13 Purifikasi PCR <i>cycle sequencing</i>	28
3.5.14 <i>Sequencing</i>	28
3.5.15 Analisis data <i>sequence</i>	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Hasil	30
4.1.1 Isolasi usus ikan nila.....	30
4.1.2 Isolasi dan amplifikasi gen 16S rRNA.....	30
4.1.3 Purifikasi produk PCR.....	31
4.1.4 Transformasi gen 16S rRNA.....	33
4.1.5 Verifikasi penyisipan gen 16S rRNA.....	33
4.1.6 Isolasi DNA rekombinan	34
4.1.7 Hasil DNA <i>sequencing</i>	36
4.2 Pembahasan	38
4.2.1 Analisis isolasi usus ikan nila	38
4.2.2. Amplifikasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan metode PCR <i>Direct Kit Polymerase Mix</i> ...	38
4.2.3 Analisis hasil purifikasi gen 16S rRNA.....	39
4.2.4 Analisis hasil transformasi gen 16s rRNA.....	39
4.2.5 Analisis hasil isolasi DNA rekombinan	40
4.2.6 Analisis identifikasi bakteri dalam usus ikan nila berdasarkan gen 16S rRNA.....	41
4.2.7 Analisis filogeni bakteri dalam usus ikan nila.....	45
5. KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran	47
DAFTAR REFERENSI	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Skema teknik metagenom.....	5
Gambar 2.2(1).	Segmen ribosomal RNA	6
Gambar 2.2(2).	Skema gen 16S rRNA	7
Gambar 2.3.	Ikan nila	7
Gambar 2.5.4.1	Struktur vektor pGEM-T <i>easy</i>	12
Gambar 3.5.	Skema kerja penelitian	20
Gambar 4.1.1.	Isolasi usus ikan nila.....	30
Gambar 4.1.2	Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA.....	31
Gambar 4.1.3.	Visualisasi hasil purifikasi gen 16S rRNA.....	32
Gambar 4.1.5.	Hasil verifikasi gen 16S rRNA.....	33
Gambar 4.1.6(1).	Kultur cair koloni pGEM-T <i>easy</i>	34
Gambar 4.1.6(2).	Visualisasi isolasi DNA rekombinan.....	35
Gambar 4.1.6(3).	Visualisasi verifikasi sisipan gen 16S rRNA.....	35
Gambar 4.1.7.	Pohon filogenetik	37

DAFTAR TABEL

Tabel 4.3.3	<i>Sequence</i> primer gen 16S rRNA	18
Tabel 3.5.3	Komposisi campuran PCR <i>Direct Kit Polymerase</i>	21
Tabel 3.5.5(1)	Komposisi campuran PCR verifikasi hasil klon.....	22
Tabel 3.5.5(2)	Program amplifikasi PCR gen 16S rRNA	23
Tabel 3.5.9.	Komposisi reaksi ligasi	25
Tabel 4.1.3	Kuantifikasi hasil purifikasi gen 16S rRNA.....	32
Tabel 4.1.4	Hasil efisiensi transformasi gen 16S rRNA.....	33
Tabel 4.1.7	Hasil identifikasi klon bakteri usus ikan nila.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pembuatan larutan <i>buffer</i> dan medium	56
Lampiran 2	Data morfologi ikan nila dari 3 lokasi.....	58
Lampiran 3	Perhitungan efisiensi transformasi.....	59
Lampiran 4	Hasil <i>alignment</i> sampel dengan ClustalX 1.83.....	59
Lampiran 5	Elektroferogram isolat L1,L2,A1,C1,Mu,Pu.....	60
Lampiran 6	Homologi isolat L1 dengan data GenBank.....	61
Lampiran 7	Deskripsi lokasi pengambilan sampel.....	62
Lampiran 8	Koloni hasil transformasi gen 16S rRNA.....	63

BAB 1 PENDAHULUAN

Ikan nila, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) merupakan ikan yang berasal dari benua Afrika yang diintroduksi ke Indonesia pada tahun 1969 oleh Balai Besar Penelitian Perikanan Air Tawar (BBPPAT) (Prihatman 2000: 1--2). Meskipun hasil introduksi, namun ikan nila memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan barunya (Uddin 2007: 5). Berdasarkan survei pendahuluan yang dilakukan oleh Badan Pengkajian dan Penerapan Bioteknologi (BPPT) pada tahun 2010 di Waduk Cirata, Jawa Barat, menunjukkan bahwa ikan-ikan dalam suatu kolam yang dicampur dengan ikan nila lebih segar dan sehat, dibandingkan dengan ikan-ikan di kolam lain yang tidak bercampur dengan ikan nila. Data lain yang diperoleh dari Loka Riset Perikanan Air Tawar (Loriskanwar) Sukamandi, Subang, memperlihatkan bahwa ikan nila jarang terkena penyakit walaupun ikan jenis lain yang terdapat pada kolam yang sama terserang penyakit (Fatimah 2005: 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa ikan nila memiliki daya adaptasi yang tinggi.

Daya adaptasi yang tinggi dari ikan nila tidak hanya ditentukan oleh kondisi lingkungan, tetapi juga oleh kualitas pakan dan sistem saluran pencernaannya (Sugita *dkk.* 1983: 1387). Faktor fisiologi pencernaan merupakan faktor yang memegang peranan penting untuk menjaga pertahanan tubuh dan memacu pertumbuhan ikan nila (Haetami *dkk.* 2008: 1). Menurut Wiadnya *dkk.* (2000: 62), kondisi internal ikan nila yang baik disebabkan oleh kemampuan ikan tersebut dalam mencerna pakan yang metabolismenya dibantu oleh bakteri. Bakteri di saluran pencernaan tidak hanya berpartisipasi dalam proses pencernaan, namun dapat berperan dalam perlindungan terhadap penyakit (Hooper *dkk.* 2002: 283).

Ikan nila termasuk ikan omnivora dengan organ pencernaan lengkap yang juga berfungsi sebagai habitat dari bakteri yang hidup di dalamnya. Salah satu bagian dari organ pencernaan adalah usus. Usus merupakan segmen yang terpanjang dari saluran pencernaan ikan (Affandi *dkk.* 2004: 29). Menurut Leano *dkk.* (2005: 1581), jumlah mikroorganisme yang ditemukan dalam usus ikan nila lebih tinggi dibandingkan dengan insang, lendir pada sisik dan lingkungan perairan sekitarnya.

Ikan dengan jumlah bakteri flora normal berlimpah dan beragam akan memiliki peluang besar dalam mengasimilasi makanan lebih baik, sehingga meningkatkan daya adaptasi dari ikan nila (Al Harbi & Uddin 2005: 567).

Di antara banyaknya bakteri yang terkandung dalam usus, terdapat bakteri yang berfungsi sebagai probiotik. Probiotik adalah suatu suplemen yang berasal dari bakteri hidup yang bermanfaat bagi tubuh inang tanpa merusak jaringan inang. Probiotik dikatakan bermanfaat karena memiliki kemampuan untuk menyeimbangkan bakteri yang terdapat di dalam usus, sehingga berperan penting untuk kesehatan (Sahu *dkk.* 2008: 300). Menurut Hoar *dkk.* (1979: 22) enzim yang berasal dari bakteri saluran pencernaan ikan sangat berpengaruh dalam membantu proses metabolisme pencernaan pakan. Ikan nila sebagai salah satu ikan yang memiliki sistem pencernaan yang cukup baik, memungkinkan terdapatnya bakteri potensial di dalam ususnya. Hal tersebut yang membuat ikan nila dijadikan suatu objek dalam penelitian untuk menganalisis bakteri yang terdapat pada usus.

Penelitian mengenai spesies-spesies bakteri yang berasal dari usus ikan nila telah dilakukan sebelumnya, namun di Indonesia masih sangat terbatas. Penelitian melalui kultur konvensional yang pernah dilakukan oleh Fatimah (2005: 1), hanya mendapatkan beberapa bakteri genus bakteri proteolitik yang mampu menghasilkan enzim protease. Hal tersebut disebabkan tidak semua bakteri dalam usus ikan nila dapat dianalisis berdasarkan metode kultur konvensional (Tapia-Paniagua *dkk.* 2010: 310). Beberapa faktor penghambat yang menyebabkan sebagian besar bakteri tidak dapat dikultur adalah kondisi suhu yang kurang sesuai, keterbatasan nutrisi, akumulasi produk metabolisme yang bersifat racun, dan faktor penghambat lain yang mengakibatkan metode kultur sulit dilakukan untuk mengetahui keseluruhan komunitas bakteri dalam suatu habitat tertentu (Handelsman 2004: 671).

Satu-satunya teknik untuk mengetahui keanekaragaman bakteri yang tidak dapat dikultur (*unculturable*) yaitu dengan menggunakan teknik metagenom. Teknik metagenom memungkinkan ekstraksi DNA secara langsung dari lingkungan untuk dianalisis keanekaragaman spesies maupun fungsinya (Streit & Schmitz 2004: 492). Keunggulan dari teknik tersebut adalah materi DNA bakteri yang terdapat di lingkungan dapat langsung diekstraksi tanpa melalui proses penumbuhan pada medium buatan terlebih dahulu (Lorenz & Schleper 2002: 14).

Teknik metagenom memiliki dua pendekatan analisis tergantung dari tujuan yang diinginkan, yaitu secara *function-based* dan *sequence-based* (Schmeisser *dkk.* 2007: 956). Metode *function-based* adalah analisis metagenom berdasarkan fungsi dari genom suatu organisme, yang memiliki tujuan mencari gen baru penghasil enzim tanpa mengetahui jenis organismenya terlebih dahulu. Sedangkan metode *sequence-based* adalah analisis metagenom berdasarkan urutan basanya yang digunakan untuk melihat keanekaragaman spesies dan kekerabatan bakteri (Yun & Ryu 2005: 1--2). Teknik metagenom *sequence-based* digunakan karena selain akan memberikan informasi genetik dari mikroorganisme, namun juga berguna untuk mempelajari produk gen seperti enzim, antibiotik, maupun probiotik (Singh *dkk.* 2008: 221).

Metode *sequence-based* menggunakan gen 16S rRNA sebagai dasar melihat keanekaragaman bakteri dalam suatu habitat (Yun & Ryu 2005: 1--2). Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler, karena molekul tersebut bersifat universal dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme prokariot. Analisis gen penyandi 16S rRNA lebih mudah untuk definisi spesies dan keanekaragamannya, sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal untuk seluruh kelompok bakteri. Berdasarkan hasil amplifikasi gen 16S rRNA, maka akan dapat diketahui spesies bakteri yang terdapat di dalam usus ikan nila (Pangastuti 2006: 293).

Informasi mengenai spesies bakteri yang terkait dengan budidaya ikan nila merupakan data yang penting bagi pengembangan industri perikanan di Indonesia, sehingga penelitian tentang keanekaragaman bakteri dari dalam usus ikan nila melalui teknik metagenom perlu dilakukan. Penelitian bertujuan untuk mendeskripsikan keanekaragaman bakteri yang terdapat dalam usus ikan nila melalui teknik metagenom *sequence-based* berdasarkan *sequencing* gen 16S rRNA. Hasil dari studi tersebut dapat dijadikan sebagai pustaka genom bakteri yang berguna sebagai data awal dalam pengkajian potensi bakteri dan pengembangan tindakan pencegahan terhadap penyakit yang disebabkan oleh bakteri-bakteri patogen yang terdapat pada usus ikan nila.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Metagenom

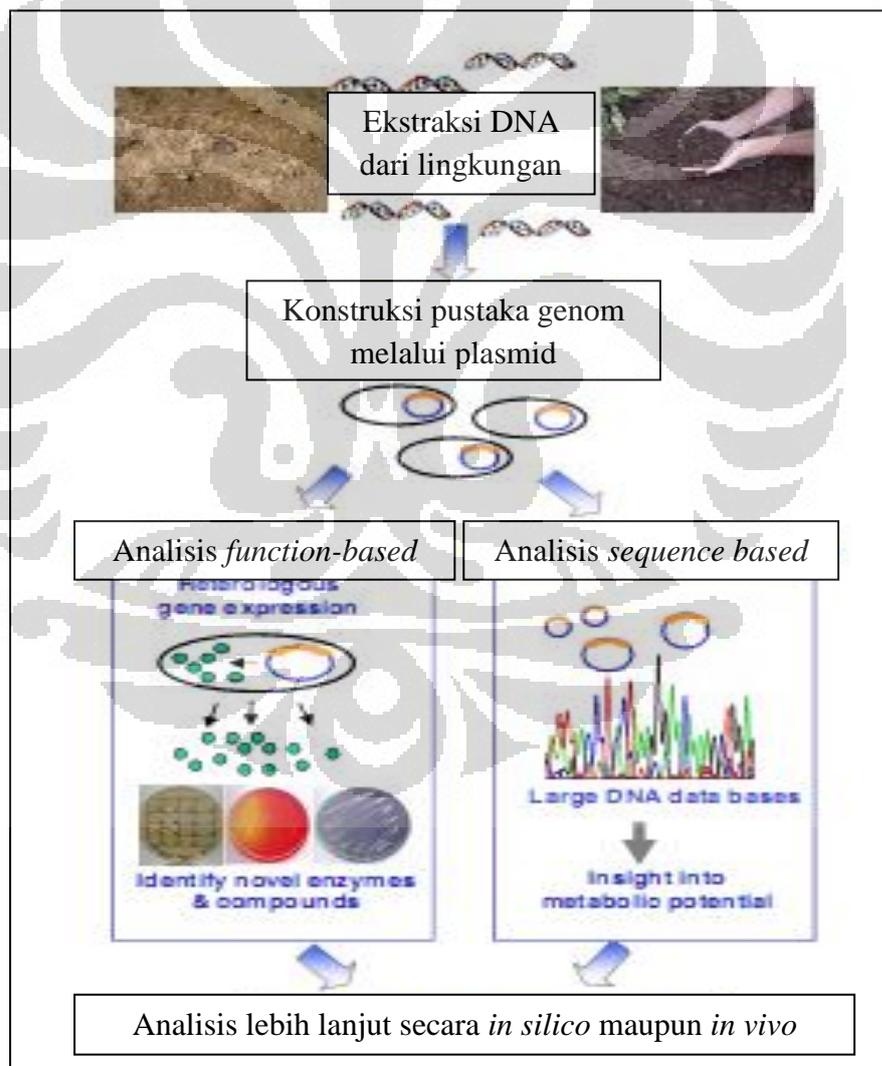
Metagenom merupakan suatu teknik yang secara khusus ditujukan untuk mengumpulkan gen-gen secara langsung dari suatu lingkungan, diikuti dengan menganalisis informasi genetika yang terkandung di dalamnya (Riesenfeld *dkk.* 2004: 525). DNA genom dari lingkungan yang diperoleh kemudian diklonasi, dikonstruksi pustaka genomnya, lalu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari enzim baru (Lorenz & Schleper 2002: 13 & 15). Teknik tersebut merupakan sebuah teknik yang mengkombinasikan beberapa metode dan bidang ilmu, seperti genetika, mikrobiologi, dan bioinformatika. Berbeda dengan teknik analisis genom bakteri pada umumnya, teknik metagenom dilakukan dengan langsung mengekstraksi DNA genom dari lingkungan dan tidak memerlukan proses pengkulturan bakteri pada medium buatan (Handelsman 2007: 3).

Total jumlah sel prokariotik bakteri di bumi diperkirakan mencapai $4\text{--}6 \times 10^{30}$, dengan mayoritas yang masih belum diidentifikasi (Whitman *dkk.* 1998: 6578). Teknik metagenom dapat digunakan untuk mempelajari bakteri yang tidak dapat dikultur yang diperkirakan terdapat lebih dari 99 % dari populasi bakteri di seluruh lingkungan. Keanekaragaman tersebut merepresentasikan kumpulan gen yang luas yang dapat digunakan untuk menemukan gen baru yang memiliki fungsi spesifik (Cowan *dkk.* 2005: 321).

Metagenom memiliki dua pendekatan tergantung dari tujuan yang diinginkan, yaitu *function-based* dan *sequence-based* (Gambar 2.1). Analisis metagenom secara *function-based* dilakukan dengan cara mengkonstruksi klon yang berisi DNA genom, yang selanjutnya dilakukan penapisan dari klon tersebut untuk ekspresi dari fenotip yang diinginkan. Klon DNA metagenom langsung diberi perlakuan kimiawi untuk melihat ada tidaknya aktifitas enzim tertentu. Keunggulan dari analisis tersebut adalah akan diperoleh keseluruhan gen fungsional yang mengkode ekspresi dari suatu fungsi yang diinginkan (Yun & Ryu 2005: 1--2).

Pendekatan secara *function-based* telah berhasil mengidentifikasi antibiotik baru, enzim protease, dan lipase (Culligan *dkk.* 2009: 8).

Analisis metagenom yang kedua adalah dengan pendekatan *sequence-based*. *Sequence-based* merupakan metode metagenom yang digunakan untuk melihat kekerabatan mikroorganisme yang dianalisis melalui pendekatan bioinformatika. Klon DNA metagenom dilihat urutan basanya, kemudian disusun menjadi pohon filogeni. Pendekatan tersebut melibatkan penggunaan mesin PCR dan primer-primer spesifik untuk mengisolasi dan memperbanyak suatu daerah target pada DNA genomik. Produk-produk PCR inilah yang digunakan untuk konstruksi pustaka genom (Uria *dkk.* 2005: 24).

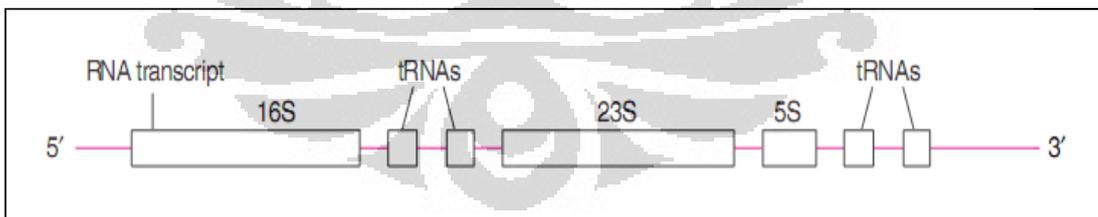


Gambar 2.1. Skema teknik metagenom
[Sumber: Schmeisser *dkk.* 2007: 957.]

2.2 Gen 16S rRNA

Ribosomal RNA adalah RNA yang terdapat pada ribosom yang berperan dalam sintesis protein (Clarridge 2004: 841). Di antara berbagai makromolekul di dalam sel, molekul rRNA dipertimbangkan sebagai indikator yang tepat untuk memprediksi evolusi dan identitas suatu organisme prokariot. Hal tersebut dikarenakan beberapa faktor, yaitu informasi genetika pada rRNA memiliki laju mutasi yang sangat lambat dan terdistribusi secara universal pada setiap organisme. Selain itu rRNA bersifat homolog, dan urutan basa nukleotida di antara molekul-molekul rRNA dapat dibandingkan dengan tepat, sehingga memudahkan untuk mengidentifikasi keanekaragamannya (Madigan *dkk.* 2010: 35).

