

IDENTIFIKASI BAKTERI PEREDUKSI LOGAM Pb DALAM BIOREMEDIASI SAMPEL AIR SUNGAI CITARUM MENGGUNAKAN ANALISIS GEN 16S rRNA

Identification of Pb Metal Reducing Bacteria In Bioremediation from Citarum River Water Samples Using 16s rRNA Gene Analysis

Ni'matul Murtafi'ah ^{1*}

Suci Rizki Nurul Aeni ²

¹Institut Kesehatan Rajawali, Bandung, Indonesia

²Institut Kesehatan Rajawali, Bandung, Indonesia

*email: nimatul.murtafiah@yahoo.co.id

Abstrak

Teknik bioremediasi adalah upaya menghilangkan logam berat Pb dalam sampel air sungai Citarum.. Konsentrasi tinggi di semua jenis logam berat memiliki efek negatif pada lingkungan sehingga dibutuhkan bakteri pereduksi logam Pb sebagai solusi pencemaran. Bioremediasi tersebut menggunakan bakteri Bakteri diidentifikasi dengan metode molekuler yaitu teknik analisis sekuensing karna lebih akurat. Untuk mengetahui urutan nukleotida pada isolat bakteri pereduksi logam Pb serta mengetahui secara pasti spesies bakteri memiliki kemampuan sebagai pereduksi logam Pb. Metodologi yang digunakan adalah pengumpulan data primer yaitu melakukan penelitian secara langsung yaitu tahapan pemurnian bakteri melalui Teknik pewarnaan gram, koloni murni kemudian dilanjutkan ke tahap isolasi DNA. DNA hasil isolasi kemudian dielektroforesis. Hasil elektroforesis kemudian dimurnikan dan lanjutkan ke tahap sequencing. Hasil Uji kelayakan yaitu diperolehnya DNA Murni dari bakteri pereduksi, tahap selanjutnya adalah amplifikasi PCR berupa Gen 16S rRNA bakteri pereduksi Pb, Hasil penelitian dimulai pada tahap isolasi DNA diperoleh hasil kemurnian 1,80. Hasil PCR berupa amplifikasi gen 16S rRNA bakteri pereduksi Pb, Elektroforesis diperoleh hasil pita DNA berukuran ± 1400 bp. Analisis pohon filogenetik yang memiliki hasil kekerabatan 99,60% pada *Bacillus cereus* yang mempunyai kemampuan dalam mereduksi Pb. Spesies *Bacillus cereus* mampu melaksanakan mekanisme detoksifikasi terhadap efek toksik logam Pb seperti. biosorpsi, bioakumulasi, reduksi, solubilisasi, presipitasi (pembentukan kompleks ekstraseluler) dan metilasi.

Abstract

The bioremediation technique is an effort to remove the heavy metal Pb in samples of Citarum river water. High concentrations of all types of heavy metals have a negative effect on the environment so that Pb metal reducing bacteria are needed as a pollution solution. The bioremediation uses bacteria. Bacteria are identified by molecular methods, namely sequencing analysis techniques because they are more accurate. To determine the nucleotide sequence of isolates of Pb metal reducing bacteria and to know for certain which bacterial species have the ability to reduce Pb metal. The methodology used is primary data collection, namely conducting research directly, namely the stages of bacterial purification through gram staining techniques, pure colonies then proceed to the DNA isolation stage. The isolated DNA is then electrophoresed. The electrophoresis results are then purified and proceed to the sequencing stage. The results of the feasibility test were to obtain pure DNA from the reducing bacteria. The next step was PCR amplification in the form of the 16S rRNA gene of Pb reducing bacteria. The results of the research started at the DNA isolation stage and obtained a purity of 1.80. The PCR results were in the form of amplification of the 16S rRNA gene of Pb reducing bacteria. Electrophoresis obtained the results of DNA bands measuring ± 1400 bp. Phylogenetic tree analysis with 99.60% relatedness to *Bacillus cereus* which has the ability to reduce Pb. *Bacillus cereus* species are able to carry out detoxification mechanisms against the toxic effects of Pb metals such as. biosorption. bioaccumulation. reduction. solubilization. precipitation

Kata Kunci:

Timbal (Pb), Sekuensing Gen 16S rRNA, *Bacillus cereus*

Keywords:

Lead (Pb), 16S rRNA Gene Sequencing, *Bacillus cereus*

PENDAHULUAN

Akumulasi logam berat di tanah, air tanah, sedimen, dan air permukaan memberikan efek yang sangat berbahaya. Logam berat dapat terakumulasi sehingga memiliki efek negatif jangka panjang pada

ekosistem. Logam berat beracun seperti Timbal (Pb) tidak memiliki peran biologis dalam tubuh tetapi memiliki efek toksik, mutagenik serta karsinogenik pada manusia dan organisme lainnya (Anggani et al, 2022). Logam Pbyang terlarut di dalam air sangat berbahaya bagi kehidupan

organisme. Logam Pb dengan paparan yang lebih tinggi terhadap manusia dapat menyebabkan penghambatan eritrosit glutathione reductase, yang menurunkan methemoglobin dengan hemoglobin (Awad *et al*, 2015). Timbal dapat masuk ke dalam tubuh melalui air tercemar. Salah satu keberadaan cemaran Pb yaitu ditemukan dalam air sungai Citarum. Hal tersebut sesuai dengan yang dilaporkan oleh Happy, Musyamsir, dan Dhahyat (Besser *et al*, 2018) yaitu DAS sungai Citarum telah tercemar Pb dengan kadar yang cukup tinggi yaitu 0,08-0,01 mg/L.