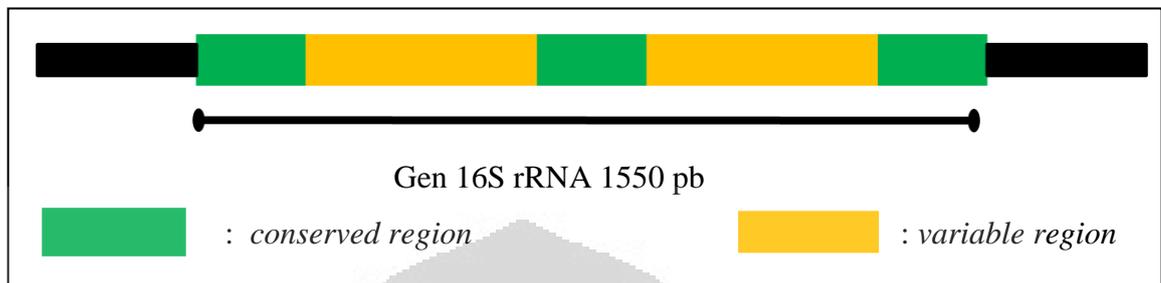
Pada organisme prokariotik, terdapat tiga macam rRNA, yaitu 23S rRNA (S=Svedberg units; 2900 nukleotida), 16S rRNA (1550 nukleotida), dan 5S rRNA (120 nukleotida) (Gambar 2.2(1)). Di antara ketiga molekul rRNA tersebut, 16S rRNA yang paling umum digunakan. Molekul 16S rRNA memiliki informasi genetik yang cukup banyak dan lebih mudah dianalisis. Molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang, sehingga menyulitkan analisis, sedangkan molekul 5S rRNA memiliki urutan basa yang terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika (Madigan *dkk.* 2010: 35). Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem (Pangastuti 2006: 293).



Gambar 2.2(1). Segmen ribosomal RNA
[Sumber: Tamarin 2002: 257].

Gen 16S rRNA disebut penanda sejarah evolusi yang baik (Jung-Hoon *dkk.* 1997: 904). Hal tersebut karena gen 16S rRNA memiliki fungsi yang konstan, terdapat *conserved region*, *variable region*, dan bersifat universal (pada bakteri). Letak *conserved region* gen 16S rRNA adalah pada bagian awal gen (contoh: posisi

basa 9--27), daerah tengah (contoh: posisi basa 515--531, 519--536), dan bagian akhir (contoh: 1524--1541), sedangkan sisanya adalah *variable region* (Gambar 2.2(2).) (Clarridge 2004: 842).



Gambar 2.2(2). Skema gen 16s rRNA
[Sumber: Diolah kembali dari Clarridge 2004: 842.]

2.3 Ikan Nila, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).

Taksonomi ikan nila menurut *Integrated Taxonomy International System* (2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Famili : Cichlidae
Genus : *Oreochromis*
Spesies : *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).



Gambar 2.3. Ikan nila
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Ikan nila merupakan ikan yang berasal dari benua Afrika dan baru pada tahun 1969 bibit ikan nila secara resmi didatangkan ke Indonesia oleh Balai Besar Penelitian Perikanan Air Tawar (BBPPAT). Saat ini, ikan nila telah tersebar ke negara beriklim tropis dan subtropis, sedangkan pada wilayah beriklim dingin tidak dapat hidup dengan baik (DKPD Sulteng 2010: 2; Uddin 2007: 5). Pembudidayaan ikan nila umumnya dilakukan di kolam, danau, atau sungai (Prihatman 2003: 1--2).

Industri perikanan menjadikan ikan nila sebagai salah satu komoditas unggul, karena memiliki tekstur daging yang lembut, masa memijah relatif cepat dan memiliki kandungan protein yang tinggi, sehingga banyak diminati oleh masyarakat (Prihatman 2000: 2--3). Apabila dipelihara di tambak akan lebih kenyal, rasanya lebih gurih, dan tidak berbau lumpur. Oleh karena itu, ikan nila layak untuk digunakan sebagai bahan baku dalam industri fillet dan bentuk-bentuk olahan lain (DKPD Sulteng 2010: 2).

Ikan nila memiliki morfologi tubuh memanjang, pipih ke samping dengan warna putih kehitaman. Ikan tersebut tergolong ke dalam ikan omnivora yang mengkonsumsi bahan protein yang lebih sedikit dibandingkan ikan predator. Pada umumnya usus ikan omnivora lebih panjang daripada usus ikan karnivora. Oleh karena itu, kemungkinan ditemukannya bakteri flora normal lebih besar (Fatimah 2005: 1).

2.4 Keanekaragaman Bakteri Pada Usus Ikan Nila

Bakteri merupakan mikroorganisme bersel satu, tidak berklorofil, berkembang biak dengan membelah diri, dan ukurannya sangat kecil. Bakteri termasuk ke dalam golongan prokariot dengan dinding sel yang kompleks. Di sebelah luar dinding sel terdapat selubung atau kapsul. Di dalam bakteri tidak terdapat membran dalam (endomembran) dan organel bermembran seperti kloroplas dan mitokondria (Dwidjoseputro 2005: 22; Irianto 2006: 34).

Lingkungan mengandung beranekaragam bakteri dalam jumlah yang berbeda-beda. Keadaan lingkungan menentukan jumlah dan spesies bakteri yang dominan di lingkungan tersebut (Gandjar *dkk.* 1992: 17). Salah satu lingkungan yang menjadi habitat bakteri adalah saluran pencernaan ikan. Saluran pencernaan adalah tabung khusus yang terbagi menjadi beberapa bagian yang memanjang dari bibir hingga anus

yang meliputi lambung, usus kecil dan usus besar. Fungsi utama saluran pencernaan adalah mengubah makanan menjadi komponen yang dapat dicerna dan diserap oleh tubuh, dan dalam proses metabolismenya bersimbiosis dengan bakteri (Zoetendal *dkk.* 2004: 31). Leano *dkk.* (2005: 1581) menyatakan bahwa jumlah bakteri yang ditemukan dalam saluran pencernaan ikan lebih tinggi dibandingkan dengan lingkungan perairan sekitarnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa saluran pencernaan ikan menyediakan habitat yang menguntungkan bagi bakteri.

Ikan nila telah banyak dijadikan sebagai objek penelitian karena potensinya yang cukup besar dalam bidang industri perikanan. Keberadaan bakteri dalam usus ikan nila telah dipelajari sebelumnya oleh beberapa peneliti. Fatimah (2005: 7) dalam penelitiannya menyatakan bahwa dengan metode kultur konvensional didapatkan beberapa genus bakteri yang memiliki potensi sebagai bakteri proteolitik, diantaranya adalah dari genus *Aeromonas* dan *Enterobacter*. Al-Harbi & Uddin (2005: 566) menyebutkan pada penelitiannya bahwa terdapat 19 spesies bakteri yang berhasil diidentifikasi dari perairan payau di Arab Saudi menggunakan kultur konvensional, dimana sebagian besar ditemukan di usus. Bakteri tersebut di antaranya adalah berasal dari genus *Vibrio*, *Streptococcus*, dan *Chryseomonas*.

2.5 Teknik-teknik Biologi Molekular

2.5.1 Isolasi DNA genom dari sampel jaringan.

Deoxiribonucleic acid (DNA) genom adalah satu set lengkap atau keseluruhan informasi genetik yang terdapat pada suatu organisme. Untuk dapat mengetahui informasi yang terdapat pada DNA, maka DNA harus diisolasi terlebih dahulu. Isolasi DNA merupakan tahap penting dalam setiap penelitian, yang bertujuan untuk memisahkan molekul DNA dari molekul lain, seperti dinding sel, membran sel, dan membran inti sehingga dapat dilihat strukturnya (Weaver & Hedrick 1997: 616).

Isolasi DNA genom diperlukan untuk memperoleh gen 16S rRNA yang terkandung pada sampel usus. Isolasi DNA pada dasarnya memiliki beberapa tahapan utama, yaitu penghancuran sel, penghilangan protein, penghilangan RNA, serta pemurnian DNA. Penghancuran sel pada umumnya dilakukan dengan memanfaatkan

beberapa senyawa kimia seperti *ethylene diaminetetraacetic* (EDTA) atau *sodium dodecyl sulfate* (SDS). Protein dapat dihilangkan dengan menggunakan *phenol-chloroform*, sedangkan untuk RNA dapat digunakan enzim RNase. Tahapan terakhir yaitu pemurnian DNA dapat dilakukan dengan etanol absolut untuk memisahkan DNA dan etanol 70% untuk membersihkan DNA (Muladno 2002: 19).

2.5.2 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik perbanyakan (amplifikasi) *sequence* DNA kopi tunggal secara *in vitro* yang berlangsung secara cepat, dengan menggunakan DNA polimerase (Sambrook & Russell 2001b: 8.4). Prinsip metode PCR adalah amplifikasi segmen DNA spesifik menggunakan pelekatan dua primer yang komplementer dengan *sequence* khusus gen target. Kedua primer tersebut berlekatan dengan untai DNA target, sehingga memungkinkan DNA polimerase untuk melakukan elongasi *sequence* DNA tersebut. Hasil dari setiap siklus menunjukkan peningkatan eksponensial dari keseluruhan jumlah kopi yang disintesis (Agrawal 2008: 55).

Teknik PCR memerlukan beberapa komponen, yaitu DNA polimerase yang dapat mengamplifikasi untai baru DNA, dua primer oligonukleotida, kation bivalen (biasanya $MgCl_2$) sebagai aktivator DNA polimerase dan membantu dalam proses *annealing*, *buffer* PCR untuk menjaga kestabilan pH, kation monovalen dalam *buffer* PCR, dan cetakan DNA yang mengandung *sequence* target untuk diamplifikasi (Sambrook & Russell 2001: 8.4--8.6; Agrawal 2008: 58--59).

Proses PCR terdiri atas tiga tahapan, yaitu denaturasi, *annealing*, dan elongasi. Denaturasi terjadi pada suhu 90--94 °C, untai ganda DNA berpisah menjadi untai tunggal, dan seluruh aktivitas enzimatis berhenti (misalnya: pemanjangan dari siklus sebelumnya). Tahap *annealing* ditandai dengan pelekatan primer ke *sequence* komplementer pada kedua sisi *sequence* target, pada suhu 50--65 °C. Suhu *annealing* yang baik adalah 5--10 °C di bawah nilai T_m amplifikasi primer. Elongasi merupakan tahap pemanjangan untai DNA baru yang dimulai oleh pemanjangan primer dengan bantuan DNA polimerase, yaitu *Taq DNA polymerase*, dari arah 5' ke 3' yang terjadi pada suhu 72 °C (Klug & Cummings 1994: 402; Agrawal 2008: 56--58).

2.5.3 Elektroforesis

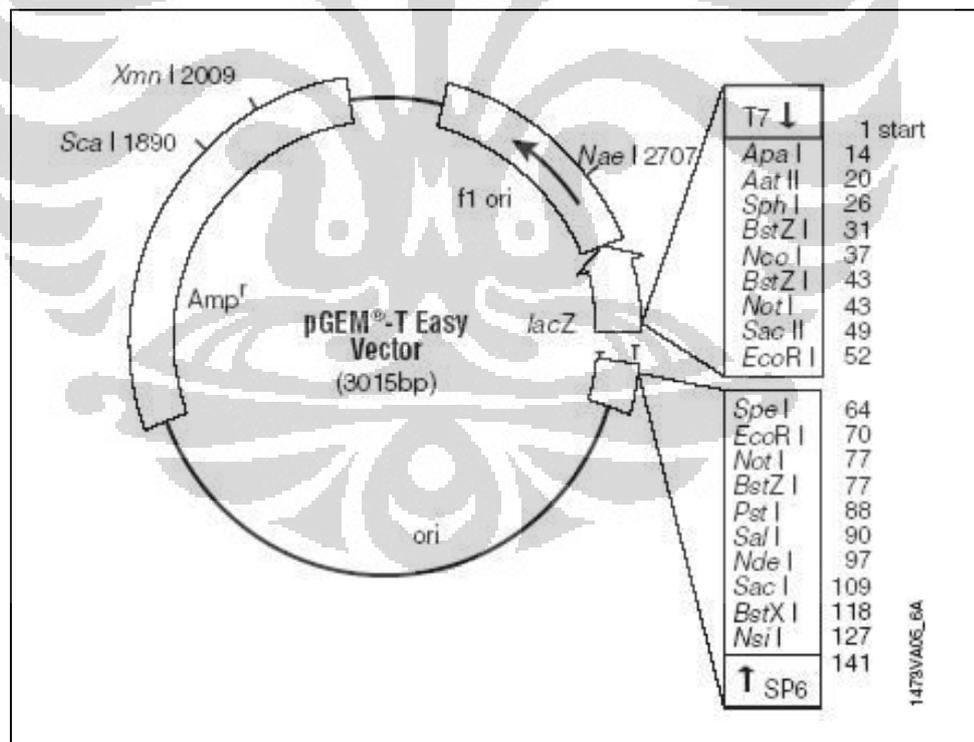
Elektroforesis adalah teknik pengukuran laju migrasi molekul bermuatan pada medium padat di dalam medium cair berarus listrik. Elektroforesis digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnifikasi fragmen DNA. Kecepatan migrasi suatu partikel dipengaruhi oleh muatan listrik dan bentuk partikel. Molekul DNA bermuatan negatif karena memiliki gugus fosfat, sehingga molekul DNA akan bermigrasi ke elektroda positif. Lokasi fragmen DNA dapat diidentifikasi dengan mudah karena adanya *low concentration fluorescent intercalating dyes*, seperti etidium bromida atau SYBR Gold. Pita DNA yang berikatan dengan perwarna tersebut dapat berpendar di bawah sinar UV. Medium padat yang digunakan dalam elektroforesis adalah gel agarosa dan gel poliakrilamid. Fragmen DNA dari ukuran 50 pb hingga 1 mb dapat dipisahkan dengan gel agarosa (Klug & Cummings 1994: A-6; Sambrook & Russell 2001a: 5.2).

2.5.4 Pengklonaan DNA rekombinan

2.5.4.1 Plasmid sebagai vektor pengklonaan

Bakteri memiliki kromosom tambahan yang disebut plasmid. Plasmid umumnya berbentuk DNA sirkular utas ganda. Replikasi plasmid tidak diatur oleh kromosom, karena plasmid memiliki situs ori (*origin of replication*) yang menyebabkan plasmid dapat bereplikasi secara mandiri. Plasmid digunakan dalam bidang biologi molekuler, salah satunya berperan sebagai vektor pada proses pengklonaan (Snyder & Champness 1997: 105). Vektor adalah molekul DNA yang dapat membawa DNA asing ke dalam sel inang dan bereplikasi di dalam sel inang (Campbell *dkk.* 2002: 392). Molekul DNA yang berperan sebagai vektor harus memiliki beberapa syarat seperti memiliki penanda awal replikasi (*origin of replication/ori*), gen penanda seleksi (umumnya berupa gen resistan pada antibiotik), dan situs pengenalan restriksi yang unik (*multiple cloning sites/MCS*). Vektor dapat berupa plasmid, *bakteriophage*, fagemid, kosmid, *yeast artificial chromosomes*, dan *bacterial artificial chromosomes* (Snustad & Simmons 2003: 486).

Vektor kloning yang digunakan untuk studi metagenom adalah vektor plasmid pGEM-T *easy*. Vektor pGEM-T *easy* merupakan vektor pengklonaan yang memiliki promotor T7 dan SP6 RNA polimerase yang mengapit daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) di dalam α -peptida yang mengode enzim β -galaktosidase. DNA sisipan yang tersisip pada daerah tersebut akan menginaktivasi pembentukan enzim β -galaktosidase. Hal tersebut menjadikan hasil klon akan dapat diseleksi pada medium penapisan. Vektor pGEM-T *easy* juga memiliki situs pengikatan primer M13 *forward* dan *reverse* yang dapat digunakan pada saat proses *sequencing*. Beberapa situs restriksi juga terdapat pada vektor pGEM-T *easy*. Vektor pGEM-T *easy* juga didesain untuk memudahkan verifikasi plasmid rekombinan melalui proses digesti menggunakan suatu enzim restriksi. Enzim restriksi seperti *EcoRI* dan *NotI* merupakan contoh enzim restriksi yang dapat digunakan dalam proses digesti menggunakan satu enzim restriksi untuk melepaskan DNA sisipan pada vektor pGEM-T *easy* (Gambar 2.5.4.1) (Promega 2010: 9).



Gambar 2.5.4.1. Struktur vektor pGEM-T *easy*
[Sumber: Promega 2010: 9.]

2.5.4.2 Transformasi

Pengklonaan adalah proses penggabungan gen target dengan DNA bakteri (plasmid). Molekul rekombinan masuk ke dalam sel bakteri melalui peristiwa transformasi. Transformasi adalah proses introduksi DNA asing ke dalam sel inang. Suatu DNA asing dapat lebih mudah diintroduksi ke dalam sel bakteri apabila sel bakteri tersebut telah diberi perlakuan CaCl_2 atau kombinasi garam lainnya. Sel bakteri yang telah diberi perlakuan tersebut dinamakan sel kompeten (Wong 1997: 133).

Penggunaan larutan CaCl_2 yang diberikan dapat menyebabkan DNA menempel pada membran luar sel inang karena kation bivalen Ca^{2+} berikatan dengan membran fosfolipid pada sel inang. Ca^{2+} mengubah membran fosfolipid menjadi bermuatan positif, sehingga DNA yang bermuatan negatif dapat tertarik ke permukaan membran sel. Kejutkan panas (*heat shock*) menyebabkan pori-pori membran luar sel kompeten merenggang, sehingga DNA dapat masuk ke dalam sel kompeten (Wong 1997: 133--134).

2.5.4.3 Penapisan

Penapisan (*screening*) adalah proses identifikasi sel bakteri yang memiliki DNA rekombinan dengan yang tidak membawa DNA rekombinan. Penapisan dilakukan dengan cara menginaktivasi kerja dari marka genetik. Inaktivasi marka genetik terjadi karena adanya sisipan gen target pada vektor (*insertional inactivation*). Marka genetik meliputi gen resistan antibiotik, marka histokimia yang memberikan warna pada koloni dengan DNA rekombinan, dan marka nutrisi yang memungkinkan koloni dengan DNA rekombinan tumbuh pada medium yang tidak mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh sel inang (Brown 1999: 53; Strachan & Read 1999: 81).

Dua marka genetik yang umum digunakan adalah gen resistan antibiotik dan gen *lacZ* (*β -galaktosidase gene complementation*). Gen resistan antibiotik pada plasmid membuat sel inang yang memiliki DNA rekombinan dapat tumbuh pada medium yang mengandung antibiotik. Marka genetik, gen *lacZ* membuat koloni sel

inang yang memiliki DNA rekombinan akan berwarna putih pada medium yang mengandung X-gal, sedangkan yang tidak memiliki DNA rekombinan akan berwarna biru (Strachan & Read 1999: 81).

2.5.5 Sequencing

Sequencing DNA adalah suatu proses untuk menentukan susunan basa (A, T, G, dan C) yang membentuk DNA. *Sequencing* DNA pada umumnya menggunakan primer untuk mengawali sintesis DNA. Primer tersebut menentukan titik awal sintesis dan arah reaksi *sequence* DNA (Muladno 2002: 68). Metode *sequencing* yang umumnya digunakan, yaitu metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert merupakan metode *sequencing* yang menggunakan bahan kimia spesifik untuk memotong untai fragmen DNA target, sedangkan metode Sanger menggunakan enzim DNA polimerase untuk membentuk salinan komplementer dari fragmen DNA target (Sambrook *dkk.* 1989: 13.7 & 3.11).

Sebagian besar proses *Sequencing* telah dimodifikasi menjadi suatu program pada komputer, sehingga dikenal sebagai *automated DNA sequencing*. Proses tersebut merupakan modifikasi dari metode Sanger yang diawali oleh tahap *cycle sequencing*. *Cycle sequencing* adalah metode amplifikasi DNA menggunakan satu jenis primer dan dua jenis nukleotida yaitu deoksinukleosida trifosfat (dNTP) dan dideoksinukleosida trifosfat (ddNTP). Pelekatan ddNTP pada *sequence* DNA hasil amplifikasi akan menyebabkan proses amplifikasi terhenti akibat hilangnya gugus oksida pada untai 3' sehingga enzim DNA polimerase tidak dapat menempelkan dNTP pada basa berikutnya. Proses amplifikasi DNA pada akhirnya akan menghasilkan fragmen yang berbeda-beda ukurannya yang basa terakhirnya merupakan ddNTP. *Automated DNA sequencing* menggunakan ddNTP yang diberi pewarna berfluoresens. Pada saat produk hasil *cycle sequencing* dijalankan pada mesin *sequencing*, maka sinar laser yang mengenai ddNTP akan berfluoresensi dan dibaca oleh detektor yang terhubung dengan komputer dan menghasilkan grafik elektroferogram (Griffiths *dkk.* 1996: 446).

2.6 Program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

Basic local alignment search tool (BLAST) merupakan program dari NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) yang digunakan untuk mencari similaritas suatu *sequence* nukleotida atau protein (*query sequence*) dengan *sequence* database (*subject sequence*) pada *Genbank*. Similaritas tersebut dapat digunakan untuk mengetahui fungsi dari suatu gen, memperkirakan anggota baru dari suatu famili gen, dan mengetahui hubungan kekerabatan (NCBI 2011: 1).

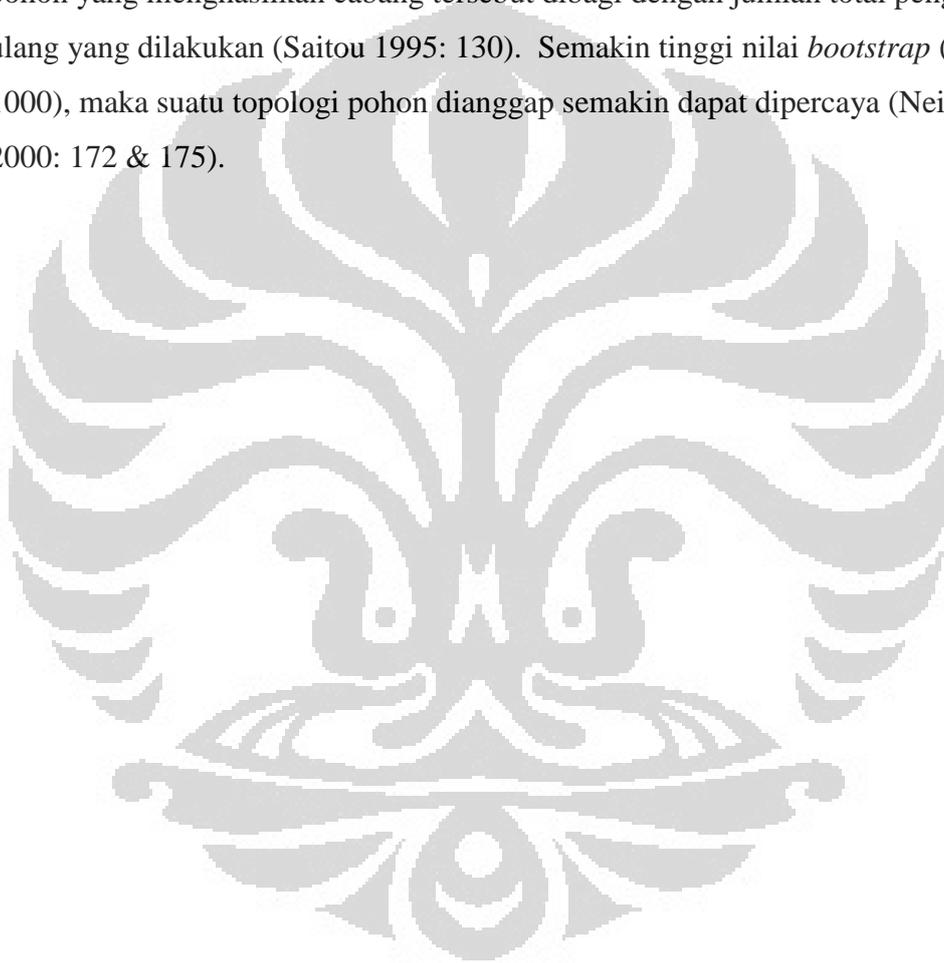
2.7 Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik adalah suatu metode untuk merekonstruksi sejarah evolusi dari sekelompok organisme. Hasil analisis filogenetik ditampilkan dalam bentuk pohon filogeni. Pohon filogeni adalah suatu diagram evolusioner yang terdiri atas nodus (unit taksonomi yang merepresentasikan tipe taksa yang dapat dibandingkan) dan cabang (garis yang menghubungkan dua nodus dan mendefinisikan hubungan kekerabatan antar *Operational Taxonomic Unit* (OTU) dalam hubungan turunan-leluhur) (Vandamme 2003: 15). OTU dapat berupa spesies, populasi, individu, atau gen. Pola percabangan pada pohon filogenetik disebut topologi. Panjang pada suatu cabang merepresentasikan perbedaan pada cabang tersebut (Saitou 1996: 428).

Metode pembuatan pohon filogeni dapat dilakukan berdasarkan penggunaan data *distance matrix*. *Distance matrix* merupakan seluruh nilai jarak evolusi yang mungkin terjadi antara dua subjek. *Distance matrix* lebih banyak digunakan karena proses analisisnya cepat dan memungkinkan sejumlah besar *sequence* dapat dievaluasi (Pearson *dkk.* 1999: 806). Salah satu dari metode *distance matrix* adalah *neighbor-joining*. *Neighbor-joining* adalah metode untuk merekonstruksi pohon filogeni dengan menghitung besarnya perubahan basa DNA pada setiap organisme (jarak evolusi) yang direpresentasikan melalui panjang dari cabang yang terbentuk. Pada setiap tahapannya, dua nodus terdekat pada pohon dipilih dan ditetapkan sebagai “*neighbor*” di pohon filogeni. Hal tersebut dilakukan secara berulang-ulang sampai

semua nodus dipasangkan bersama-sama dan terbentuklah pohon filogeni (Saitou & Nei 1987: 406).

Tingkat kepercayaan pohon filogenetik dilakukan dengan uji *bootstrap*. Uji *bootstrap* dilakukan dengan mengacak ulang karakter-karakter pada hasil *alignment* (pensejajaran *sequence*) menjadi suatu set data baru atau data replika. Topologi di antara pohon-pohon yang dihasilkan dari pengacakan kemudian dibandingkan dengan topologi pohon awal. Probabilitas *bootstrap* dari suatu cabang merupakan jumlah pohon yang menghasilkan cabang tersebut dibagi dengan jumlah total pengacakan ulang yang dilakukan (Saitou 1995: 130). Semakin tinggi nilai *bootstrap* (mendekati 1000), maka suatu topologi pohon dianggap semakin dapat dipercaya (Nei & Kumar 2000: 172 & 175).



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioakuakultur, Laboratorium Pusat Teknologi Produksi Pertanian (PTPP) Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek) Serpong. Penelitian berlangsung selama delapan bulan, terhitung sejak Maret hingga Oktober 2011.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian, di antaranya cawan petri, *stirrer* [Cimarec-2], vorteks [Heidolph REAX 2000], aparatus elektroforesis [Bio-rad], UV transluminator [Bio-rad], *microwave* [Panasonic], pompa vakum [Vitlab], kamera digital [Canon Power Shot S5IS], *beaker glass* 100 ml dan 200 ml [Iwaki pyrex], gelas ukur 25 ml [Iwaki pyrex], erlenmeyer 250 ml [Iwaki pyrex], pipet mikro 0,1--2,5 μl , 2,5--10 μl , 10--100 μl , 100--1000 μl [Dragon med], *autoclave* destruksi [Hirayama], *autoclave* sterilisasi [ALP KT-40], *freezer* -4 °C [Sanyo], *freezer* -20 °C [LG Expresscool], *freezer* -40 °C [Heire], oven [Memmert], *incubator* [Memmert], kertas pH [Merck], *gel ice* [Cool Master], sentrifugator [Hettich zentrifugen], spidol permanen [Faber castle], *laminar flow cabinet* [Esco], *shaker incubator* [Yih der], mesin PCR [ESCO Swift-Maxi], mesin *sequencer* [Applied Biosystem Hitachi], timbangan digital [Kern-ew], korek api [tanpa merek], pinset [tanpa merk], jarum ose [tanpa merk], alas timbangan [tanpa merek], *triangle spreader* [tanpa merk], gelas ukur plastik 100 ml [tanpa merk], tips 0,1--2,5 μl , tips 2--200 μl , tips 100--1000 μl , *micro test tube* 1,5 ml, dan *micro thin wall* 0,2 ml (PCR tube).

3.3 Bahan

3.3.1 Sampel

Sampel ikan nila berasal dari 3 habitat yang berbeda, yaitu Karamba Jaring Apung (KJA) polikultur Waduk Cirata, Purwakarta; Tambak ikan nila salin, Karawang; dan Kolam Laboratorium PTPP, Serpong (keterangan deskripsi habitat dapat dilihat pada Lampiran 7). Ikan nila ditangkap secara acak dengan total sebanyak 20 ekor. Sampel yang digunakan adalah usus ikan nila beserta kotorannya dengan panjang 3--5 cm dan berat 1,5 g/cm (Lampiran 2). Sampel usus yang telah diisolasi kemudian dimasukkan ke dalam *micro test tube* 1,5 ml dan dibuat secara duplo.

3.3.2 Sel Kompeten

Bakteri yang digunakan untuk membuat sel kompeten adalah *Escherichia coli* DH5 α . Bakteri dipelihara dalam medium Luria Bertani (*bacto trypton* 0,01 g/ml, *yeast extract* 0,005 g/ml, NaCl 0,01 g/ml agar 2 %).

3.3.3 Primer

Primer yang digunakan untuk PCR 16S rRNA bakteri dan verifikasi hasil pengklonan adalah primer universal 9F [1st Base] berukuran 19 pb dan 1541R [1st Base] berukuran 17 pb.

Tabel 3.3.3 *Sequence* primer gen 16S rRNA

Primer	<i>Sequence</i> Basa
Primer 9 F	5'-GAGTTTGATC CTGGGTCAG-3'
Primer 1541 R	5'-AGGAGGTGATCCAGCC-3'

[Sumber: Bahrani-Mougeot *dkk.* 2008: 1589.]

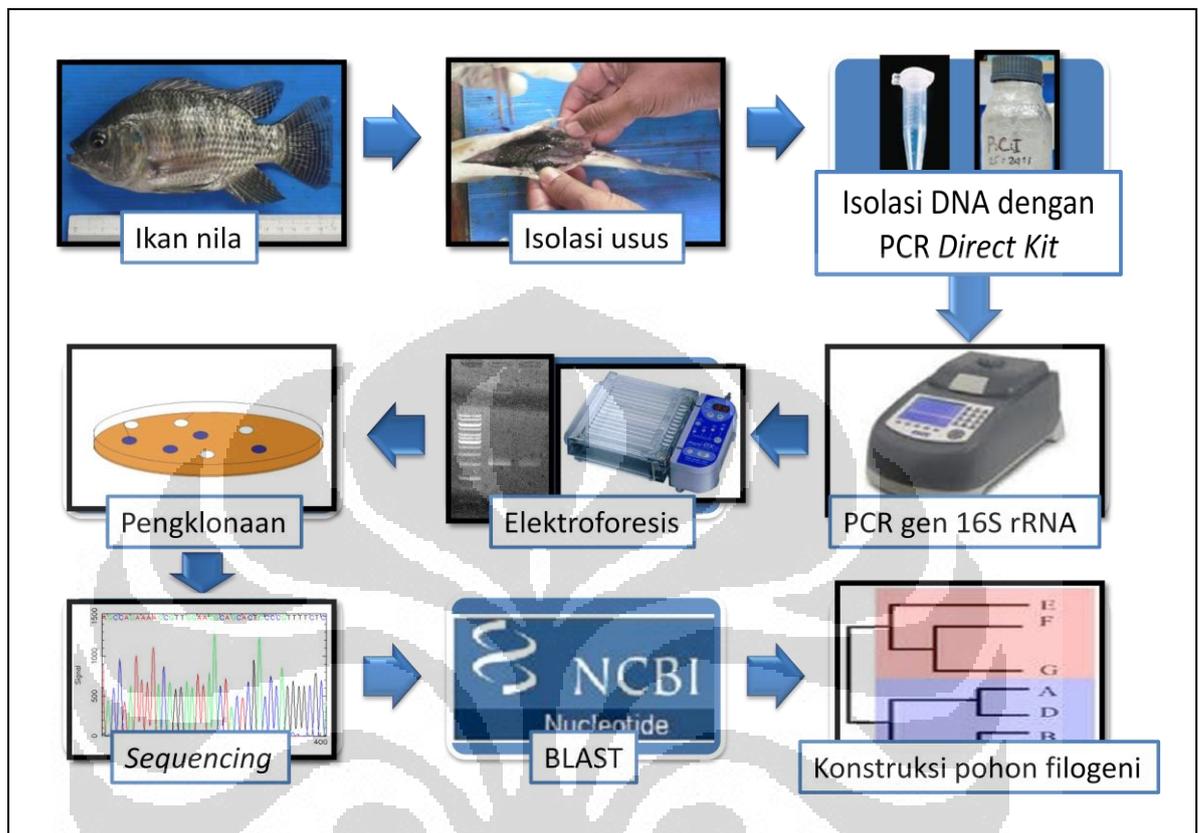
3.3.4 Bahan kimia dan bahan habis pakai

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah, TNES-Urea buffer, *phenol* (25): *chloroform* (24): *isoamyl alcohol* (1), proteinase-K [Fermentas], sodium asetat 3M, etanol absolut [Merck], *buffer TE*, RNase [Fermentas], 2x Terra PCR *direct buffer* [Clontech], Terra PCR *direct polymerase mix* [Clontech], dNTP 2 mM [Fermentas], *Dream taq buffer* [Fermentas], *Dream taq* [Fermentas], bubuk agarosa [Fermentas], TBE 1x [Fermentas], 6x *loading dye* [Fermentas], marka DNA 1 kb [Fermentas], etidium bromida [Merck], vektor pGEM-T *easy* [Promega], *ligation buffer* [Promega], T4 DNA ligase [Promega], *tryptone* [Bio Basic Inc.], *yeast extract* [Bio Basic Inc.], NaCl [Merck], KCl 250 mM, KOH 1M, bubuk agar [BiomarkTM Laboratories], *ampicillin*, IPTG, X-Gal, CaCl₂ (20 mM): MgCl₂ (80 mM), CaCl₂ 0,1 M, aluminium foil (Klinpak), parafilm, selotip, tisu, *disposable plastic gloves*, *plastic wrap*, tusuk gigi, dan es.

3.4 Perangkat Lunak

Perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian untuk analisis data *sequence* dan rekonstruksi pohon filogenetik adalah program online BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Chromas Lite versi 2.01 [Technelysium Pty Ltd] (<http://www.technelysium.com.au>), BioEdit versi 5.0.6 (Hall 1999: 95) (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>), ClustalX versi 1.83 (Thompson *dkk.* 1997: 4876) (<http://www.clustal.org/download/current/clustalx>), NJPlot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>), dan CorelDraw® X4 [Corel Corporation].

3.5 Cara Kerja



Gambar 3.5 Skema kerja penelitian

3.5.1 Pembuatan larutan *buffer*

Pembuatan larutan *buffer* dan medium dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.5.2 Preparasi sampel

Preparasi sampel usus ikan nila dilakukan sesuai dengan metode Leano *dkk.* (2005: 1582). Ikan ditangkap dengan saringan dan dikorbkan terlebih dahulu dengan cara dipotong bagian dorsal kepalanya menggunakan *scalpel*. Bagian ventral ikan lalu dibedah dengan gunting dari bagian anus hingga bagian sirip ventral. Usus ikan nila kemudian diisolasi dengan cara menariknya dari ujung anus dengan menggunakan pinset yang telah disterilisasi dengan alkohol 70 %, lalu dipotong

sepanjang 5 cm dari ujung anus. Sampel usus yang diperoleh lalu dimasukkan ke dalam *micro test tube* 1,5 ml dan dapat disimpan pada suhu -20°C .

3.5.3 Isolasi gen 16S rRNA dengan Terra PCR *Direct Kit Polymerase* [Clontech]

Usus ikan nila yang sudah dipotong seberat 5--10 mg dimasukkan ke dalam *micro test tube* 1,5 ml, kemudian ditambahkan 180 μl 50 mM NaOH, lalu diinkubasi 95°C selama 10 menit. Sampel kemudian dinetralisasi dengan menambahkan 20 μl 1 M Tris HCl (pH 8.0). Suspensi sampel lalu ditambahkan pada campuran PCR dengan total volume 50 μl . Komposisi campuran untuk amplifikasi gen 16S rRNA sampel usus ikan nila dapat dilihat pada Tabel 3.5.3.

Tabel 3.5.3 Komposisi campuran PCR *Direct Kit Polymerase*

Bahan	Konsentrasi Akhir	Volume
2x Terra PCR <i>Direct Buffer</i>	-	25 μl
Primer 9F	20 pmol/ μl	1 μl
Primer 1541 R	20 nmol/ μl	1 μl
Suspensi sampel usus	-	< 5 μl
Terra PCR <i>Direct Polymerase Mix</i>	1,25 U	1 μl
Aquabides steril	-	Sampai 50 μl
Volume Total		50 μl

[Sumber: Clontech 2010: 5.]

3.5.4 Perhitungan kemurnian dan konsentrasi DNA

Perhitungan tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *NanoDrop Spectrophotometer* [ND-1000]. Perangkat lunak yang digunakan dalam proses *NanoDrop* adalah ND-1000 versi 5.2. Perangkat tersebut pertama-tama dibuka pada komputer, kemudian dipilih menu “*nucleic acid*”. Panjang gelombang yang dipakai diubah menjadi 260 dan 280 nm. Larutan elusi (TE *buffer*) dimasukkan ke dalam mesin *NanoDrop* sebanyak 2 μl , kemudian dipilih

“blank”. Sisa larutan elusi dibersihkan dengan tisu, kemudian sampel yang akan diukur dimasukkan ke dalam mesin *NanoDrop* sebanyak 2 μ l, lalu ditekan tombol “measure” untuk mengukur tingkat kemurnian dan konsentrasi dari sampel DNA.

3.5.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) gen 16S rRNA

Teknik PCR digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA sepanjang 1.550 pb. Campuran PCR menggunakan bahan seperti primer *forward* 9F dan *reverse* 1541 R, dNTP 2 mM, *Dream taq buffer*, *Dream taq*, akuabides steril, dan sampel DNA usus ikan nila. Campuran dibuat dengan volume akhir sebesar 10 μ l. Komposisi campuran untuk amplifikasi gen 16S rRNA sampel usus ikan nila dan untuk amplifikasi gen 16S rRNA hasil klon dapat dilihat pada Tabel 3.5.5(1)

Campuran yang telah siap kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Siklus PCR dibuat sebanyak 30 siklus. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen 16S rRNA dan gen 16S rRNA rekombinan dapat dilihat pada Tabel 3.5.5(2)

Tabel 3.5.5(1) Komposisi campuran PCR gen 16S rRNA dan PCR verifikasi klon

Bahan	Konsentrasi Akhir	Volume
Akuabides	-	6 μ l
Primer 9F	20 pmol/ μ l	0,5 μ l
Primer 1541 R	20 nmol/ μ l	0,5 μ l
dNTP mix	2 mM	1 μ l
<i>Dream taq buffer</i>	-	1 μ l
<i>Dream taq</i>	0,25 U/ μ l	0,25 u/ μ l
Sampel DNA	20 ng/ μ l	1 μ l
	Volume Total	10 μ l

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: 8.21.]

Program yang digunakan pada proses PCR terdiri atas 2 proses, yaitu proses optimasi dan proses amplifikasi. Proses optimasi dibuat dengan menggunakan gradien PCR. Teknik gradien PCR memungkinkan terjadinya beberapa suhu

annealing dalam 1 proses PCR. Program optimasi PCR yang digunakan terdiri atas tahap pra-denaturasi, denaturasi, *annealing*, elongasi, dan preservasi. Proses optimasi *annealing* primer 9F dan 1541 R telah dilakukan oleh Karsono (2007: 88).