Logam timbal sangat berbahaya bagi makhluk hidup karena bersifat karsinogenik, dapat menyebabkan mutasi, serta dapat terakumulasi dalam tubuh karena proses penguraianya lambat dan berlangsung lama (Das and Chandran, 2011). Masuknya timbal ke dalam tubuh terabsorpsi sangat lambat, sehingga terjadi penumpukan dan menjadi dasar timbulnya keracunan (Suhendrayatna, 2001). Bakteri diperlukan untuk meminimalkan kadar Pb yang tinggi. Bakteri ini disebut bakteri asli atau bakteri dari ekosistem yang telah beradaptasi dengan lingkungan aslinya sehingga memiliki kemampuan untuk mengurangi risiko penanganan lingkungan yang terkontaminasi Pb (Ahmad, 2018). Bakteri dapat diketahui kemampuannya dalam menurunkan kadar Pb melalui uji eksperimental. Identifikasi bakteri pereduksi Pb dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu metode mikrobiologi konvensional dan identifikasi berbasis molekuler. Pada metode mikrobiologi konvensional menggunakan tes fenotipe yaitu tes fisiologi, tes gram dan tes biokimia membutuhkan waktu yang lama pada saat identifikasi, sedangkan pada identifikasi berbasis molekuler melalui analisis sekuensing, waktu yang dibutuhkan jauh lebih singkat (Ihsan *et al*, 2020).

Sekuensing DNA adalah proses urutan basa nukleotida pada suatu segmen molekul DNA.

Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup (Lokapirnasari *et al*, 2017). Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida dalam fragmen DNA yang terdeteksi oleh hasil visual dari DNA yang diamplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Hasil sekuensing DNA dianalisis untuk mencari kesamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA dalam menentukan spesies bakteri (Kepel and Fatimawali, 2015).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Institut Kesehatan Rajawali. Jenis Penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif. Populasi yang diuji pada penelitian ini yaitu bakteri yang terdapat pada sungai Citarum. Sampel yang digunakan pada penelitian adalah sungai Citarum.

Data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer, data primer pada penelitian ini yaitu pengumpulan data yang dilakukan dengan cara melakukan pemeriksaan analisis sekuensing gen 16S rRNA pada isolat bakteri pereduksi logam Pb. Kemudian nukleotida yang didapatkan dianalisis lebih lanjut merujuk NCBI untuk menentukan jenis bakteri.

Isolasi DNA

Pada tahap isolasi DNA menggunakan metode Wizard Genomik DNA (Promega). Sampel kultur bakteri diambil 1 ose ditambah 1 ml aquades steril dalam tabung mikrosentrifugal 1,5 ml, dibiarkan semalam, Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang ke dalam tabung, ditambahkan 600 µl larutan lisis nuclei, dikocok dengan pipet agar sel-sel tersuspensi. Sampel diinkubasi pada suhu 80°C

selama 5 menit supaya sel menjadi lisis. Kemudian tabung dibolak-balik supaya tercampur. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, didinginkan pada suhu kamar ke dalam sampel ditambahkan 200 µl larutan protein presipitat, divortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik untuk mencampur protein presipitat dengan lisat sel. Sampel diinkubasi selama 5 menit, disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugal. Kemudian pada sampel ditambahkan 600 µl isopropanol, dicampur dengan membolak-balik tabung. Sampel disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang dan tabung dikeringkan dengan membalikkan di atas kertas tissue. Sampel ditambahkan 600 µl etanol 70% dan dikocok dengan membolak-balikkan tabung beberapa kali untuk mencuci DNA. Sampel disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 2 menit, isi tabung dituang dan dikeringkan di atas kertas tissue, dibiarkan 10-15 menit (kering anginkan), ditambahkan 100µl larutan DNA rehidrasi ke dalam tabung, diinkubasi pada suhu 4°C semalam. DNA disimpan pada suhu 2-8 °C. Setelah didapat DNA murni, dilanjutkan pada tahap PCR.

Tahap PCR

Reaksi PCR sebanyak 50 µL terdiri atas komponen 25 µL 2x MyTaq TM HS Red Mix, 1µL masing-masing primer (20µM), Water (dH₂O) 20µL dan sampel DNA 2µL, kemudian dipredenaturasi pada suhu 95°C selam 1 menit, didenaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, dengan pengulangan 35 kali, Annealing pada suhu 52°C selama 15 detik, dengan pengulangan 30 kali, Extension pada suhu 72°C selama 10 detik, dengan pengulangan 30 kali, Last Extension pada suhu 72°C selama 1 menit. Setelah diperoleh amplifikasi DNA kemudian dilakukan visualisasi menggunakan Elektroforesis.