Tabel 3.5.5(2) Program amplifikasi PCR gen 16S rRNA dan
PCR gen 16S rRNA rekombinan

Segmen	Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
1	Pra-denaturasi	96 °C	5 menit	1
2	Denaturasi	96 °C	45 detik	30
3	<i>Annealing</i>	56 °C	30 detik	30
4	Elongasi	72 °C	2 menit	30
5	Pasca Elongasi	72 °C	5 menit	1
6	Preservasi	4 °C	∞	

[Sumber: Karsono 2007: 88.]

3.5.6 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan metode elektroforesis gel agarosa. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 0,8%. Gel agarosa 0,8 % dibuat dengan cara melarutkan 0,40 gram bubuk agarosa ke dalam 50 ml TBE 1x. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dengan menggunakan *microwave* sampai bubuk agarosa larut sempurna. Larutan gel agarosa tersebut kemudian dicetak pada cetakan aparatus elektroforesis. Gel agarosa yang sudah memadat dipindahkan ke dalam *chamber* yang telah terdapat *running buffer* elektroforesis. Hasil proses PCR yang didapat nantinya akan dicampur dengan 6x *loading dye* sebelum dimasukkan ke dalam *well*. Perbandingan antara produk PCR dan *loading dye* adalah dua banding satu. Marka DNA 1 kb dimasukkan setelah semua sampel sudah dimasukkan ke dalam *well*. Perbandingan antara marka DNA dengan *loading dye* adalah 1:1. Mesin elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Gel agarosa yang telah menyelesaikan tahap elektroforesis kemudian direndam ke dalam larutan etidium bromida selama kurang lebih 15 menit. Gel tersebut kemudian dilihat di bawah UV-Transilluminator, lalu didokumentasikan untuk dianalisis.

3.5.7 Purifikasi gel agarosa

Proses purifikasi gel dilakukan dengan menggunakan kit *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* [Geneaid]. Proses purifikasi diawali dengan memotong bagian gel yang memiliki pita spesifik DNA yang diinginkan. Potongan gel kemudian dimasukkan ke dalam *micro test tube* 1,5 ml. Potongan gel ditambahkan larutan *DF Buffer* sebanyak 500 μ l. Sampel kemudian divorteks, lalu diinkubasi pada suhu 55 °C--60 °C selama 10--15 menit. Sampel diinkubasi hingga potongan gel larut sempurna dengan pelarut. Sampel di-*invert* beberapa kali setiap 2--3 menit. Sampel yang telah diinkubasi dibiarkan sampai sampel mencapai suhu ruang. Sampel sebanyak 800 μ l dipindahkan ke dalam *DF Column*. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang tertampung pada *collection tube* dibuang. Proses sentrifugasi diulangi jika sampel lebih dari 800 μ l. Sampel pada *DF Column* yang sudah disentrifugasi ditambahkan *W1 Buffer* sebanyak 400 μ l. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang tertampung pada *collection tube* dibuang. Sampel pada *DF Column* yang sudah disentrifugasi kemudian ditambahkan dengan *Wash Buffer* sebanyak 600 μ l. Sampel dibiarkan kurang lebih selama 1 menit. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang tertampung pada *collection tube* dibuang. Sampel kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan matriks dari *DF Column*. *Elution Buffer* sebanyak 15--50 μ l ditambahkan pada *DF Column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang tertampung pada *micro test tube* 1,5 ml merupakan sampel DNA hasil purifikasi gel dan disimpan pada *freezer* -20 °C.

3.5.8 Pembuatan sel kompeten

Sel kompeten dibuat berdasarkan metode Hanahan (Sambrook & Russell 2001: 1.105--1.109). Bakteri yang digunakan adalah *E.coli* DH5 α . Satu koloni dari cawan petri biakan dimasukkan ke dalam 50 ml medium SOB cair, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan suhu 37 °C selama 12--18 jam. Sebanyak 5

ml dari volume kultur dilakukan subkultur ke dalam 45 ml medium SOB cair yang baru, kemudian diinkubasi kembali pada *shaker incubator* dengan suhu 37 °C selama 3 jam. Kultur sebanyak 3--4 ml dipindahkan ke dalam beberapa *micro test tube* 1,5 ml, kemudian diinkubasi dalam es selama 10 menit. Kultur kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet yang terbentuk diberikan CaCl₂ (20 mM) : MgCl₂ (80 mM) sebanyak 750 µl. Campuran kemudian diinkubasi di dalam es selama 20 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet diberikan CaCl₂ 0,1 M sebanyak 100 µl. Sel kompeten disimpan pada *freezer* -41 °C dan siap untuk digunakan.

3.5.9 Ligasi

Proses ligasi DNA sisipan pada vektor dilakukan menggunakan kit pGEM-T *Easy Vector Systems*. Prosedur dilakukan berdasarkan Promega (2008: 11). Ligasi dilakukan dengan perbandingan vektor : DNA sisipan, yaitu 3:1. Tabung berisi 2x *rapid ligation buffer* dihomogenkan menggunakan vorteks, lalu dilakukan pencampuran bahan untuk reaksi ligasi dengan volume reaksi sebesar 10 µl. Reaksi ligasi dilakukan pada *micro thin wall* 0,5 ml. Komposisi reaksi ligasi dapat dilihat pada Tabel 3.5.9. Pencampuran reaksi dilakukan menggunakan teknik *pipetting*.

Tabel 3.5.9 Komposisi reaksi ligasi

Reagen	Volume
2x <i>Rapid Ligation Buffer</i>	5 µl
pGEM-T <i>Easy Vector</i>	1 µl
DNA (Produk PCR) 20 ng/µl	3 µl
T4 DNA <i>ligase</i>	1 µl
Total	10 µl

[Sumber: Promega 1999: 11.]

3.5.10 Transformasi

Transformasi dilakukan menggunakan metode *heat shock* (Sambrook & Russell 2001: 1.109). Sel kompeten yang digunakan untuk melakukan transformasi, dikeluarkan dari *freezer* bersuhu -41 °C. Sel kompeten yang beku tersebut dicairkan pada suhu 25--27 °C. Sel kompeten yang telah mencair diinkubasi di dalam es selama 10 menit. Produk ligasi sebanyak 10 µl kemudian dimasukkan ke dalam sel kompeten. Sel kompeten yang telah ditambahkan produk ligasi 3:1, diinkubasi dalam es selama 30 menit. Sel kompeten kemudian langsung dipindahkan ke *water bath* dengan suhu 42 °C selama 90 detik, kemudian segera dipindahkan ke dalam es dan diinkubasi selama 2 menit.

Medium SOC sebanyak 800 µl kemudian ditambahkan pada sel kompeten, dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 45 menit dengan suhu 37 °C. Sel kompeten sebanyak 100 µl kemudian disebar (*spread*) pada medium SOB. Penyebaran dilakukan menggunakan *triangle spreader* hingga tersebar rata. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 12--16 jam.

Efisiensi transformasi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$\text{Efisiensi transformasi} = \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{rasio pengenceran} \times \text{vol. Total/vol. kultur}}{\text{konsentrasi DNA plasmid } (\mu\text{g})}$

Sumber: (Tu *dkk.* 2005: 117).

3.5.11 Isolasi DNA rekombinan

Isolasi DNA rekombinan dari hasil pengklonaan dilakukan melalui metode *minipreparation* menggunakan *alkaline lysis solution* I, II, dan III. (Sambrook & Russell 2001: 1.32--1.34). Bakteri hasil pengklonaan yang positif (berwarna putih) ditumbuhkan pada medium SOB cair yang mengandung ampisilin 100 µg/ml. Proses penumbuhan dilakukan selama semalam (\pm 18 jam) dengan suhu 37 °C. Kultur bakteri yang telah tumbuh kemudian dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam *micro test tube* 1,5 ml. Sentrifugasi kemudian dilakukan selama 30 detik dengan kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan dibuang. Pelet kemudian

disuspensikan dengan *alkaline lysis solution* I dingin sebanyak 100 μ l. *Alkaline lysis solution* II sebanyak 200 μ l kemudian ditambahkan pada suspensi pelet dan tabung di-*invert* sebanyak lima kali. Suspensi diinkubasi pada suhu -20°C selama 5 menit.

Alkaline lysis solution III dingin sebanyak 150 μ l kemudian ditambahkan pada suspensi. Tabung kemudian di-*invert* sebanyak 5 kali, kemudian diinkubasi kembali pada suhu -20°C selama 5 menit. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C . Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam *micro test tube* 1,5 ml yang baru. Supernatan kemudian diberi larutan PCI sebanyak 700 μ l, lalu dilakukan *rotamix* selama 5 menit. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C . Lapisan teratas dari supernatan yang terbentuk kemudian dipindahkan ke dalam *micro test tube* 1,5 ml yang baru.

Etanol absolut dingin sebanyak 700 μ l ditambahkan ke dalam supernatan, lalu diinkubasi pada suhu -20°C selama 10 menit. Suspensi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C . Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet yang diperoleh dicuci dengan menambahkan etanol 70% dingin sebanyak 1 ml. Suspensi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet yang diperoleh dikeringkan menggunakan mesin vakum selama 10 menit dengan membiarkan tabung terbuka. Larutan TE pH 8 sebanyak 15 μ l dan RNase sebanyak 1 μ l kemudian ditambahkan pada pelet yang telah dikeringkan dan dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

3.5.12 *Polymerase Chain Reaction (PCR) cycle sequencing*

Polymerase chain reaction cycle sequencing dilakukan dengan menggunakan bahan-bahan dari Applied Biosystem. Campuran untuk PCR terlebih dahulu dibuat sebelum dijalankan pada mesin PCR. Komponen reaksi yang digunakan merupakan hasil optimasi. Reaksi dibuat dengan total volume akhir sebanyak 20 μ l.

3.5.13 Purifikasi PCR *cycle sequencing*

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan prinsip dasar presipitasi DNA menggunakan etanol yang dimodifikasi (Sambrook & Russell 2001: A8.14--A8.15). Produk PCR ditambahkan dengan ddH₂O sebanyak 20 µl. Sebanyak 2 µl EDTA 125 mM kemudian ditambahkan. Campuran di-*tapping* agar tercampur dengan baik. Sebanyak 3 µl NaOAC 3M kemudian ditambahkan dan di-*tapping*, lalu ditambahkan 50 µl etanol absolut kemudian tabung ditutup dengan kertas alumunium. Campuran diinkubasi selama 15 menit di dalam es.

Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 7.400 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan dibuang secara hati-hati menggunakan pipet. Pelet ditambahkan alkohol 70% sebanyak 140 µl, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5.800 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk dibuang secara hati-hati dengan menggunakan pipet. Sisa supernatan dihilangkan dengan metode vakum selama 10 menit. Pelet ditambahkan ddH₂O sebanyak 12 µl, dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 10 menit. Sampel siap untuk dilakukan *sequencing*.

3.5.14 *Sequencing*

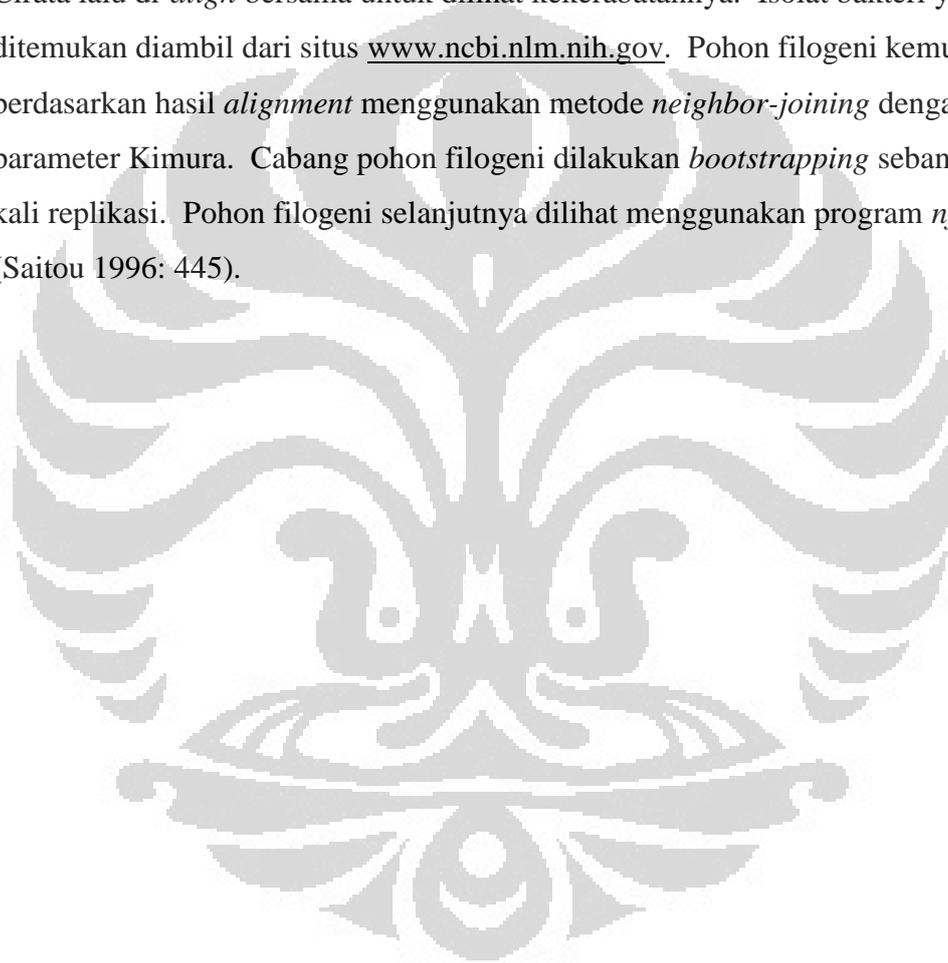
Sequencing dilakukan menggunakan alat dari Applied Biosystem Hitachi dengan seri Genetic Analyzer 3130. Pengerjaan *sequencing* dilakukan oleh laboran Balai Bioteknologi BPPT, Serpong.

3.5.15 Analisis data *sequence*

Hasil *sequencing* klon yang diperoleh diubah dalam format FASTA kemudian dilakukan BLAST. Pengerjaan BLAST dilakukan pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> dan mengacu pada petunjuk manual dalam situs tersebut. Tipe BLAST yang digunakan adalah *nucleotideBLAST*. *Sequence* yang diperoleh dimasukkan pada kotak *entry sequence*. Database yang dipilih adalah *other* dengan *organism bacteria*. Program yang dipilih adalah

MegaBLAST. Data yang diperoleh berupa *sequence* bakteri-bakteri yang berkerabat dekat.

Sequence tersebut kemudian diubah menjadi format FASTA dan dilakukan *multiple alignment* dengan *sequence* klon menggunakan program ClustalX 1.83 *sequence* isolat bakteri dari dalam usus ikan nila yang sudah pernah ditemukan, seperti *Vibrio*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, dan *Enterobacter* (Al-Harbi & Uddin 2005: 566; Fatimah 2005: 3) digabungkan dengan isolat yang berasal dari Waduk Cirata lalu di-*align* bersama untuk dilihat kekerabatannya. Isolat bakteri yang pernah ditemukan diambil dari situs www.ncbi.nlm.nih.gov. Pohon filogeni kemudian dibuat berdasarkan hasil *alignment* menggunakan metode *neighbor-joining* dengan dua parameter Kimura. Cabang pohon filogeni dilakukan *bootstrapping* sebanyak 1.000 kali replikasi. Pohon filogeni selanjutnya dilihat menggunakan program *njplot* (Saitou 1996: 445).



BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Isolasi usus ikan nila

Isolasi usus merupakan tahap awal dalam pengambilan DNA langsung dari lingkungan (Gambar 4.1.1). Ikan yang berhasil diisolasi ususnya sebanyak 20 ekor ikan dengan rincian 8 ekor berasal dari Kolam Laboratorium Pusat Teknologi Produksi Pertanian (PTPP), Serpong; 4 ekor berasal dari Tambak ikan nila salin, Karawang; dan 8 ekor berasal dari KJA Waduk Cirata, Purwakarta. Panjang usus yang diisolasi berkisar antara 3--5 cm dari ujung anus. Data morfologi ikan nila yang dijadikan sampel dapat dilihat pada Lampiran 2.

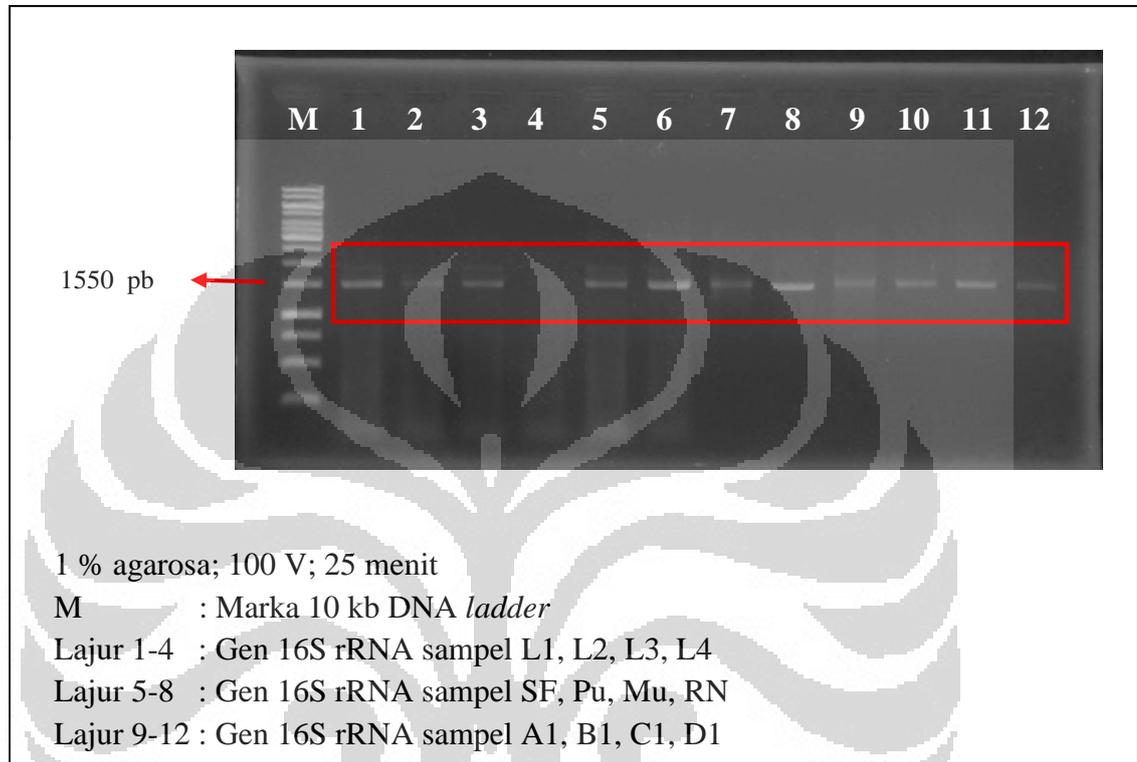


Gambar 4.1.1. Isolasi usus ikan nila

4.1.2 Isolasi dan amplifikasi DNA bakteri dari usus ikan nila

Sampel DNA bakteri diisolasi dengan mengamplifikasi DNA secara langsung dari usus melalui PCR *Direct Kit Polymerase Mix* [Clontech]. Sampel yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA adalah sampel usus dari Kolam Laboratorium PTPP (L1, L2, L3, L4), KJA Waduk Cirata (A1, B1, C1, D1) dan

Tambak Karawang (SF, Pu, Mu dan RN). Hasil identifikasi gen 16S rRNA divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa (Gambar 4.1.2). Hasil visualisasi pada 12 sampel (L1, L2, L3, L4, SF, Pu, Mu, RN, A1, B1, C1, dan D1) menunjukkan adanya pita yang terletak pada 1550 pb.



Gambar 4.1.2. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16S rRNA dengan *PCR Direct Kit Polymerase Mix*

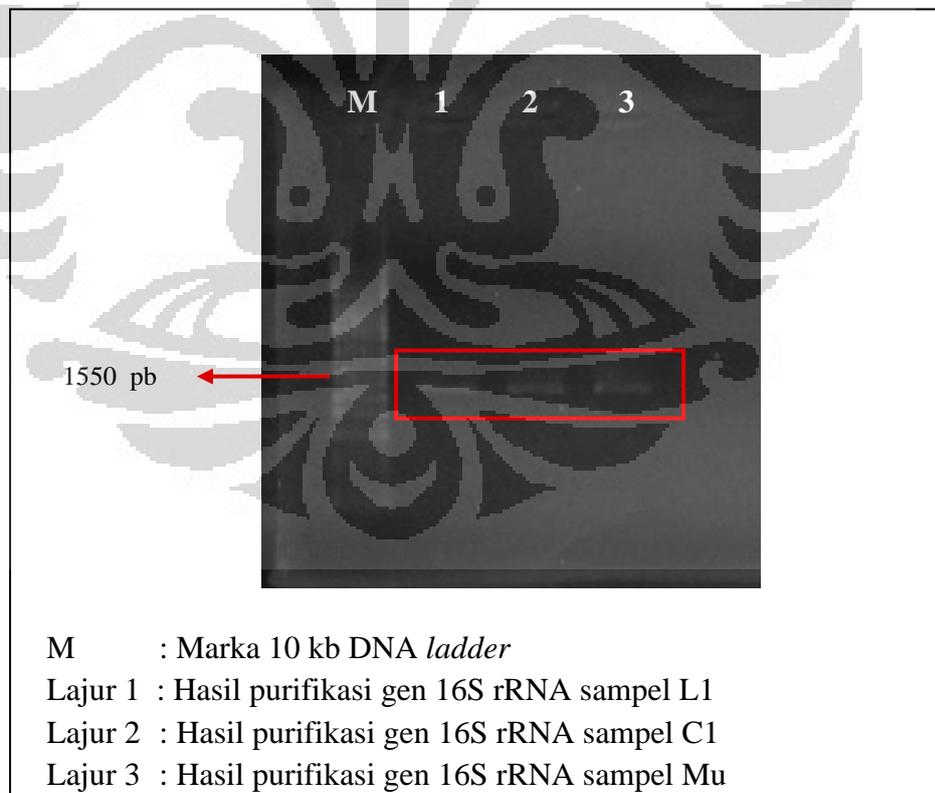
4.1.3 Purifikasi produk PCR

Sampel yang positif terhadap hasil amplifikasi gen 16S rRNA dipilih untuk analisis lebih lanjut. Perwakilan dari sampel per-lokasi dipilih, yaitu sampel L1, Mu dan C1 yang selanjutnya dipurifikasi dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* [Geneaid] dan divisualisasi dengan gel elektroforesis. Tingkat konsentrasi dan kemurnian dari hasil purifikasi gen 16S rRNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer *nanodrop*. Nilai konsentrasi yang didapat relatif rendah, yaitu berkisar antara 12,01--45,65 ng/ μ l, sementara tingkat kemurnian yang didapat adalah berkisar antara 1,12--1,35 (Tabel 4.1.3).

Tabel 4.1.3 Kuantifikasi hasil purifikasi gen 16S rRNA

No	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	Kemurnian ($A_{260/280}$)
1	L1	200,05	1,12
2	L2	450,73	1,30
3	L3	100,51	1,35
4	L4	150,63	1,15
5	A1	220,21	1,32
6	B1	150,23	1,55
7	C1	450,65	1,52
8	D1	200,02	1,47
9	SF	120,01	1,43
10	RN	180,39	1,13
11	Pu	210,32	1,41
12	Mu	350,45	1,41

Ukuran pita DNA hasil purifikasi sama dengan hasil amplifikasi, yaitu 1550 pb. Namun ketebalan pita DNA, konsentrasi dan kemurnian hasil purifikasi lebih rendah dibandingkan dengan hasil amplifikasi (Gambar 4.1.3).



Gambar 4.1.3. Visualisasi hasil purifikasi gen 16S rRNA

4.1.4 Transformasi gen 16S rRNA

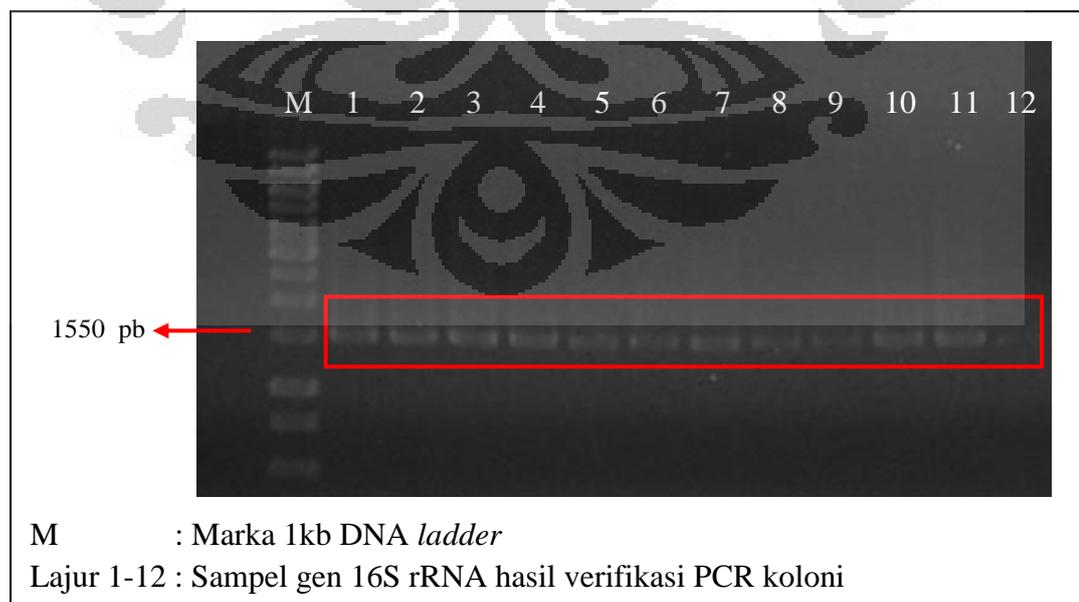
Pengklonaan dilakukan dari sampel hasil transformasi gen 16S rRNA sampel usus ikan nila dari Kolam Laboratorium PTPP (L1, L2), Tambak Karawang (Mu, Pu), dan KJA Waduk Cirata (A1, C1) (Lampiran 8.). Jumlah klon yang tumbuh setelah masa inkubasi 16 jam pada sampel beserta hasil efisiensi transformasinya dapat dilihat pada tabel 4.1.4.

Tabel 4.1.4 Hasil efisiensi transformasi gen 16S rRNA usus ikan nila

Petri	Koloni putih	Efisiensi transformasi
L1	375	$9,37 \times 10^6$ cfu/ μ g
L2	212	$5,36 \times 10^6$ cfu/ μ g
Mu	275	$6,87 \times 10^6$ cfu/ μ g
Pu	290	$7,25 \times 10^6$ cfu/ μ g
A1	255	$6,37 \times 10^6$ cfu/ μ g
C1	316	$7,90 \times 10^6$ cfu/ μ g

4.1.5 Verifikasi penyisipan gen 16S rRNA

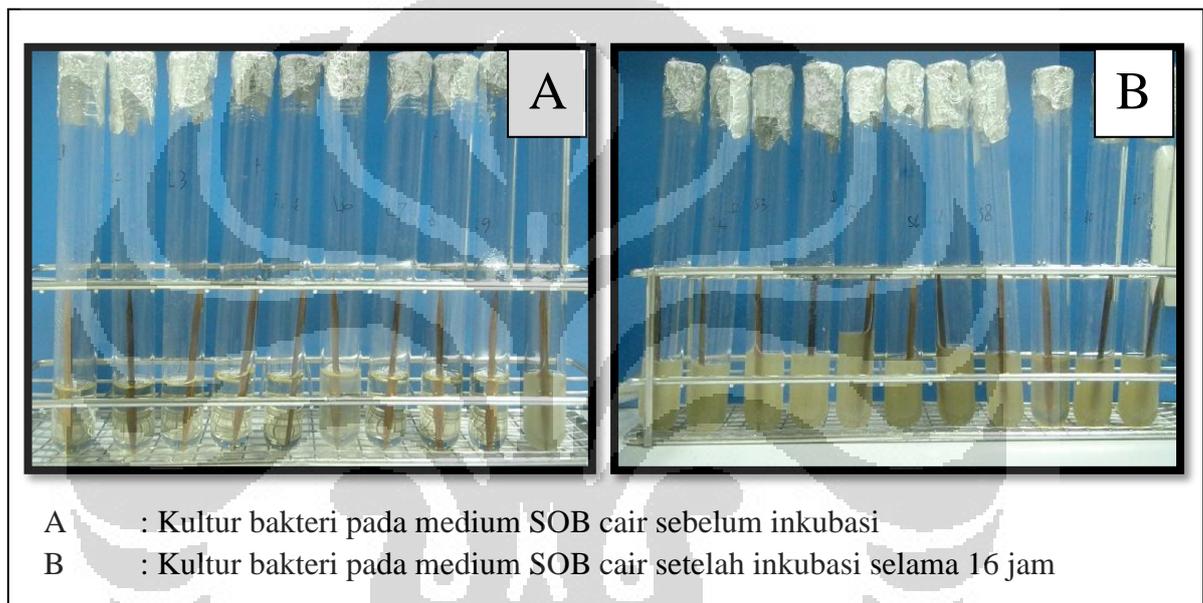
Verifikasi koloni putih yang positif ditunjukkan dengan munculnya pita DNA berukuran 1550 pb. Hasil visualisasi verifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.1.5.



Gambar 4.1.5 Hasil verifikasi gen 16S rRNA

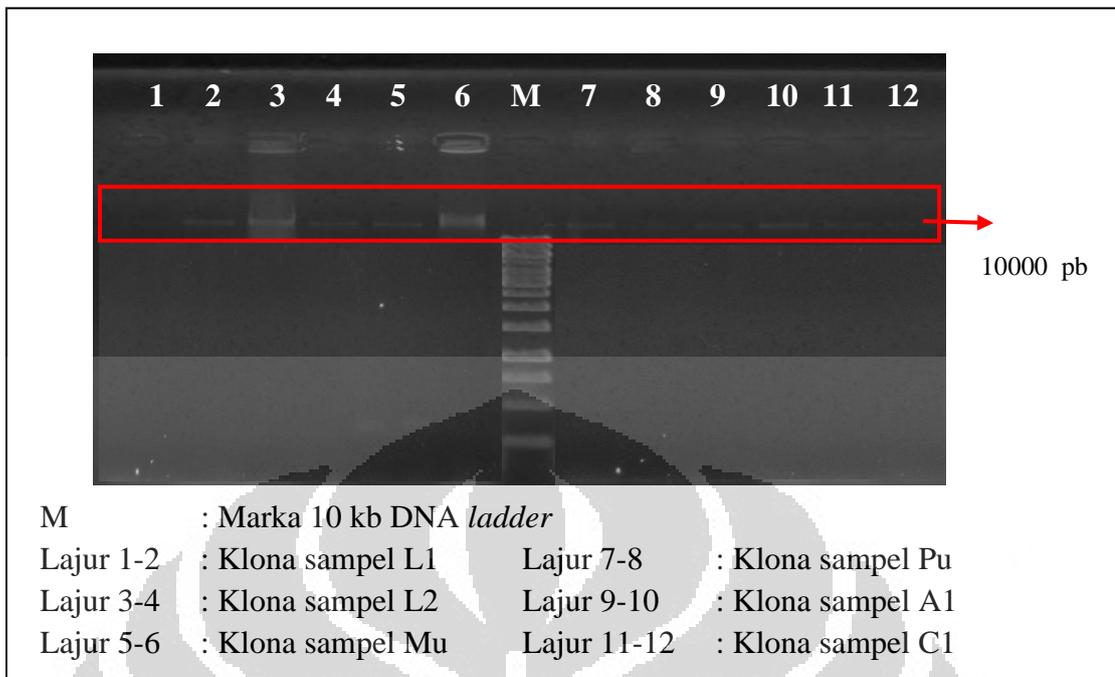
4.1.6 Isolasi DNA rekombinan

Berdasarkan hasil pengamatan setelah inkubasi 16 jam memperlihatkan medium SOB cair dari subkultur sampel L1, L2, Mu, Pu, dan A1, C1 keruh. Hal tersebut menunjukkan terjadinya pertumbuhan bakteri di dalam tabung (Gambar 4.1.6(1)). Pelet DNA rekombinan hasil isolasi berhasil diperoleh dan dielusi dengan TE *buffer* sebanyak 20 μ l. Konsentrasi DNA yang didapatkan berkisar antara 311,25-480,29 ng/ μ l dengan kemurnian 1,87--2,15.

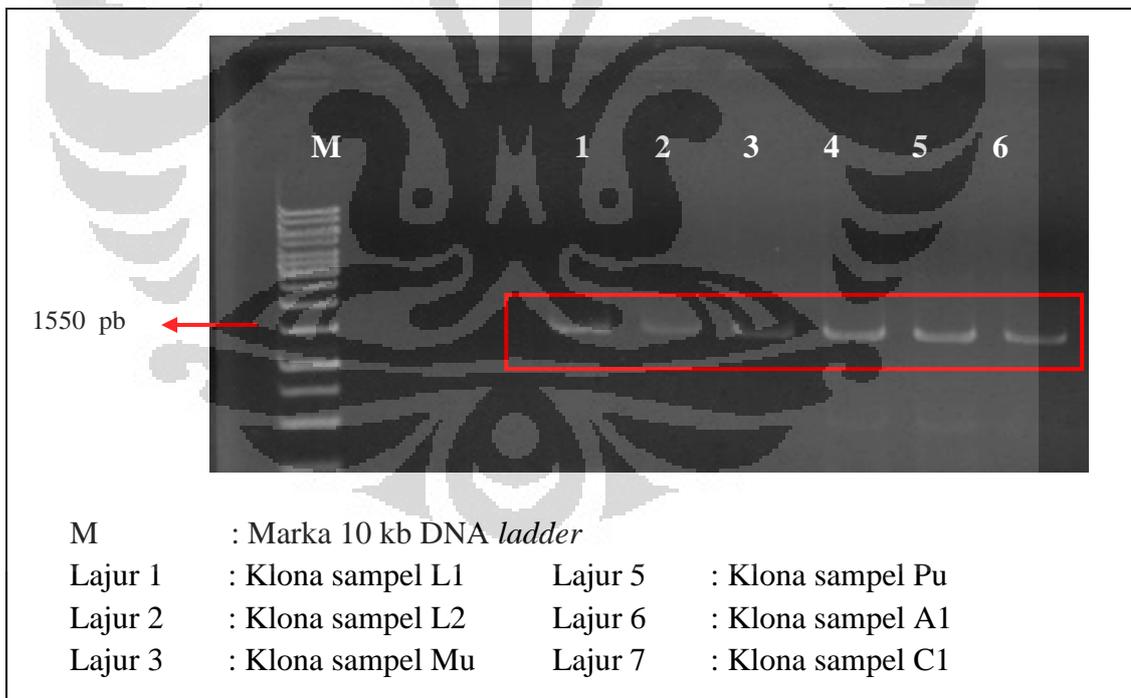


Gambar 4.1.6(1). Kultur cair koloni bakteri DNA rekombinan

Hasil isolasi klon divisualisasi dengan gel elektroforesis. Ukuran pita DNA rekombinan yang muncul di atas 10000 pb (Gambar 4.1.6(2)). Selanjutnya, Klon sampel L1, L2, Mu, Pu, A1, C1 hasil isolasi DNA rekombinan, kemudian dilakukan PCR verifikasi gen sisipan untuk identifikasi gen 16S rRNA pada plasmid. Berdasarkan visualisasi DNA melalui elektroforesis pada gel agarosa memperlihatkan adanya pita DNA pada 1550 pb pada seluruh sampel (Gambar 4.1.6(3)).



Gambar 4.1.6(2). Visualisasi isolasi DNA rekombinan



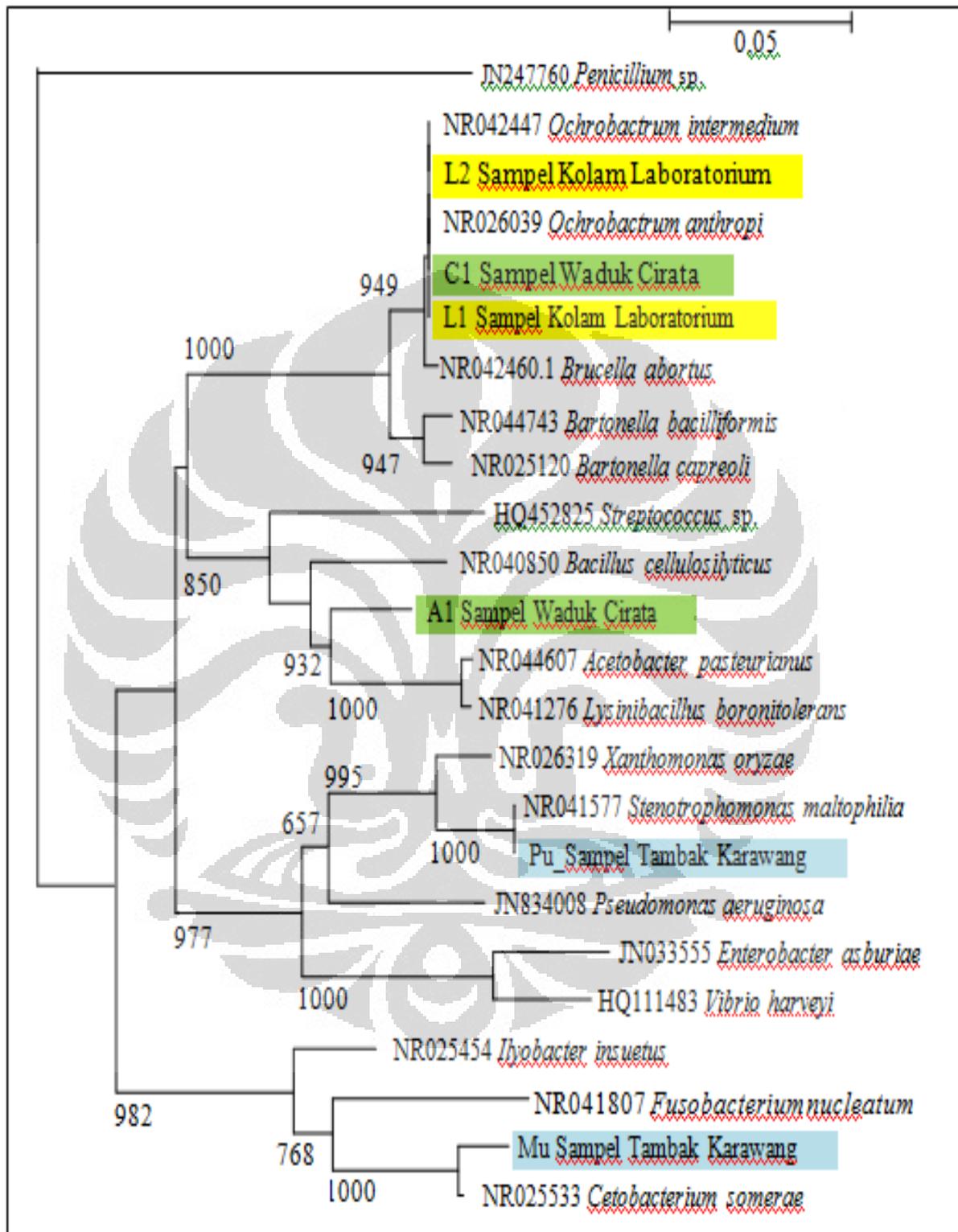
Gambar 4.1.6(3). Visualisasi verifikasi sisipan gen 16S rRNA

4.1.7 Hasil DNA sequencing

Hasil *sequencing* pada sampel dari Kolam Laboratorium PTPP, Serpong (klona L1 dan L2), sampel Tambak ikan nila salin, Karawang (klona Mu dan Pu) dan sampel KJA Waduk Cirata, Purwakarta (klona A1 dan C1), dilakukan secara parsial menggunakan primer 1541R dan menghasilkan data basa nukleotida dalam bentuk elektroferogram (Lampiran 5). *Sequencing* klona L1, L2, Mu, Pu, A1, dan C1 berturut-turut menghasilkan jumlah basa sebesar 747, 726, 948, 602, 605, dan 602. Data basa nukleotida tersebut kemudian digunakan untuk mengidentifikasi spesies bakteri dalam usus ikan nila dengan program *online* BLAST (Tabel 4.1.7). Keseluruhan klona bakteri usus ikan nila berdasarkan gen 16S rRNA berhasil dianalisis melalui program BLAST (Tabel 4.1.7). Kumpulan data dari *Genbank* yang diperoleh, kemudian dianalisis untuk konstruksi pohon filogenetik (Gambar 4.1.7).