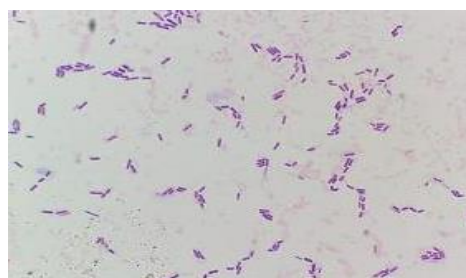
Tahap Elektroforesis

Pada tahap Elektroforesis dibuat Gel Agarosa 0,8% kemudian dipanaskan dengan menggunakan microwave. Gel Agarosa dicetak dengan menggunakan aparatus elektroforesis, Setelah gel agarose membeku, masukkan kedalam tempat elektroforesis lalu masukkan loading buffer. Sampel dimasukan masing-masing 1µL dan marker 1 µL. Di nyalakan mesin elektroforesis, set waktu sesuai kebutuhan dan tekan start. Hasil elektroforesis diamati dengan sinar UV. Setelah diperoleh pita DNA, selanjutnya dilakukan sekuensing. Sekuensing dilakukan untuk mengetahui urutan basa nukleotida menggunakan metode sanger. Penentuan urutan DNA (Sekuensing) dikirim ke 1st Base Malaysia. Sekuens yang didapat kemudian diolah menggunakan software Bio Edit, selanjutnya hasil pengolahan data dilakukan BLAST pada situs NCBI agar diperoleh jenis spesies bakteri. Kemudian dilakukan Analisis Pohon Filogenetik menggunakan software Mega XI untuk mengetahui kekerabatan antar spesies bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Penelitian diawali dari tahap pemurnian bakteri. Koloni dimurnikan dengan cara distreak ke medium NA padat dalam cawan petri. Untuk koloni murni, perlu dilakukan pewarnaan gram untuk memastikan bahwa koloni tersebut memang murni. Pewarnaan gram bakteri dapat dilihat pada gambar 1



Gambar 1. Pewarnaan isolat Pb B

Hasil pewarnaan pada preparat koloni Pb B adalah gram positif. Bakteri ini berbentuk basil. Berikut ini hasil pengamatan makroskopik bakteri isolate Pb B.

Tabel 1. Pengamatan Makroskopik Bakteri Isolat Pb B

Karakteristik Koloni	Kode Pb B
Bentuk koloni	Bulat
Warna koloni	Putih – krem
Tekstur	Smooth
Bentuk sel	Basil
Pembesaran	100x

Setelah melakukan pengamatan makroskopik dan mikroskopik, Isolat Pb B dilakukan pengujian secara biokimia diperoleh hasil uji yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengamatan Uji Biokimia pada Sampel

No	Media Uji Biokimia	Pb B
1	TSIA	K/A
2	Glukosa	+
3	Sukrosa	-
4	Laktosa	-
5	Manitol	+
6	VP	-
7	MR	+
8	Indol	-
9	Katalase	+

Berdasarkan hasil uji biokimia yang dilakukan bahwa isolate bakteri PbB dapat memfermentasikan glukosa. Uji biokimia merupakan salah satu tahapan yang harus diketahui berdasarkan sifat biokimia bakteri dalam identifikasi.

Pada tahapan identifikasi berbasis molekuler dimulai dengan tahap isolasi DNA. Prinsip isolasi DNA adalah mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen sel lainnya seperti protein dan karbohidrat. Pada isolasi DNA menggunakan metode *Wizard Genomic DNA*

Purification, Promega. Hasil isolasi DNA kromosom dari isolat Pb B diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan alat nanodrop spektrofotometer ND-1000. Tujuan pengukuran adalah untuk memastikan DNA yang akan digunakan untuk proses amplifikasi 16S rRNA dengan teknik PCR mempunyai konsentrasi dan kemurnian yang sesuai untuk amplifikasi. Hasil pemurnian dan konsentrasi DNA dapat dilihat pada Tabel 3.

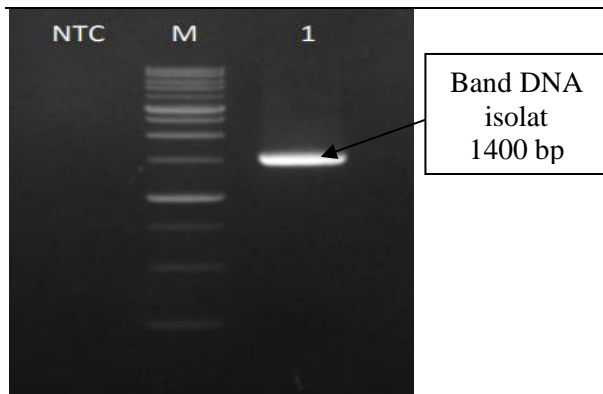
Tabel 3. Hasil Pemurnian dan Konsentrasi DNA

Kode Sampel	Konsentrasi ng/ µL	Kemurnian (260/280)
Pb B	86,4	1,80

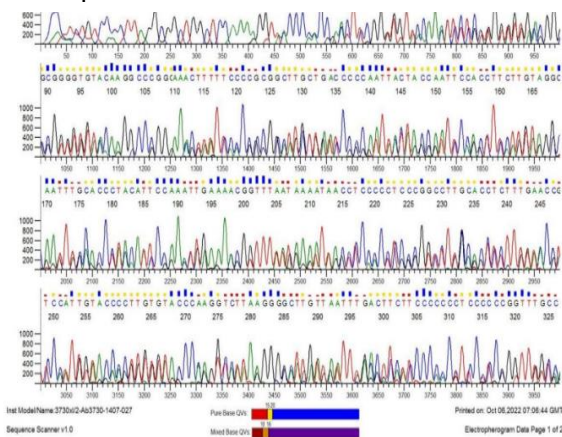
Nilai kemurnian pada sampel Pb B sebesar 1,80. DNA dapat dikatakan murni karena sesuai dengan kualitas DNA yang ditetapkan yaitu 1,8-2,0. Hal ini sesuai dengan (Jimenez-Montenegro *et al*, 2022) nilai rasio kemurnian antara 1,8 dan 2 dianggap optimal, sedangkan nilai yang lebih rendah menunjukkan adanya senyawa pencemar lainnya seperti protein.

Isolat Pb B dilanjutkan pada tahap amplifikasi PCR dari hasil isolasi DNA. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik secara cepat dalam kondisi *in vitro*.