Tabel 4.1.7. Hasil identifikasi klona bakteri usus ikan nila

No	Klona	Spesies dengan similaritas tertinggi (Bold)	Max Identity (%)	Accession number	Kelompok Filogenetik
1	L1.a	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	100	NR026039	α -proteobacteria
2	L1.b	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	100	NR042447	α -proteobacteria
3	L1.c	<i>Brucella abortus</i>	99	NR042460	α -proteobacteria
4	L1.d	<i>Bartonella capreoli</i>	98	NR025120	α -proteobacteria
5	L1.e	<i>Bartonella bacilliformis</i>	97	NR044743	α -proteobacteria
6	L2.a	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	99	NR042447	α -proteobacteria
7	L2.b	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99	NR026039	α -proteobacteria
8	L2.c	<i>Bartonella capreoli</i>	97	NR025120	α -proteobacteria
9	Mu.a	<i>Cetobacterium somerae</i>	94	NR025533	Fusobacteriales
10	Mu.b	<i>Ilyobacter insuetus</i>	90	NR025454	Fusobacteriales
11	Pu.a	<i>Stenotropohomonas maltophilia</i>	99	NR041577	γ -proteobacteria
12	Pu.b	<i>Xanthomonas oryzae</i>	98	NR026319	γ -proteobacteria
13	A1.a	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	93	NR041276	Bacillales
14	A1.b	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	92	NR044607	α -proteobacteria
15	A1.c	<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	92	NR040850	Bacillales
16	C1.a	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	100	NR026039	α -proteobacteria
17	C1.b	<i>Brucella abortus</i>	99	NR042460	α -proteobacteria
18	C1.c	<i>Bartonella capreoli</i>	98	NR025120	α -proteobacteria



Gambar 4.1.7. Pohon filogenetik bakteri usus ikan nila

4.2 Pembahasan

4.2.1 Analisis isolasi usus ikan nila

Langkah pertama yang dilakukan dalam penelitian adalah isolasi usus ikan nila. Panjang usus yang diisolasi adalah 5 cm dari anus yang merupakan daerah penyerapan zat makanan, dan berbatasan langsung dengan lingkungan perairan, sehingga diduga memiliki kepadatan bakteri flora normal yang cukup tinggi (Leano *dkk.* 2005: 1582). Usus yang diambil juga masih mengandung feses ikan nila, karena diduga terdapat bakteri yang mungkin akan disebarkan melalui proses ekskresi ikan nila.

4.2.2 Analisis hasil amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan metode PCR *Direct Kit Polymerase Mix*

Isolasi DNA bakteri dalam usus ikan nila dilakukan dengan metode amplifikasi langsung Terra PCR *Direct Kit Polymerase Mix* [Clontech]. Metode tersebut langsung menggunakan organ usus yang disuspensikan dengan Terra PCR *Direct Polymerase Mix* untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA, tanpa melalui proses ekstraksi DNA terlebih dahulu. Terra PCR *Direct Kit Polymerase Mix* dapat bekerja dengan baik meskipun terdapat inhibitor PCR, serta dapat menguatkan *template* dengan GC-konten yang lebih besar dari 70%, sehingga campuran *polymerase* memiliki sensitifitas yang tinggi (Clontech 2010: 5).

Ukuran fragmen DNA yang diperoleh menunjukkan terdapat pita sebesar 1550 pb dari gen 16S rRNA. Menurut Clarridge (2004: 842), ukuran gen 16S rRNA adalah 1550 pb. Gen 16S rRNA yang didapatkan diyakini berasal dari sampel usus ikan nila, karena pada saat proses isolasi usus dilakukan sterilisasi terlebih dahulu menggunakan alkohol 70 % pada alat-alat yang dipakai, sehingga mengurangi kontaminasi dari mikroorganisme lain. Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa gen 16S rRNA dari usus ikan nila berhasil diperoleh.

4.2.3 Analisis hasil purifikasi gen 16S rRNA

Ukuran pita DNA hasil purifikasi sama dengan hasil amplifikasi yaitu 1550 pb, namun ketebalan pita DNA, konsentrasi dan kemurnian hasil purifikasi lebih rendah dibandingkan dengan hasil amplifikasi. Hal tersebut diakibatkan karena proses purifikasi dapat mengurangi konsentrasi DNA karena campuran seperti protein, lipid, dan sisa reaksi enzimatik dipisahkan dari DNA, sehingga DNA menjadi murni namun konsentrasi berkurang (Iznaga *dkk.* 2007: 1). Gen 16S rRNA terpapar sinar UV saat pemotongan gel pada tahap purifikasi, hal tersebut membuat sebagian DNA terdegradasi. Menurut Clark & Christopher (2001: 1), pemaparan terhadap UV dapat menyebabkan perubahan fungsi DNA dan merupakan salah satu faktor yang menyebabkan DNA dapat terdegradasi.

4.2.4 Analisis hasil transformasi gen 16S rRNA

Tahap pengklonaan dilakukan untuk memperbanyak gen 16S rRNA bakteri (Snyder & Champness 1997: 124). Fragmen gen 16S rRNA hasil purifikasi (DNA target) yang berukuran 1550 pb disisipkan ke dalam vektor pGEM-T *easy* (Promega). Vektor pGEM-T *easy* memiliki T-*overhangs* pada situs penyisipan yang meningkatkan efisiensi ligasi dengan mencegah re-sirkularisasi dari vektor (Promega 2010: 2).

Hasil ligasi gen 16S rRNA dengan vektor (DNA rekombinan) ditransformasikan ke dalam sel kompeten. Sel kompeten adalah sel yang memiliki kemampuan untuk mengikat dan mengambil berat molekul dari gen target 16S rRNA (Singh *dkk.* 2010: 562). Sel kompeten yang digunakan adalah bakteri *E. coli* DH5 α . *E. coli* DH5 α digunakan karena mendukung replikasi dari primer M13 yang digunakan sebagai verifikasi plasmid rekombinan, selain itu DH5 α memiliki akseptor alfa yang dibutuhkan untuk reaksi penapisan biru putih (Taylor *dkk.* 1993: 1678).

Koloni *E. coli* dapat tumbuh pada medium SOB padat karena memiliki gen resistan ampisilin yang terdapat pada vektor pGEM-T *easy* (Strachan & Read 1999: 81). Keberhasilan proses pengklonaan dapat dilihat dari warna koloni *E. coli* yang tumbuh pada medium SOB padat. Menurut Wong (1997: 53), pengklonaan dikatakan

berhasil apabila terdapat klon berwarna putih yang tumbuh. Koloni yang berwarna putih adalah koloni yang memiliki fragmen gen 16S rRNA karena telah berhasil diligasi dengan vektor pGEM-T *easy*. Koloni tersebut berwarna putih karena tidak terdapat zat warna yang dapat membuat koloni menjadi berwarna biru. Zat warna berasal dari hidrolisis X-gal oleh enzim β -galaktosidase. Gen 16S rRNA yang disisipkan pada vektor pGEM-T *easy* membuat gen *lacZ* tidak dapat mengekspresikan enzim β -galaktosidase, sehingga X-gal tidak terhidrolisis dan tidak dihasilkan zat warna (Griffiths *dkk.* 1996: 421).

Jumlah klon positif yang diperoleh pada proses pengklonaan dipengaruhi oleh efisiensi transformasi sel kompeten yang digunakan. Melalui metode *heat shock*, efisiensi transformasi sel kompeten yang didapatkan berkisar antara $5,36 \times 10^6$ -- $9,37 \times 10^6$ cfu/ μ g (contoh perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 3). Menurut Mandel & Higa (1970: 160), nilai efisiensi transformasi dengan metode *heat shock* berkisar antara 10^5 hingga 10^6 , sehingga dapat dikatakan bahwa efisiensi transformasi vektor pGEM-T *easy* ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α pada penelitian cukup tinggi. Semakin tinggi nilai efisiensi transformasi akan meningkatkan kemungkinan sel kompeten untuk mengambil DNA rekombinan, sehingga peluang sel kompeten tumbuh lebih banyak.

Verifikasi penyisipan gen 16S rRNA menggunakan siklus amplifikasi PCR untuk klon hampir sama dengan program amplifikasi gen 16S rRNA, namun hanya dibedakan pada waktu siklus pra-denaturasi yang lebih lama yaitu 96 °C selama 10 menit. Hal tersebut dilakukan untuk melisis dinding sel bakteri *E. coli*, sehingga DNA dapat keluar dari sel dan akan terdenaturasi. Verifikasi klon berwarna putih yang positif ditunjukkan dengan munculnya pita DNA yang berukuran 1550 pb.

4.2.5 Analisis hasil isolasi DNA rekombinan

Isolasi DNA rekombinan bertujuan untuk menyeleksi dan mendapatkan plasmid pGEM-T *easy* rekombinan yang mengandung sisipan gen 16S rRNA yang diinginkan. Klon positif, kemudian ditumbuhkan pada 4 ml medium SOB cair dalam tabung reaksi yang ditambahkan 4 μ l ampisilin kemudian diinkubasi selama 16

jam pada suhu 37 °C. Hal tersebut dilakukan untuk mendapatkan jumlah kopi vektor yang cukup banyak (Promega 2008: 10--11).

Berdasarkan hasil pengamatan, seluruh sampel kultur menjadi keruh. Keruhnya medium tersebut disebabkan tumbuhnya koloni bakteri *E. coli*. Kultur bakteri tersebut tumbuh karena mengandung plasmid yang resistan terhadap ampisilin (Promega 2003: 15). Kultur cair yang menjadi keruh diisolasi plasmid dengan *minipreparation*. Hasil isolasi plasmid menunjukkan keseluruhan koloni hasil transformasi yang diindikasikan sebagai plasmid rekombinan memiliki pola pita berukuran di atas 10000 pb. Pita DNA tersebut muncul karena konformasi dari DNA plasmid yang berbentuk *nicked circular* sehingga ketika bermigrasi pada gel agarosa berjalan sangat lambat (Sambrook & Russell 2001a: 5.5).

Berdasarkan visualisasi hasil elektroforesis, terlihat bahwa pita DNA rekombinan yang muncul pada keseluruhan sampel tidak begitu terang dan terdapat pola *smear* pada gel elektroforesis. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi DNA rekombinan yang kecil karena molekul DNA yang terdegradasi akibat kontaminasi (Fermentas 2007: 448). Oleh karena itu, dilakukan proses amplifikasi DNA rekombinan menggunakan primer 9F dan 1541 R untuk memperoleh salinan gen 16S rRNA yang lebih banyak untuk proses *sequencing*.

4.2.6 Analisis identifikasi bakteri dalam usus ikan nila berdasarkan gen 16S rRNA

Keanekaragaman genetik bakteri dalam usus ikan nila dilakukan dengan cara menganalisis gen 16S rRNA. Menurut Madigan *dkk.* (2010: 35), gen 16S rRNA banyak digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik karena urutan basa nukleotida di antara molekul-molekul rRNA dapat dibandingkan dengan tepat, sehingga memudahkan untuk mengidentifikasi keragamannya. Gen 16S rRNA pada bakteri memiliki tingkat *similarity* yang tinggi karena terdapat pada semua prokariot. Beberapa alasan tersebut yang membuat gen 16S rRNA dipilih untuk digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik.

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA adalah primer 9F dan 1541R [1stBase] yang merupakan primer yang digunakan pula pada penelitian Bahrani-Mougeot *dkk.* (2008: 1589). Primer 9F akan mengamplifikasi gen 16S rRNA

pada posisi 9--27, sedangkan primer 15R akan mengamplifikasi gen 16S rRNA pada posisi 1541--1525. Kedua primer tersebut dapat digunakan untuk mengamplifikasi *full length* dari gen 16S rRNA. Analisis data hasil DNA *sequencing* dari gen 16S rRNA yang berasal dari isolat bakteri dalam usus ikan nila kemudian dikumpulkan dengan data dari *Genbank*. *Sequence* kemudian dibandingkan dengan *sequence* acuan, yaitu *Ochrobactrum anthropi strain CNS 2-75 16S ribosomal RNA partial sequence* (Velasco *dkk.* 1998: 759). Berdasarkan hasil analisis BLAST, didapatkan beberapa spesies bakteri dengan nilai *max identity* yang tinggi dari ke-6 klon.

Sampel L1 dan L2 berasal dari Kolam Laboratorium PTPP, Serpong. Klon dari sampel L1 diidentifikasi sebagai bakteri *Ochrobactrum anthropi* dengan nilai *max identity* sebesar 100 %, sedangkan klon dari sampel L2 diidentifikasi sebagai bakteri *Ochrobactrum intermedium* dengan nilai *max identity* 99 %. Genus *Ochrobactrum* tergolong ke dalam kelompok bakteri Gram negatif dengan kisaran lebar ukuran sel antara 0,6--1,2 μm dan panjang 2 μm . Bakteri tersebut termasuk bakteri aerob obligat, tidak menghasilkan spora dan bersifat non-fermentatif. *Ochrobactrum* dapat menghasilkan enzim β -galaktosidase yang berfungsi memudahkan pencernaan laktosa menjadi glukosa di dalam usus, sehingga diduga berpotensi sebagai probiotik. Dilaporkan bahwa *Ochrobactrum anthropi* memiliki kadar virulensi yang rendah, sehingga tidak berbahaya bagi tubuh inang (Teyser & Jumas-Bilak 2011: 659--660).

Genus *Ochrobactrum* diketahui merupakan bakteri yang umum ditemukan pada penelitian, karena frekuensi penemuannya cukup tinggi. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ringo *dkk.* (2006: 837), bahwa genus *Ochrobactrum* yang merupakan bakteri yang umum ditemukan pada saluran pencernaan ikan. Teyser & Jumas-Bilak (2011: 659--660), juga melaporkan bahwa ditemukan beberapa spesies dari genus *Ochrobactrum* yang berasal dari beberapa hewan, seperti rayap dan kalajengking.

Kolam Laboratorium PTPP, Serpong diketahui memiliki kondisi lingkungan yang terkontrol dan memiliki sistem sirkulasi air yang baik. Bakteri yang ditemukan pada lingkungan tersebut pun merupakan bakteri yang umum dijumpai. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Madigan (2012: 38), bahwa filum Proteobacteria merupakan filum terbesar dalam domain bacteria yang keseluruhan anggotanya merupakan bakteri Gram-negatif dan umum terdapat pada lingkungan air, tanah, dan

saluran pencernaan makhluk hidup. Sebagian bakteri dalam filum proteobacteria cukup penting dalam regulasi siklus kehidupan. Diketahui bahwa proses endosimbiosis untuk membentuk mitokondria berawal dari bakteri α -proteobacteria, sehingga diduga kelompok bakteri tersebut sudah ada di dalam usus ikan nila sejak diintroduksi ke Indonesia (Madigan 2012: 38).

Klona L1 dan L2 dari Kolam Laboratorium PTPP pada saat dianalisis menggunakan BLAST juga memiliki tingkat similaritas yang tinggi terhadap spesies bakteri *Brucella abortus*, karena memiliki nilai *max identity* 98 %. Menurut Bathe *dkk.* (2005: 272), genus *Ochrobactrum* dan *Brucella* memiliki kesamaan yang tinggi karena perbedaan basa yang tidak signifikan, sehingga memiliki nilai *max identity* yang hampir sama. Meskipun sama dalam tingkat gen, namun memiliki fungsi yang berbeda antar keduanya, karena diketahui genus *Brucella* merupakan bakteri yang memiliki tingkat patogenitas yang tinggi, khususnya *Brucella abortus* (Richey & Harrel 1997: 1). Meskipun spesies dengan tingkat similaritas tinggi yang ditemukan beragam dalam satu habitat Kolam Laboratorium PTPP, namun spesies-spesies tersebut masih berada dalam satu filum proteobacteria dari kelompok α -proteobacteria (Gupta 2000: 367).

Sampel Mu dan Pu berasal dari Tambak ikan nila salin, Karawang. Klona dari isolat Mu diidentifikasi sebagai bakteri *Cetobacterium somerae* dengan nilai *max identity* 94 %. Genus *Cetobacterium* merupakan kelompok bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang. Bakteri tersebut masih dapat hidup pada kondisi lingkungan dengan sedikit oksigen dan menghasilkan produk utama asam berupa asam asetat dari metabolisme karbohidrat dan protein. Selain itu, produk asam berupa asam butirat, propionat, laktat dan suksinat juga dapat dihasilkan tetapi dengan konsentrasi yang lebih rendah (Finegold *dkk.* 2003: 180). Asam-asam tersebut berperan penting untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan merusak membran terluar dari bakteri patogen yang umumnya termasuk kelompok Gram negatif (Alakomi *dkk.* 2000: 2003--2004). Selain *Cetobacterium somerae*, klona dari isolat Mu juga memiliki similaritas tinggi terhadap spesies bakteri *Ilyobacter insuetus* dan *Fusobacterium nucleatum* dengan nilai *max identity* 90 %. Keduanya berasal dari kelompok Fusobacteriales.

Klona dari sampel Pu diidentifikasi sebagai bakteri *Stenotrophomonas maltophilia* dengan nilai *max identity* sebesar 99 %. *Stenotrophomonas* termasuk ke dalam kelompok bakteri γ -proteobacteria Gram negatif dengan karakteristik berbentuk batang dan berukuran antara 0,5--1,5 μm . Bakteri tersebut hanya dapat tumbuh pada lingkungan yang tersedia oksigen dengan kondisi suhu optimal 35 °C (Denton & Kerr 1998: 58). Du *dkk.* (2011: 1958) melaporkan bahwa enzim protease *Stenotrophomonas maltophilia* yang diisolasi dari usus ikan lele dan diujikan pada mencit, menyebabkan kerusakan pada limpa, lambung dan usus mencit tersebut, sehingga diduga spesies tersebut memiliki potensi sebagai bakteri patogen.

Klona Pu juga memiliki tingkat similaritas yang tinggi terhadap spesies bakteri *Xanthomonas sp.* dan *Pseudomonas sp.* Genus *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* dan *Pseudomonas* berasal dari kelompok bakteri γ -proteobacteria. Kelompok tersebut biasanya ditemukan pada lingkungan oligotrofik seperti pada sedimen dan perairan laut dengan kondisi salinitas di atas 5 ppt (Gray & Herwig 1996: 4049). Hal tersebut sesuai dengan apa yang ditemukan pada lingkungan Tambak Ikan Nila salin Karawang yang memiliki kondisi perairan payau dengan nilai salinitas di antara 5--10 ppt.

Isolat A1 dan C1 merupakan isolat yang berasal dari KJA Waduk Cirata, Purwakarta. Klona dari isolat C1 diidentifikasi sebagai bakteri *Ochrobactrum anthropi* dengan nilai *max identity* sebesar 100 %. Pembahasan mengenai spesies *Ochrobactrum anthropi* telah dijelaskan sebelumnya. Sedangkan klona dari isolat A1 diidentifikasi sebagai bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* dengan nilai *max identity* sebesar 93 %. Bakteri *Lysinibacillus* berasal dari kelompok bakteri Bacillales yang bersifat motil, berbentuk batang, dan termasuk ke dalam bakteri Gram positif. Sel tersebut memiliki panjang berkisar antara 3,0--5,0 μm dan lebar antara 0,8--1,5 μm . Karakteristik dari bakteri tersebut adalah adanya asam amino lisin dan asam aspartat yang menyusun dinding sel *Lysinibacillus*. Spesies *Lysinibacillus boronitolerans* merupakan bakteri yang mampu hidup pada medium dengan kadar boron 0--100mM, yang bersifat toksik bagi sel hidup di atas ambang batas tertentu (Ahmed *dkk.* 2007: 1117,1121).

4.2.7 Analisis filogeni bakteri dalam usus ikan nila

Pohon filogenetik secara umum membentuk 4 *cluster* berdasarkan hubungan kekerabatan di antara isolat. *Cluster* pertama menjelaskan tentang isolat L1 dan L2 yang berasal dari Kolam Laboratorium PTPP, serta isolat C1 yang berasal dari KJA Waduk Cirata memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium*, dan *Brucella abortus* yang ditandai dengan nilai *bootstrap* sebesar 949. Ketiga spesies bakteri tersebut berada dalam satu *cluster* karena susunan basa yang hampir mirip, sehingga dimasukkan dalam satu kelompok bakteri proteobacteria. Kedekatan antara isolat L1, L2, dan C1 dengan genus *Ochrobactrum* dalam pohon filogeni memberikan dugaan bahwa klon memiliki potensi yang sama sebagai penghasil enzim galaktosidase yang berfungsi memudahkan pencernaan laktosa menjadi glukosa di dalam usus, sehingga berpotensi sebagai probiotik (Hoar *dkk.* 1979: 22).

Cluster kedua menjelaskan bahwa isolat A1 yang berasal dari KJA Waduk Cirata memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Lysinibacillus boronitolerans* dan *Acetobacter pasteurianus*. Nilai *bootstrap* di antara isolat menunjukkan skor yang tinggi yaitu 932. Meskipun berkerabat dekat dalam pohon filogeni, namun isolat bakteri yang didapat pada sampel A1 lebih beragam karena kedudukan taksonominya yang berbeda berdasarkan bentuk morfologinya. Diketahui bahwa *Lysinibacillus boronitolerans* berasal dari kelompok bakteri Bacillales dan *Acetobacter pasteurianus* berasal dari kelompok α -proteobacteria. *Lysinibacillus boronitolerans* merupakan bakteri berbentuk basil yang diketahui bersifat patogen. Bakteri tersebut berada dalam satu *cluster* dengan *Streptococcus* yang merupakan salah satu bakteri patogen yang banyak ditemukan pada ikan nila (Laporan Insentif Riset 2010). Berdasarkan kedekatan antara isolat A1 dengan bakteri *Lysinibacillus boronitolerans*, memberikan dugaan bahwa di dalam usus ikan nila juga terdapat bakteri patogen yang berbahaya bagi inang, maupun organisme lain.

Cluster ketiga menjelaskan bahwa isolat Pu yang berasal dari Tambak ikan nila salin Karawang memiliki kekerabatan yang dekat dengan bakteri *Stenotrophomonas maltophilia* dan *Xanthomonas* sp. yang berasal dari kelompok γ -proteobacteria. Hal tersebut ditandai dengan nilai *bootstrap* di antara isolat yaitu

sebesar 995. Bakteri-bakteri tersebut juga berada dalam satu *cluster* bersama *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan bakteri patogen (Kim *dkk.* 2001: 743). Berdasarkan kedekatan antara isolat Pu dengan bakteri *Stenotrophomonas maltophilia* dalam pohon filogeni, memberikan dugaan bahwa terdapat bakteri patogen dalam usus ikan nila di Tambak ikan nila salin Karawang. Diketahui bahwa lingkungan habitat pada tambak yang memiliki salinitas mempengaruhi komposisi bakteri di dalam usus ikan. Menurut Handelsman (2007: 11) perairan laut yang memiliki nilai salinitas tinggi merupakan relung ekologi terbesar dari bakteri. Tambak yang langsung berhubungan dengan perairan laut mengindikasikan keanekaragaman yang cukup luas pada habitat Tambak.

Cluster keempat menjelaskan bahwa isolat Mu yang berasal dari Tambak ikan nila salin Karawang memiliki kekerabatan yang dekat dengan bakteri *Cetobacterium somerae*. Nilai *bootstrap* di antara isolat memiliki kekerabatan yang sangat tinggi yaitu 1000. Berdasarkan kedekatan antara isolat Mu dengan bakteri *Cetobacterim somerae*, memberikan dugaan bahwa dalam sampel usus ikan nila di Tambak Karawang mengandung bakteri probiotik yang dapat memproduksi asam laktat (Alakomi *dkk.* 2000: 2003--2004).

Berdasarkan hasil analisis dari keseluruhan *cluster* yang terbentuk, terlihat bahwa sampel bakteri pada Kolam Laboratorium PTPP memiliki kekerabatan yang dekat dengan sampel bakteri pada KJA Waduk Cirata. Hal tersebut dibuktikan dengan posisi sampel bakteri dari kedua habitat tersebut berada dalam 1 *cluster* besar. Hasil tersebut diduga karena kondisi habitat yang hampir mirip, yaitu sama-sama memiliki jenis perairan air tawar, dengan kondisi suhu dan pH yang hampir sama pula (Lampiran 7), sehingga diduga komposisi bakteri dalam usus ikan nila pun hampir sama dalam susunan genetiknya. Sementara pada Tambak ikan nila salin Karawang yang memiliki rentang salinitas 5--10 ppt menyebabkan bakteri yang ditemukan adalah bakteri yang memiliki toleransi terhadap salinitas, sehingga *cluster* yang terbentuk pada pohon filogenetik memiliki jarak perbedaan yang cukup signifikan terhadap sampel dari Kolam Laboratorium PTPP maupun KJA Waduk Cirata.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Terdapat keanekaragaman genetik bakteri dari usus ikan nila yang dianalisis melalui teknik metagenom *sequence-based*, yaitu ditemukan 4 spesies bakteri dengan tingkat similaritas tertinggi, yaitu *Ochrobactrum anthropi* (isolat L1, L2, C1), *Lysinibacillus boronitolerans* (Isolat A1), *Stenotrophomonas maltophilia* (isolat Pu) dan *Cetobacterium somerae* (Isolat Mu).
2. Berdasarkan hasil BLAST dan analisis pohon filogeni terlihat perbedaan keanekaragaman bakteri pada setiap habitat yang dipengaruhi oleh perbedaan kondisi lingkungan.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan *full length sequencing* terhadap isolat (L1, L2, Mu, Pu, A1, C1) yang diperoleh, agar hasil BLAST lebih spesifik.
2. Perlu dilakukan *sequencing* lebih banyak lagi terhadap isolat yang positif dari penelitian ini, untuk menambah informasi mengenai bakteri dari usus ikan nila.

DAFTAR REFERENSI

- Affandi, R., D. S. Sjafei, M. F. Rahardjo & Sulistiono. 2004. *Fisiologi Ikan, pencernaan dan penyerapan makanan*. Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor: 215 hlm.
- Agrawal, S. 2008. *Techniques in molecular biology*. International Book Distributing, Co., Lucknow: 329 hlm.
- Ahmed, I., A. Yokota, A. Yamazoe, & T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitplerans* and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus sphaericus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Biology Microbiology* **57**: 117--1125.
- Al-Harbi, A. H. & N. Uddin. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brakish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*: 566--572.
- Alakomi, H. L., E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala & I. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* **6** (5): 2001--2005.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York: xxxviii + 12.10 + AL.29 + 17 hlm.
- Bahrani-Mougeot, F. K., B. J. Paster, S. Coleman, S. Barbuto, M. T. Brennan, J. Noll, T. Kennedy, P. C. Fox & P. B. Lockhart. 2007. Molecular analysis of oral and respiratory bacterial spesies with ventilator-associated pneumonia. *Journal of Clinial Microbiology*: 1588--1593.
- Bathe, S., W. Achouak, A. Hartmann, T. Heulin, M. Schloter & M. Lebuhn. 2005. Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum* spp. *Microbiology Ecology* **56**: 272--280.
- Brojo, M. 1999. Kariotipe dan pola protein ikan mujair (*Oreochromis mossambicus* (Peters) Trewavas) dan ikan nila (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas). *Jurnal Ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia* **4**(2): 19--33.

- Campbell, N. A., J. B. Reece & L. G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Terj. dari *Biology*, oleh Lestari, R., E. I. M. Adil, N. Anita, Andri, W. F. Wibowo, & W. Manalu. Erlangga, Jakarta: xxi + 438 + A-6 + F-2 + G-29 + I-7 hlm.
- Clark, W. & K. Christopher. 2001. An introduction to DNA: Spectrofotometry, degradation, and the 'Frankengel' experiment. *Tested Studies for Laboratory Teaching* **22**: 81--99.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence for identification of bacteria on clinical microbiology and infections disease. *Clinical Microbiology Reviews* **17**(4): 840--862.
- Clontech. 2010. *Terra PCR direct polymerase mix user manual*. Clontech Laboratory, Inc, California: 9 hlm.
- Cowan, D., Q. Meyer, W. Stafford, S. Muyanga, R. Cameron & P. Wittwer. 2005. Metagenomic gene discovery: past, present, and future. *Trends in Biotechnology* **23**: 321--329.
- Culligan, E. P., C. Hill & R. D. Sleator. 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathogens* **1**(19): 1--12.
- Denton, M., & K. G. Kerr. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**: 57--80.
- DKPD Sulteng (=Dinas Kelautan dan Perikanan Daerah Provinsi Sulawesi Tengah). 2011. *Petunjuk teknis pembenihan dan pembesaran ikan nila*. CV. Simplex, Palu: 29 hlm.
- Du, Z. J., X. L. Huang, K. Y. Wang, Y. Q. Deng, D. F. Chen, Y. Geng & X. M. Su. 2011. Pathology of extracellular protease of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from channel catfish (*Ictalunes punctatus*) to mice. *African Journal of Biotechnology* **10**(10): 1953--1958.
- Dwidjoseputro, D. 2005. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Djambatan, Jakarta: xii + 214 hlm.
- Fatimah, I. 2005. Isolasi bakteri proteolitik dari pencernaan ikan nila galur GIFT (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Trewavas) dan karakterisasi protease ekstraselulernya. Review skripsi S1-Departemen Biologi, FMIPA IPB, Bogor: vii + 8 hlm.

- Fermentas. 2007. Restriction enzymes. (?). 2 hlm.
<http://www.fermentas.com/catalog/re/index.html#Restriction%20Enzymes>, 2 April 2011, pk: 09.05.
- Finegold, S. M., M. L. Vaisanen, D. R. Molitoris, T. J. Tomzynski, Y. Song, C. Liu. 2003. *Cetobacterium somerae* sp. nov. From human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. *System Application Microbiology* **26**: 177–181.
- Gandjar, I., R. K. Isworo, M. Wibowo & S. Lanita. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA-UI, Depok: vii + 87 hlm.
- Gray, J. P. & R. P. Herwig. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Application of Environmental Microbiology* **62**: 4049--4059.
- Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin & W. M. Gelbart. 1996. *An introduction to genetic analysis*. 6th ed. W.H. Feeman and Company, New York: ix + 915 hlm.
- Gupta, R.S. 2000. Phylogeny of Proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and to eukaryotes. *FEMS Microbiology* **24**: 367--402.
- Haetami, K., Abun & Y. Mulyani. 2008. Studi pembuatan probiotik (*Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, dan *Sacharomices cereviceae*) sebagai *feed suplement* serta implikasinya terhadap pertumbuhan ikan nila merah. Laporan penelitian- Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjajaran: viii + 46 hlm.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomic to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**(4): 669--685.
- Handelsman, J. 2007. *The new science of metagenomics: Revealing the secrets of our microbial planet*. The National Academic Press, Washington DC: xii + 152 hlm.
- Hoar, W. S., D. J. Randall & J. R. Brett. 1979. *Fish Physiology. Vol VIII. Ed Bioenergetic and Growth*. Academic Press Inc: 786 hlm.

- Hooper, L.V., T. Midtvedt & J. I. Gordon. (2002). How host microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review Nutrition* **22**: 283--307.
- IT IS (=Integrated Taxonomic Information System). 2011. *Oreochromis niloticus*. Februari 2011: 1 hlm.
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=688444, 20 Februari 2011, pk. 13.00.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Menguk dunia mikroorganisme*. CV. Yrama Widya, Bandung: 256 hlm.
- Iznaga, A. B., M. C. Frontera, J. R. Uramis, J. B. T. Gonzales & Y. M. Gonzales. 2007. DNA removal from a purification process of recombinant hepatitis B surface antigen. *Electronic Journal of Biotechnology* **10**(1): 38--47.
- Jung-Hoon, Y., L. Jung-Sook, S. Yong, P. Yong-Ha & T. L. Sung. 1997. Reclassification of *Nocardioides simplex* ATCC 13260, ATCC 19565, and ATCC 19566 as *Rhodococcus erythropolis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**(3): 904--907.
- Karsono, A. H. 2007. Penggunaan teknik metagenom *sequence-based* untuk melihat keanekaragaman bakteri pada sampel usus rayap *Hypotermes* sp. (Wasman). Skripsi S1-Departemen Biologi, FMIPA UI, Depok: vii + 109 hlm.
- Kim, S. W., K. R. Peck, S. I. Jung, Y. S. Kim, S. Kim, N. Y. Lee & J. H. Song. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* as a potential cause of antibiotic associated diarrhea. *Korean Medical Science Journal* **16**: 742--744.
- Klug, W. S. & M. R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice-Hall Englewood, New Jersey: xvi + 773 hlm.
- Leano, E. M., G. D. Lio-Po, L. A. Nadong, A. C. Tirado, R. B. Sabada & N. G. Guanzon Jr. 2005. Mycoflora of the green water culture system of tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture research* **36**: 1581--1587
- Lorenz, P. & C. Schleper. 2002. Metagenome a challenging source of enzyme discovery. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **19**(20): 13--19.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2010. *Brock biology of microorganisms*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River: xix + 991 hlm.

- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl & D. P Clark. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. Benjamin Cummings, Inc., San Fransisco: xxviii + 1040 + A1 + A-5 + G1 + P1 + I1 hlm.
- Mandel, M & A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* **53**: 159--162.
- Muladno. 2002. *Teknologi rekayasa genetika*. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor: vii + 120 hlm.
- NCBI (=National Center for Biotechnology Bioinformation). 2011. The BLAST sequence analysis tool. (?): 1 hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 22 Februari 2011, pk. 20.15.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Inc., New York: xiv + 333 hlm.
- Pangastuti, A. 2006. Definisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16S rRNA dan gen penyandi protein. *Biodiversitas* **7**(3): 292--296.
- Prihatman, K. 2000. Budidaya ikan nila. 14 hlm.
<http://www.warintek.ristek.go.id/perikanan/air%20tawar/nila.pdf>. 23 Maret 2011, pk. 19:20.
- Pearson, W. R., G. Robins & T. Zhang. 1999. Generalized neighbor-joining: More reliable phylogenetic tree reconstruction. *Molecular Biology Evolution* **16**(6): 806--816.
- Promega. 1999. *Technical manual pGEM-T and pGEM-T easy vector systems*. Promega, Madison: 29 hlm.
- Promega. 2003. Cloning. (?). <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cloning/>. 12 Desember 2011, pk. 15.20.
- Promega. 2010. *Technical manual pGEM-T and pGEM-T easy vector systems*. Promega, Madison: 27 hlm.
- Richey, E. J. & C. D. Harrel. 1997. *Brucella abortus disease (brucellosis) in beef cattle*. University of Florida, Gainesville: 6 hlm.
- Riesenfeld, C. S., P. D. Schloss & J. Handelsman. 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial community. *Annual Review Genetics* **38**: 525--553.

- Ringo, E., S. Sperstad, R. Myklebust, S. Refsti & A. Krogdahl. 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standart soybean meal and bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* **261**: 829--841.
- Sahu, M. K., N. S. Swarnakumar, K. Sivakumar, T. Thangaradjou & L. Kannan. 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology* **48**: 299--308.
- Saitou, N. 1995. Methods for building phylogenetic trees of genes and species. *Dalam: Griffin, A. M. & Griffin, H. (eds.). 1995. Molecular biology: Current innovation and future trends part 2.* Horizon Scientific Press, Wymondham: 115--135.
- Saitou, N. 1996. Computer methods for macromolecular sequence analysis. *Methods in Enzymology* **266**: 427--447.
- Saitou, N & M. Nei. 1987. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology Evolution* **4**(4): 406--425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxviii + 7.87 hlm + I.47.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A. 14.1 + R.22 + 1.44 hlm.
- Schmeisser, C., H. Steele & W. R. Streit. 2007. Metagenomics with non-culturable microbes. *Appllication Microbiology and Biotechnology* **75**: 955--962.
- Singh, B., T. K. Bhat, N. P. Kurade & O. P. Sharma. 2008. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: a microbiological and biotechnological perspective. *Indian Journal of Microbiology* **48**: 216--227.
- Singh, B.D. 2009. *Biotechnology: Expanding horizons*. 2nd ed. Kalyani Publishers, New Delhi: xxxix + 919 hlm.
- Singh, M, A., Yadav, X. Ma & E. Amoah. 2010. Plasmid DNA transformation in *Escherichia coli*: Effect of heat shock temperature, duration and cold

- incubation of CaCl₂ treated cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* **6**(4): 56--568.
- Snustad, D. P. & M. J. Simmons. 2003. *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: xix + 840 hlm.
- Snyder, L. & W. Champness. 1997. *Molecular genetics of bacteria*. ASM press, Washington D. C: xxii + 503 hlm.
- Strachan, T & A. P. Read. 1999. *Human molecular genetics*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., NY: xxiii + 576 hlm.
- Streit, W. R. & R. A. Schmitz. 2004. Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Elsevier* **7**: 492--498.
- Sugita, H., K. Oshima, M. Tamura & Y. Deguchi. 1983. Bacterial flora in the gastrointestinal of fresh water fishes in the river. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **49**: 1387--1395.
- Tamarin, R.H. 2002. *Principles of genetics*. 7th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xvi + 609 hlm.
- Tapia-Paniagua, S. T., M. Chabrillon, P. Diaz-Rosales, I. G. de la Banda, C. Lobo, M. C. Balebona & M. A. Morinigo. 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbiology Ecology* **60**: 310--319.
- Taylor, R. G., D. C. Walker & R. R. McInnes. 1993. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparation used for sequencing. *Nucleic Acid* **21**(7): 1677—1678.
- Teyser, C. & E. Jumas-Bilak. 2011. *Ochrobactrum*. Dalam Dongyou Liu. Detection human bacterial pathogens. CRC Press, 659--670 hlm.
- Tu, Z., G. He, K. X. Li, M. J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao, D. P. Liu, H. Ye, J. Shi & X. Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* **8**(1): 114--120.
- Uddin, M. S. 2007. Mixed cultured of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in peryphyton based-ponds. PhD Thesis, Wageningen University, Netherlands: vi + 207 hlm.

- Uria, A. R., Y. N. Fawzia & E. Chasanah. 2005. Eksplorasi enzim mikroba dari lingkungan laut melalui pendekatan metagenomika. *Jurnal WPPI* **11**(7): 17--24.
- Vandamme, A. 2003. Basic concepts of molecular evolution. *Dalam*: Salemi, M. & A. Vandamme (eds). 2003. *Basic concepts of molecular evolution: A practical approach to DNA and protein phylogeny*. Cambridge University Press, Cambridge: 1--23.
- Velasco, J., C. Romero, I. Lopez-Goni, J. Leiva, R. Diaz & I. Moriyon. 1998. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *International Journal Systematic Bacteriology*: 759--768.
- Weaver, N. A. & P. W. Hedrick. 1997. *Genetics*. 3rd ed. Wm. C. Brown Publisher, Dubuque: xvi + 638 hlm.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman & W. J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Prokaryotes National Academic Science* **95**: 6578--6583.
- Wiadnya, D. G. R., Y. Hartati, Suryanti, Subagyo & A. M. Hartadi. 2000. Periode pemberian pakan yang mengandung kitin untuk memacu pertumbuhan dan produksi ikan gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. **6**(2): 62--67.
- Wong, D. W. S. 1997. *The ABC of gene cloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.
- Yun, J. & S. Ryu. 2005. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX, as a way to improve it. *Microbial Cell Factories* **4**(8): 1--5.
- Zoetendall, E. G., B. Cheng, S. Koike & R. I. Mackie. 2004. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Intestinal Microbiology* **5**: 31--48.