Proses amplifikasi PCR yang dilakukan berjalan dengan baik. Pita DNA yang tebal menunjukkan konsentrasi DNA yang tinggi, dan pita yang teragregasi (tidak tersebar) menunjukkan seluruh DNA yang telah diekstraksi sepenuhnya (Irmawati, 2013). Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA pada isolat Pb B dapat dilihat pada gambar 2.

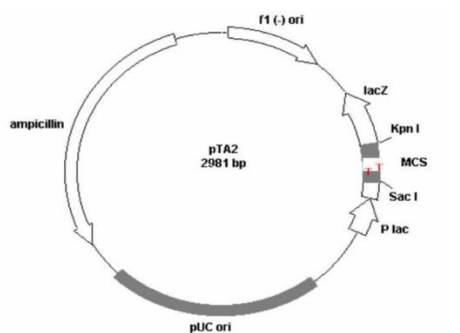


Gambar 2. Elektroforesis Hasil Amplifikasi Gen 16S rRNA pada Isolat Pb B Bakteri Pereduksi



Gambar 3. Hasil Sekuensing Produk PCR

Berdasarkan Gambar 3 Hasil Sekuensing produk PCR isolat Pb B ditemukan adanya Homopolymer yang mana mengakibatkan pembacaan menjadi noise sehingga isolat Pb B perlu dikloning. Homopolimer dapat menyebabkan kualitas rendah dari hasil pembacaan sequencing (Lott et al, 2017). Sehingga, Isolat Pb B harus dilakukan cloning gen 16S rRNA.



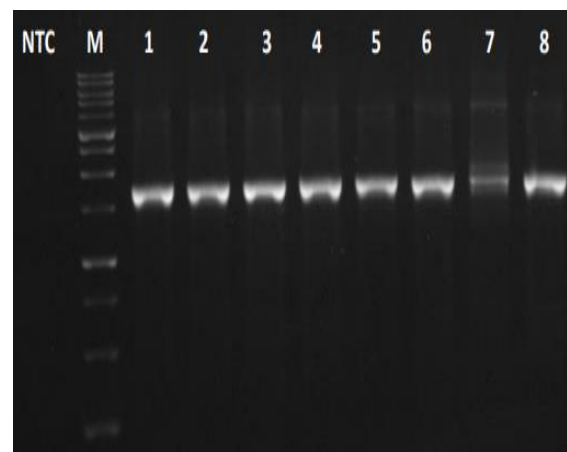
Gambar 4. Plasmid pTA2 vektor sebagai backbone pengkloningan gen 16S rRNA

Berdasarkan gambar 4 Plasmid pTA2 merupakan vector sistem ekspresi prokariot yang

memiliki promotor P lac sehingga gen sisipan dapat diekspresikan pada sel prokariot. Konsentrasi plasmid sebesar 86,4. Selain itu, pTA2 mengandung multiple cloning sites (MCS) sebagai tempat sisipan gen dengan urutan enzim restriksi sebagai berikut: EcoRI, PstI, SmaI, BamHI, SpeI, XbaI, NotI, EagI, BstXI, SacII, SacI.

Plasmid pTA2 memiliki gen resisten ampisilin ORF1996-2853 dan lacZ untuk seleksi klon pada tahap transformasi sehingga plasmid ini dapat bereplikasi pada sel bakteri karena memiliki situs replikasi pUC ori. Penanda selektif (*selectable marker*) yang terdapat pada vektor merupakan Amp^r, suatu penanda yang memampukan bakteri untuk resisten pada keberadaan antibiotic Ampisilin (Langden et al, 2017).

Hasil ligase dengan gen sisipan dengan vektor pTA2 ditransformasi ke sel *E.coli* Top10. Transformasi ini menghasilkan 8 koloni *E.coli* tumbuh pada hasil ligase, tidak terdapat koloni pada control negative (sel kompeten saja_ dan tidak ada koloni yang tumbuh pada control ligase DNA sisipan. Selanjutnya, koloni hasil ligase diseleksi dengan menggunakan metode PCR koloni menggunakan enzim DreamTaq. Hasil PCR koloni Pb B-pTA2 dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil Elektroforesis dari PCR isolat Pb B

Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan menggunakan metode dideoxy Sanger. Metode sequencing sanger

menghasilkan sekuens DNA berkualitas tinggi yang relatif panjang (500e1000 bp), dan telah lama dianggap sebagai standar referensi untuk sekuensing DNA (Besser *et al*, 2018). Urutan basa nukleotida gen 16S rRNA isolat Pb B diperoleh setelah amplikon dimurnikan dan disekuensing.

Sekuensing dibaca menggunakan program DNA Star. Perbandingan urutan basa nukleotida antara isolat Pb B dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Urutan Basa dari Isolat Pb B Pereduksi Logam

No	Kode sampel	Hasil sekuensing
I	Pb B	<p>CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTT GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGT CAAGCTCTAAACACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT CTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAG GGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTTTAACAAA ATATTAACGCTTACAATTTCCATTGCGCCATTGAGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCT CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGTAACGCCAGGGTTT TCCCAGTCACGACGTTGTAACGACGCGCCAGTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG TACCGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTCAATACT*GGTTACCTTGT ACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCACCTTAGGCGGCTGACTCCAAAAGTTACCCACCGACTTCGGGTG TTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCCGAGCATGCTGATC CGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGACGGTTTATG AGATTAGCTCCACCTCGCGTCTTGACGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATA AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCTCCGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAA CTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT GACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGAT GTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCTTGCATTAACACCATGCTCCACCGCTTGCGGGCCCCCG TCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTTCGGCCGTAATCCCGAGGTGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTA AAGGGCGGAAACCCTTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT GCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTACAGACCAGAAAGTTCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCAT ATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAAT GACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAAT AATCCGGATAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTT AGGTACCGTCAAGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGACCCGAA AGCCTTCATCACTCACGCGCGTGTCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC CCGTAGGAGTCTGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGTACGCATCGTTG CCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCG CCTTTCAATTCGAACCATGCAGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTC TTATGGGCAAGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATT GCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTA*GTATGGGAA TTCTGCAGCCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCAGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCC TTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCT CACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC</p>

Hasil dari sekuensing berupa sekuen nukleotida di analisis dengan menggunakan program BLAST

(Basic Local Alignment Search Tools) pada website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hasil dari

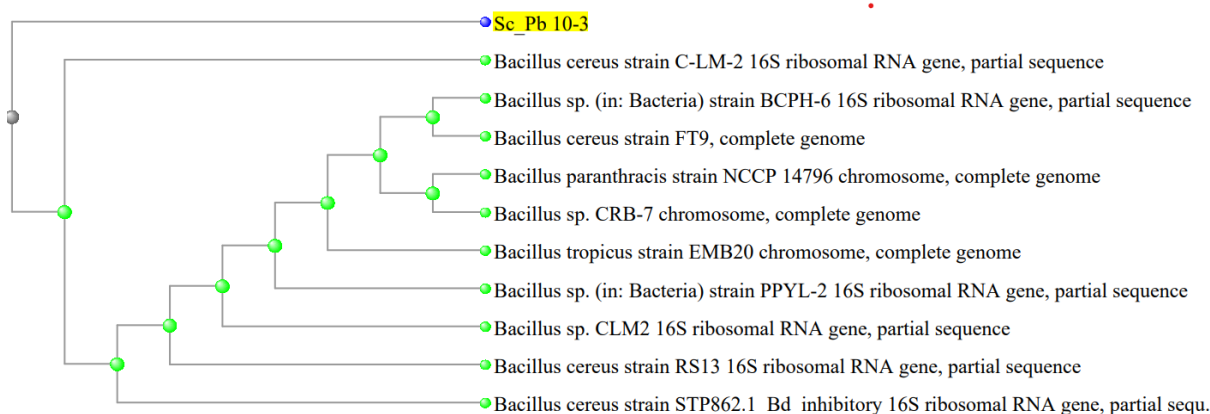
BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) dapat dilihat pada Gambar 6

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Bacillus cereus strain C-LM-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2761	2761	100%	0.0	99.60%	OL913798.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain PPYL-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2760	2760	99%	0.0	99.60%	MK691443.1
✓	Bacillus sp. CLM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2760	2760	99%	0.0	99.60%	KR362556.1
✓	Bacillus paranthracis strain NCCP 14796 chromosome, complete genome	2754	38396	99%	0.0	99.60%	CP041750.1
✓	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain BCPH-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2754	2754	99%	0.0	99.54%	MK691445.1
✓	Bacillus cereus strain RS13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2754	2754	99%	0.0	99.54%	KJ551240.1
✓	Bacillus tropicus strain EMB20 chromosome, complete genome	2754	38446	99%	0.0	99.60%	CP078081.1
✓	Bacillus cereus strain FT9, complete genome	2754	32736	99%	0.0	99.60%	CP008712.1
✓	Bacillus sp. CRB-7 chromosome, complete genome	2754	30022	99%	0.0	99.54%	CP083749.1
✓	Bacillus cereus strain STP862.1_Bd_inhibitory 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2750	2750	100%	0.0	99.47%	MT827130.1

Gambar 6. Hasil BLAST isolat Pb B Bakteri Pereduksi Logam Pb.

Gambar 6. menunjukkan hasil analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) dari bakteri Pb B adalah *Bacillus cereus* strain C-LM-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, sequence ini diambil sebagai hasil yang paling sesuai dengan strain DNA yang diperoleh karena memiliki nilai Max Score dan total score sama yaitu 2761, query coverage 100%, e-value sama dengan 0 dan max ident 99,60% Analisis filogenetik dengan

menggunakan data molekuler seperti DNA atau protein dapat menggambarkan hubungan evolusi antar spesies. Hubungan evolusi diantara sekuen digambarkan dengan menempatkan sekuen sebagai cabang luar dari sebuah pohon. Hubungan cabang pada bagian dalam pohon merefleksikan tingkat dimana sekuen yang berbeda saling berhubungan (Dharmayanti, 2011).



Gambar 7. Pohon Filogenetika Pb B Berdasarkan Perbandingan Sekuens 16S rRNA

Gambaran Filogeni tree

Pada Gambar 7. dapat dilihat bahwa bakteri *Bacillus cereus* tidak berada pada cabang maupun node yang sama dengan bakteri-bakteri yang ada dalam pohon filogenetik. Bakteri pereduksi logam Pb isolate Pb B mempunyai cabang tersendiri, terpisah dari kesepuluh bakteri yang ada dalam pohon filogenetik. Tetapi dalam tabel homologi Blast diketahui bahwa isolat Pb B mempunyai homologi sekuens 16S rRNA paling dekat dengan *Bacillus cereus*, hal tersebut menunjukkan bahwa secara filogenetik bakteri logam Pb pada sungai citarum tidak mempunyai kesamaan spesies dengan kesepuluh spesies bakteri di dalam pohon filogenetik, tetapi mempunyai kemiripan urutan basa sebesar 99,60% dengan *Bacillus cereus* strain C-LM 16 S ribosomal RNA gene. Isolat Pb B memiliki nenek moyang yang sama tetapi mengalami perubahan yang berbeda ketika berevolusi. Selain itu, bakteri isolat Pb B bukan merupakan spesies bakteri baru karena nilai homologi isolat Pb B berada pada persentase 99,60%.