Lampiran 1.
Pembuatan larutan *buffer* dan medium

Larutan <i>buffer</i> dan medium	Komposisi	Cara pembuatan
TNES-Urea <i>lysis buffer</i> volume 10 ml	Tris HCl 10 mM, NaCl 125 mM, EDTA 10 mM, SDS 10%, urea 8M, dan akuades steril.	Tris HCl 10 mM sebanyak 0,1 ml, NaCl sebanyak 125 mM, EDTA 10 mM sebanyak 0,2 ml, SDS 10% sebanyak 0,5 ml, dan urea 8M sebanyak 5 ml dicampurkan dan dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 2,95 ml.
TE <i>buffer</i>	Tris-Cl 1M pH 7,5, EDTA 500 mM pH 8 dan akuades steril.	Tris-Cl 1M pH 7,5 sebanyak 10 ml/liter dan EDTA 500 mM pH 8 sebanyak 2 ml/liter dicampurkan dan dilarutkan dengan akuades steril.
Luria Bertani (LB) cair	Trypton, <i>yeast extract</i> , NaCl, dan akuades	Sebanyak 2,5 g tripton, 1,25 g <i>yeast extract</i> , 1,25 g NaCl dicampurkan dan dilarutkan dengan akuades steril, dipanaskan dalam <i>microwave</i> selama 4 menit, campuran disterilisasi dengan <i>autoclave</i>
SOB cair	Trypton, <i>yeast extract</i> , NaCl 1 ml, KCl 250 mM, dan akuabides	2 g tripton, 0,5 g <i>yeast extract</i> , 0,05 g NaCl 1 ml dan KCl 250 mM, dicampurkan dan dilarutkan dengan akuabides sebanyak 200 ml kemudian ukur pH 7 dengan 1 M KOH. Campuran diaduk hingga homogen dengan menggunakan <i>magnetic stirrer</i> . Larutan SOB cair tersebut kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

SOB padat	Trypton, <i>yeast extract</i> , NaCl, KCl 250 mM, dan akuabides.	2 g tripton, 0,5 g <i>yeast extract</i> , 0,05 g NaCl 1 ml dan KCl 250 mM, dicampurkan dan dilarutkan dengan akuabides sebanyak 200 ml kemudian diatur pH 7 dengan 1 M KOH. Campuran diaduk hingga homogen dengan menggunakan <i>magnetic stirrer</i> . Larutan SOB cair yang telah memiliki pH netral kemudian diberikan bubuk agar sebanyak 2% dari volume larutan SOB cair yang dibuat. Larutan tersebut kemudian dipanaskan di <i>microwave</i> hingga bubuk agar larut sempurna. Larutan SOB padat tersebut kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.
SOC cair	tripton, <i>yeast extract</i> , NaCl, KCl 250 mM, dan akuabides.	Trypton 2 g, <i>yeast extract</i> 0,5 g, NaCl 0,05 g, KCl 250 mM 1 ml, dicampurkan dan dilarutkan dengan akuabides sebanyak 200 ml, kemudian diatur pH 7 dengan 1 M KOH. Campuran diaduk hingga homogen dengan menggunakan <i>magnetic stirrer</i> . Larutan SOC kemudian disterilisasi dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Glukosa 1M steril ditambahkan sebanyak 2 ml setelah larutan SOC tersebut disterilisasi.

[Sumber: Ausubel *dkk.* 2002: A.2.3; Sambrook & Russell 2001: A1.1-- A2.12.]

Lampiran 2.

Data morfologi ikan nila dari 3 lokasi pengambilan sampel

Karamba Jaring Apung (KJA) Waduk Cirata, Purwakarta			
Sampel	Panjang usus (cm)	Berat (g)	Panjang Total Tubuh (cm)
A	5	84,78	15,5
B	5	75,4	17
C	4	105,5	17,5
D	5	73,8	15,5
E	3	73,6	15,5
F	5	93,3	16,5
G	6	101,4	17
H	5	139,8	19
Tambak Ikan Nila Salin, Karawang			
Sampel	Panjang usus (cm)	Berat (g)	Panjang Total Tubuh (cm)
SF	4	150,8	19,5
Mu	4	108,4	19
RN	5	139,8	19
Pu	4	174,6	15
Kolam Laboratorium PTPP, Serpong			
Sampel	Panjang usus (cm)	Berat (g)	Panjang Total Tubuh (cm)
L1	5	107,29	18
L2	6	100,79	18,5
L3	5	106,9	19
L4	5	101,69	18,6
L5	6	93,52	18
L6	4	86,57	17,5
L7	5	160,53	22,5
L8	5	202,42	23

Lampiran 3.

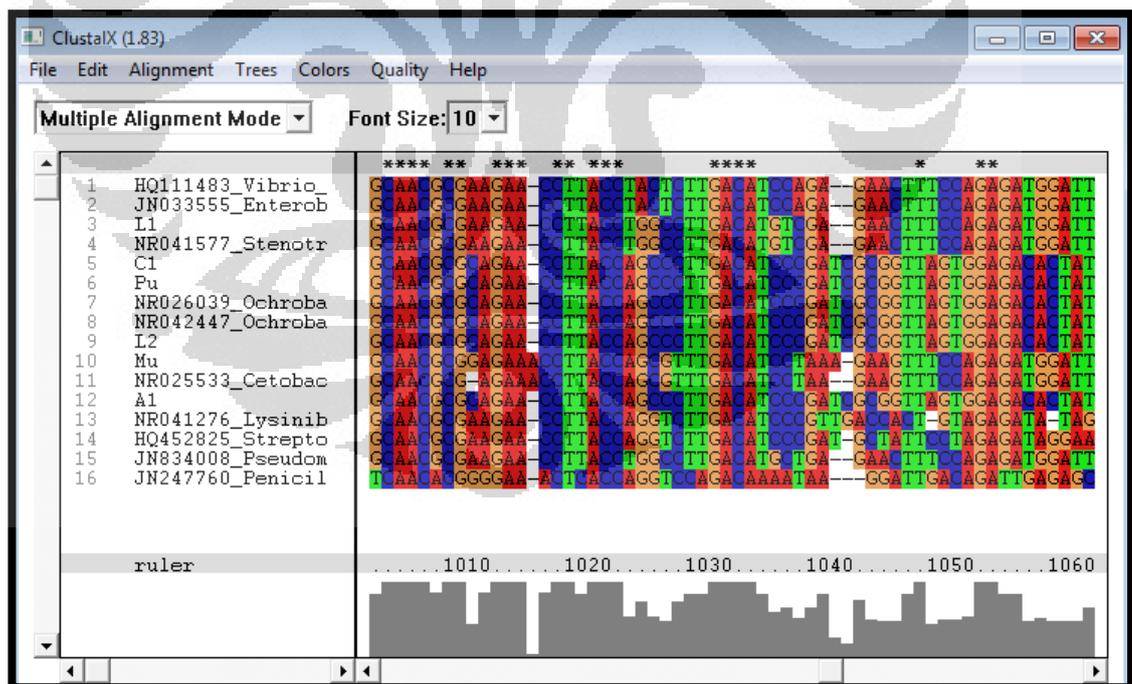
Perhitungan efisiensi transformasi sampel L1

$$\text{Efisiensi transformasi} = \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{rasio pengenceran} \times \text{vol. Total}}{\text{vol. kultur} \times \text{konsentrasi DNA plasmid } (\mu\text{g})}$$

Transformasi vektor rekombinan ke dalam *Escherichia coli* DH5 α

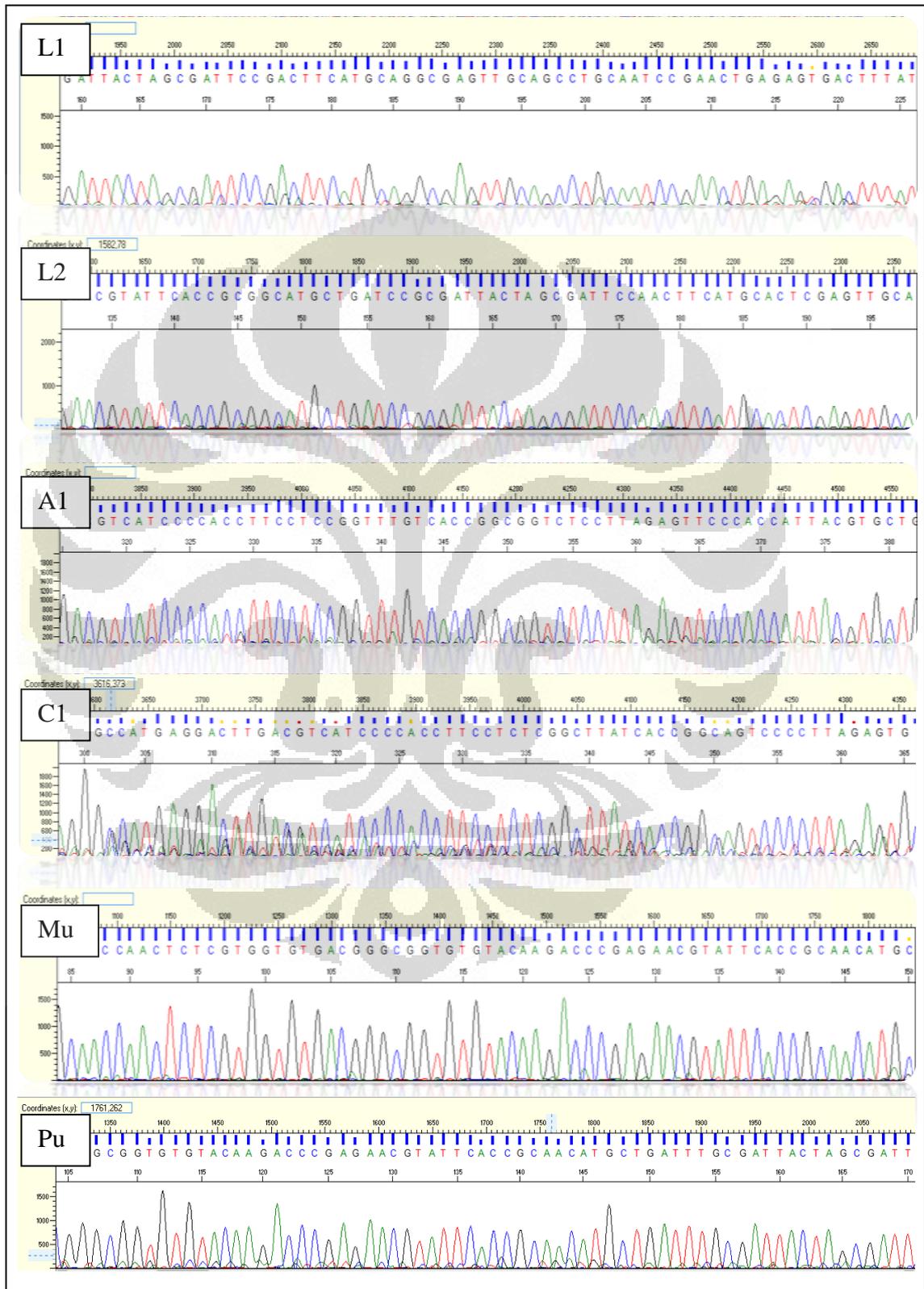
$$\begin{aligned} \text{Efisiensi transformasi} &= \frac{375 \times 1000 \times 1000/200}{0,20 \mu\text{g}} \\ &= 9,3 \times 10^5 \text{ cfu}/\mu\text{g} \end{aligned}$$

Lampiran 4.

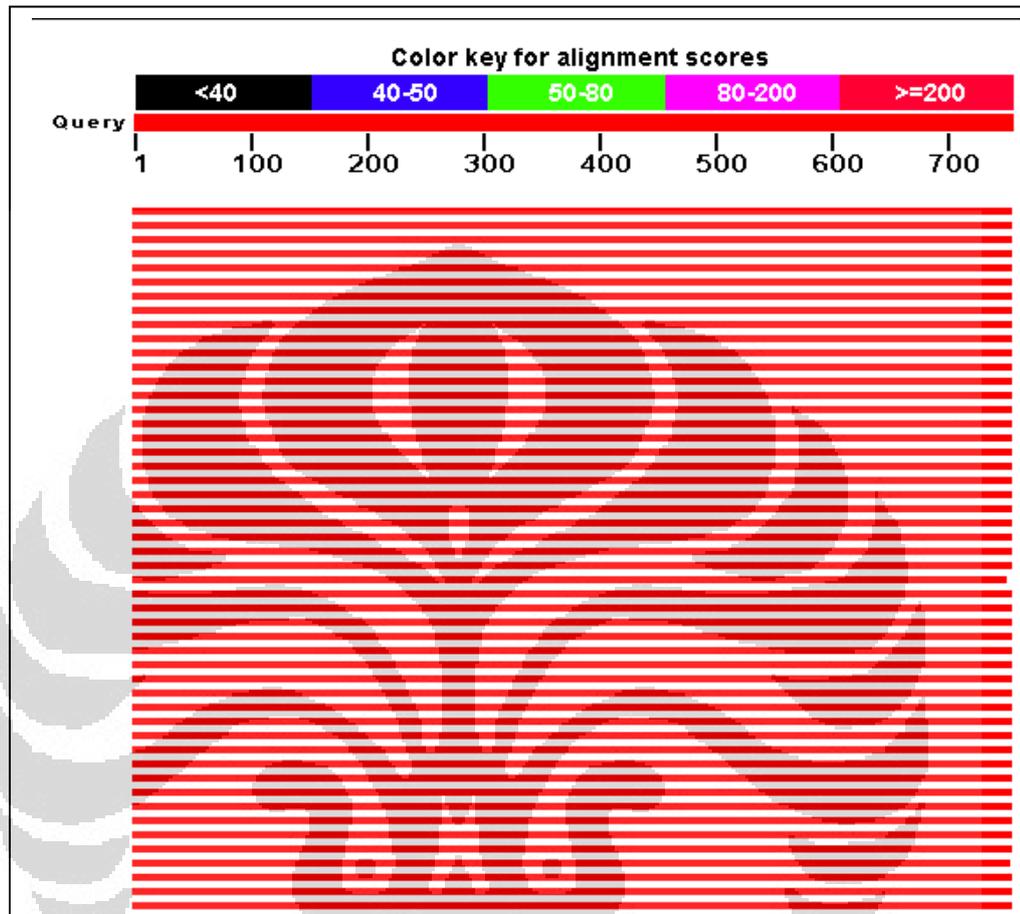
Hasil *alignment* sampel dengan ClustalX 1.83

Lampiran 5.

Elektroferogram isolat L1, L2, A1, C1, Mu, Pu dengan primer 1541R



Lampiran 6.
Homologi Isolat L1 dengan Data *Genbank*



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NR_041577.1	Stenotrophomonas maltophilia strain IAM 12423 16S ribosomal RNA, partial sequence	1314	1314	100%	0.0	99%	View
NR_042568.1	Stenotrophomonas humi strain : R-32729 16S ribosomal RNA, partial sequence	1310	1310	100%	0.0	99%	View
NR_041957.1	Stenotrophomonas maltophilia strain LMG 981 16S ribosomal RNA, partial sequence	1301	1301	100%	0.0	99%	View
NR_042569.1	Stenotrophomonas terrae strain : R-32768 16S ribosomal RNA, partial sequence	1296	1296	100%	0.0	99%	View
NR_024709.1	Show report for NR_042569.1 geniculata strain ATCC 19374 16S ribosomal RNA, partial sequence	1292	1292	100%	0.0	99%	View
NR_025305.1	Pseudomonas hibiscicola strain ATCC 19867 16S ribosomal RNA, partial sequence	1290	1290	100%	0.0	99%	View
NR_025305.1	Stenotrophomonas nitritireducens strain L2 16S ribosomal RNA, partial sequence	1288	1288	100%	0.0	99%	View
NR_040804.1	Stenotrophomonas maltophilia strain ATCC 19861 16S ribosomal RNA, complete sequence	1288	1288	100%	0.0	98%	View
NR_025104.1	Stenotrophomonas acidaminiphila strain AMX 19 16S ribosomal RNA, partial sequence	1278	1278	100%	0.0	98%	View
NR_028930.1	Stenotrophomonas rhizophila strain e-p10 16S ribosomal RNA, partial sequence	1269	1269	100%	0.0	98%	View
NR_028770.1	Xanthomonas cynarae strain CFBP 4188 16S ribosomal RNA, partial sequence	1256	1256	100%	0.0	98%	View
NR_026320.1	Xanthomonas populi strain LMG 5743 16S ribosomal RNA, partial sequence	1256	1256	100%	0.0	98%	View
NR_036925.1	Lysobacter enzymogenes strain 495 16S ribosomal RNA, partial sequence	1256	1256	100%	0.0	98%	View
NR_026388.1	Xanthomonas vesicatoria strain LMG 911 16S ribosomal RNA, partial sequence	1256	1256	100%	0.0	98%	View
NR_026392.1	Xanthomonas sacchari strain LMG 471 16S ribosomal RNA, partial sequence	1256	1256	100%	0.0	98%	View
NR_026387.1	Xanthomonas cucurbitae strain LMG 690 16S ribosomal RNA, partial sequence	1256	1256	100%	0.0	98%	View
NR_026319.1	Xanthomonas oryzae strain LMG 5047 16S ribosomal RNA, partial sequence	1251	1251	100%	0.0	97%	View
NR_026318.1	Xanthomonas fragariae strain LMG 708 16S ribosomal RNA, partial sequence	1251	1251	100%	0.0	97%	View
NR_026383.1	Xanthomonas vasicola strain LMG 736 16S ribosomal RNA, partial sequence	1251	1251	100%	0.0	97%	View
NR_026385.1	Xanthomonas pisi strain LMG 847 16S ribosomal RNA, partial sequence	1251	1251	100%	0.0	97%	View
NR_026391.1	Xanthomonas codiaei strain LMG 8678 16S ribosomal RNA, partial sequence	1251	1251	100%	0.0	97%	View
NR_026389.1	Xanthomonas cassavae strain LMG 673 16S ribosomal RNA, partial sequence	1249	1249	100%	0.0	97%	View
NR_026390.1	Xanthomonas bromi strain LMG 947 16S ribosomal RNA, partial sequence	1249	1249	100%	0.0	97%	View
NR_027606.1	Xanthomonas arboricola pv. juglandis strain LMG 747 16S ribosomal RNA, partial sequence	1247	1247	100%	0.0	97%	View
NR_026386.1	Xanthomonas hortorum strain LMG 733 16S ribosomal RNA, partial sequence	1247	1247	100%	0.0	97%	View

Lampiran 7.
Deskripsi lokasi pengambilan sampel



Kolam Laboratorium PTPP, Serpong

Keterangan:

1. Perairan : Tawar
2. Salinitas : 0 ppt
3. pH : 7,0--8,1
4. Suhu air : 26--29 °C



Tambak Ikan Nila Salin, Karawang

Keterangan:

1. Perairan : Payau
2. Salinitas : 5--10 ppt
3. pH : 8,9--9,1
4. Suhu air : 28--32 °C



KJA Waduk Cirata, Purwakarta

Keterangan:

1. Perairan : Tawar
2. Salinitas : 0 ppt
3. pH : 7,1--8,3
4. Suhu air : 27--30 °C

Lampiran 8.
Koloni hasil transformasi gen 16S rRNA