B. Pembahasan

Penelitian di mulai dari tahap pemurnian bakteri. Pada penelitian ini menggunakan sampel dari sungai citarum, medium yang digunakan adalah media NA (Nutrien Agar). Koloni dimurnikan dengan cara di streak dalam medium NA pada cawan petri. Menurut Gofar (2012) Teknik ini diulang dengan cara subkultur hingga didapatkan koloni tunggal, sehingga koloni tunggal dapat di lakukan identifikasi lebih lanjut dengan karakteristik koloni bersel satu. Selanjutnya jika koloni murni selanjutnya dilakukan pewarnaan gram dan uji biokimia.

Pewarnaan gram adalah salah satu Teknik pewarnaan yang berfungsi menentukan kelompok bakteri gram positif dan gram negatif. Pewarnaan gram menggunakan kalium 4 malcolmal realgen yaitu Kristal I Violet, Iodine Lugol, Etanol 96%, dan safranin. Bakteri

yang mempunyai sifat gram positif akan berwarnakan ungu, sedangkan bakteri yang memiliki sifat gram negatif akan berwarna merah (Wulandari and Purwaningsih, 2019). Setelah dilakukan pewarnaan gram, diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Hasil pewarnaan gram bakteri pada preparat Pb B adalah gram negatif. Bakteri gram negatif ini berwarnakan merah karena sel bakteri mengikat warna safranin, bakteri tersebut memiliki bentuk batang atau basil, (Pelczar and Chan, 2019).

Pada Gram negatif, jumlah lipid yang lebih tinggi dalam pembentukan pori-pori besar sehingga memfasilitasi kebocoran kompleks kristal violet-iodin dan mengakibatkan dekolonisasi bakteri yang kemudian mengambil pewarnaan counter kompleks. Sebaliknya, dinding sel Gram positif tebal dan terutama terdiri dari protein dan mukopeptida yang berikatan silang, bila diwarnai dengan alkohol menyebabkan dehidrasi dan penutupan pori-pori dinding sel karena memiliki peptidoglikan yang tebal sehingga tidak memungkinkan hilangnya kompleks dan sel mempertahankan nod primer (Varghese, 2014). Bakteri yang mempertahankan pewarna primer tampak biru tua atau ungu dan tidak hilang warnanya bila diwarnai dengan metode Gram disebut Gram positif, sedangkan bakteri yang kehilangan kristal violet menggunakan pewarna tandingan, safranin tampak merah disebut Gram negatif (Nurhidayati et al, 2015). Bagian luar dari lapisan peptidoglikan tersusun atas lapisan lipoprotein, fosfolipid, dan polimer yang unik untuk dinding sel gram negatif yang disebut lipopolisakarida (Hamidah et al, 2019).

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan metode wizard genomik DNA. DNA yang diperoleh mempunyai kualitas baik (murni) adalah dapat digunakan untuk aplikasi molekuler lain selain proses

amplifikasi. DNA dengan kualitas baik akan dipotong oleh enzim restriksi dengan sempurna. Kalau tidak akan berdampak minimal dalam DNA yang menggagalkan kerja dari enzim restriksi. DNA yang memiliki nilai dibawah 1.8 artinya terkontaminasi protein pada DNA sampel ini diduga karena kurangnya kualitas sampel asal preparasi DNA sampel, sedangkan nilai diatas 2.0 artinya kontaminasi RNA, hal ini dibuktikan dengan munculnya pita RNA pada gel agarosa yang memiliki ukuran lebih rendah daripada DNA genom (kurang dari 250 bp). Munculnya kontaminasi RNA bisa disebabkan oleh kurangnya kualitas kerja RNA pada tahap purifikasi (Murthy, 2017).

Prinsip dari teknik PCR adalah memperbanyak bagian spesifik dengan enzim DNA polymerase yang diinisiasi oleh pelekatan primer menghubungkan deoksiribonukleotidamtrifosfat (dNTP) dalam reaksi termal (Raven and Johnson, 2018). Optimasi metode PCR perlu dilakukan untuk mengefisienkan waktu dan penggunaan material sehingga pendeteksian dapat dilakukan dengan cepat dan akurat (Joko et al, 2011). Optimasi PCR harus mencakup konsentrasi larutan yang diperlukan untuk amplifikasi, suhu hibridisasi yang diperlukan untuk setiap primer. Proses sintesis dan penggandaan DNA menggunakan PCR terdiri dari tiga tahap: *denaturation*, *annealing*, dan *extension*. Setiap tahap tersebut diatur pada kondisi suhu yang berbeda (Wicaksono, 2013).

Elektroforesis DNA gel merupakan sebuah metode untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan ukurannya (Intarapanich et al, 2015). Marker DNA yang digunakan adalah DNA ladder 1 Kb, serta di elektroforesis dengan 0,8% TBE Agarose. Kelebihan dari gel Agarosa ini lebih mudah, sederhana dan laju pemisahannya lebih cepat membentuk fragmen-fragmen dan tidak bersifat toksik (Harahap, 2018). Hasil Elektroforesis DNA divisualisasikan dengan sinar UV dan menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya

pita DNA pada ukuran ± 1400 bp. Menurut Nikunj Kumar dan Dhruvi (2012) gen 16S rRNA memiliki ukuran cukup panjang jika digunakan keperluan bioinformatika (± 1500 bp) dapat mengamplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri. Selain itu, suhu *annealing* yang telah dioptimasi pada program untuk proses amplifikasi DNA juga berjalan dengan baik.

Sekuensing yang digunakan pada penelitian ini menggunakan metode sanger. Hasil sekuensing yang diperoleh dari 1st Base Malaysia selanjutnya dianalisis pada Gen Bank menggunakan analisis BLAST. Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuens DNA dari seluruh dunia yang didepositkan pada data base Gen Bank.

Hasil BLAST tersebut berupa *Max Score* dan *Total Score*, *Query Cover*, *E- Value* dan *Identities*. *Max Score* dan *Total Score* adalah jumlah keselarasan semua segmen dari urutan data base yang cocok dengan urutan nukleotida. *Query coverage* adalah presentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan data base yang terdapat pada BLAST (Narita et al, 2014). Nilai *E-Value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuens. Maka apabila nilai E-value yang didapatkan semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin rendah, sedangkan nilai E-value yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi (Sabbathini and Pujiyanto, 2017).

Hasil BLAST menunjukkan bahwa Spesies isolat Pb B memiliki nilai Maximum score 2761, Total score 2761, Cover 100%, Identitas 99,60%, dan E-Value 0,0. Bakteri *Bacillus cereus* memiliki kemampuan dalam mereduksi logam Pb. Kemampuan bakteri dalam menurunkan konsentrasi logam berat Pb disebabkan karena kemampuan bakteri dalam mengakumulasi logam berat Pb. Bakteri memiliki permukaan sel bermuatan negatif karena terbentuk dari berbagai struktur anion seperti gugus karboksil sedangkan

logam berat adalah ion bermuatan positif sehingga dapat terjadi ikatan antara permukaan sel bakteri dan ion logam berat Pb akibat dari terjadinya tarik-menarik. Bakteri dapat mengakumulasi logam berat Pb di dalam sel membentuk ikatan antara logam berat dengan suatu protein dalam sel disebut metalotionein. Metalotionein merupakan protein pengikat logam (metal binding protein) yang berperan dalam proses pengikatan atau pengekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Yulaipei and Aunurohim, 2013).

Analisis Filogenetik adalah analisis yang bertujuan untuk menyusun hubungan filogenetik digambarkan dalam suatu garis bercabang-cabang seperti pohon disebut pohon filogenetik (Irawan, 2013). Pohon filogeni adalah suatu bentuk gambaran dari silsilah makhluk hidup seperti bakteri yang bercabang-cabang menyerupai pohon (Lubis, 2014). Analisis filogenetik menggunakan data molekuler seperti DNA atau protein dapat menggambarkan hubungan evolusi antar spesies (Dharmayanti, 2011). Pohon Filogenetik di desain menggunakan program MEGA 11, dengan menggunakan metode Neighbor-Joining. Menurut Muzzazinah (2017) metode neighbor-joining merupakan dasar pembuatan pohon filogenetik berdasarkan perbedaan antara dua sekuen dimana pohon filogenetik dengan nilai bootstrap tinggi setidaknya diatas 70% merupakan pohon filogenetik yang baik. Menurut Zein dan Sulandari (2009). Semakin panjang cabang pohon filogenetik maka semakin besar perubahan evolusi yang terjadi sehingga semakin jauh pula kekerabatannya. Pada desain pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat Pb B memiliki hubungan kekerabatan pada *Bacillus cereus*.

KESIMPULAN

Isolat Bakteri Pb B yang merupakan bakteri gram positif yang diperoleh dari hasil batch penurunan kadar logam Pb Sungai Citarum memiliki kemampuan dalam mereduksi Logam Pb serta Isolat Bakteri Pb B

memiliki kekerabatan yang sangat erat dengan bakteri *Bacillus cereus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada LLDIKTI IV yang telah memfasilitasi kegiatan hibah PDP tahun 2022 serta LPPM Institut Kesehatan Rajawali telah memberikan dukungan dalam melakukan penelitian. Ketua laboratorium Institut Kesehatan Rajawali yang telah memberikan izin penelitian di laboratorium Bakteriologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, R.Z., 2018. Mycoremediation to remove heavy metal pollution in post-mining areas for farmland utilization.
- Angraini, N., Agustina, T.E. and Hadiyah, F., 2022. Pengaruh pH dalam Pengolahan Air Limbah Laboratorium Dengan Metode Adsorpsi untuk Penurunan Kadar Logam Berat Pb, Cu, dan Cd. *Journal Ilmu Lingkungan*, 20(2), pp.345-355.
- Awad, G.E., Mostafa, H., Danial, E.N., Abdelwahed, N.A. and Awad, H.M., 2015. Enhanced production of thermostable lipase from *Bacillus cereus* ASSCRC-PI in waste frying oil based medium using statistical experimental design. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(9), pp.007-015.
- Besser, J., Carleton, H.A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R.L. and Trees, E., 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical microbiology and infection*, 24(4), pp.335-341.
- Besser, J., Carleton, H.A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R.L. and Trees, E., 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical microbiology and infection*, 24(4), pp.335-341.
- Das, N. and Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- Dharmayanti, N.L.P.I., 2011. Filogenetika molekuler: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*, 21(1), pp.1-10.

- Gofar, N., 2012. Aplikasi Isolat Bakteri Hidrokarbonoklastik asal Rizosfer Mangrove pada Tanah Tercemar Minyak Bumi. *Jurnal Lahan Suboptimal: Journal of Suboptimal Lands*, 1(2).
- Hamidah, M.N., Rianingsih, L. and Romadhon, R., 2019. Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari pedas dengan jenis ikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*, 1(2), pp.11-21.
- Harahap, M.R., 2018. Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1).
- Ihsan, Y.N., Fellatami, K., Permana, R., Mulyani, Y. and Pribadi, T.D.K., 2020. ANALISIS BAKTERI PEREDUKSI KONSENTRASI LOGAM TIMBAL Pb (CH₃COO)₂ MENGGUNAKAN GEN 16S Rrna. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 13(2), pp.151-162.
- Intarapanich, A., Kaewkamnerd, S., Shaw, P.J., Ukosakit, K., Tragoonrung, S. and Tongshima, S., 2015. Automatic DNA diagnosis for ID gel electrophoresis images using bio-image processing technique. *BMC genomics*, 16(12), pp.1-11.
- Irawan, B., 2013. *Karsinologi Dengan Penjelasan Deskriptif dan Fungsional*. Airlangga University Press.
- Irmawati. 2013 Perubahan keragaman genetik ikan kerapu tikus (*cromileptes altivelis*) generasi pertama pada stok hatchery.
- Jiménez-Montenegro, L., Mendizabal, J.A., Alfonso, L. and Urrutia, O., 2022. DNA extraction procedures and validation parameters of a real-time PCR method to control milk containing only A2 β -casein. *Food Control*, 142, p.109259.
- Joko, T., Kusumandari, N. and Hartono, S., 2011. Optimasi metode PCR untuk deteksi *Pectobacterium carotovorum*, penyebab penyakit busuk lunak anggrek. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 17(2), pp.54-59.
- Kepel, B., 2015. Fatimawali. Penentuan jenis dengan analisis gen 16SrRNA dan uji daya reduksi bakteri resisten merkuri yang diisolasi dari feses pasien dengan tambalan amalgam merkuri di Puskesmas Bahu Manado. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 23(1), pp.45-55.
- Langden, S.S., Budiharjo, A. and Kusharyoto, W., 2017. TRANSFORMASI DAN KLONING PLASMID PJ804: 77539 PADA *E. coli* TOP'10. *Jurnal Akademika Biologi*, 6(1), pp.65-70.
- Lokapirnasari, W.P., Dewi, A.R., Fathinah, A., Hidanah, S. and Harijani, N., 2017. Effect of probiotic supplementation on organic feed to alternative antibiotic growth promoter on production performance and economics analysis of quail. *Veterinary world*, 10(12), p.1508.
- Lott, S.C., Wolfien, M., Riege, K., Bagnacani, A., Wolkenhauer, O., Hoffmann, S. and Hess, W.R., 2017. Customized workflow development and data modularization concepts for RNA-sequencing and metatranscriptome experiments. *Journal of biotechnology*, 261, pp.85-96.
- Lubis, K., 2014. Cara pembuatan pohon filogeni. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 20(75), pp.66-69.
- Murtiyansih, H., 2017. Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA). *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 15(1).
- Muzzazinah, 2017. Metode filogenetik pada indigofera. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*, 25-40
- Narita, V., Arum, A.L., Isnaeni, S. and Fawzya, N.Y., 2014. Analisis bioinformatika berbasis web untuk eksplorasi enzim kitosanase berdasarkan kemiripan sekuens. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi*, 1(4), pp.197-203.
- Nikunj Kumar, B.D., Dhruvil. 2012. Molecular identification of bacteria using 16s rDNA sequencing. *Gujarat University, Gujarat, India*.
- Nurhidayati, S., Faturrahman, F. and Ghazali, M., 2015. Deteksi bakteri patogen yang berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) bergejala penyakit ice-ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*, 1(2).
- Pelczar, M.J & Chan, E.C.S, 2019 *Dasar-dasar mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.
- Raven and Johnson, 2018. Teknik Perancangan Primer Untuk Sekuen Gen Mdr-I Varian 1199 Pada Sampel Buffy Coat Pasien Anak Dengan Lla .1: 105-111.
- Sabbathini, G.C. and Pujiyanto, S., 2017. Isolasi dan identifikasi bakteri genus *Sphingomonas* dari daun padi (*Oryza sativa*) di area persawahan Cibinong. *Jurnal Akademika Biologi*, 6(1), pp.59-64.
- Suhendrayatna. 2001. Bioremoval logam berat dengan menggunakan mikroorganisme: Suatu Kajian Kepustakaan. Makalah. Disampaikan pada Seminar Bioteknologi, Kagoshima University, Tokyo.
- Varghese, N.P.P., Joy, 2014. *Microbiology Laboratory Manual Book*. Kerala Agricultural University. India.
- Wicaksono, N.B, 2013. Mesin PCR pada Instrumentasi Laboratorium Klinik.125-137
- Wulandari, D. and Purwaningsih, D., 2019. Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi *Colocasia esculenta* L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(2), pp.247-258.

- Yulaipi, S. and Aunurohim, A., 2013. Bioakumulasi logam berat timbal (Pb) dan hubungannya dengan laju pertumbuhan Ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(2), pp.E166-E170.
- Zein MSA & Sulandari S, 2009. Investigasi Asal Usul Ayam Indonesia menggunakan Sekuens Hypervariable-I D-loop DNA Mitokondria. *Jurnal Veteriner*.10(1):41 -49.