



Identifikasi Molekuler Bakteri Lipolitik Yang Diisolasi Dari Sedimen Mangrove Teluk Kendari

Muhamad Azwar Syah¹, Sulfatimah¹, Muzuni^{*1}, Yamin Yaddi², Nur Isnaini Ulfa³, Adelia Elviantari⁴

¹Prodi Bioteknologi, Universitas Halu Oleo, Kendari. muhamadazwarsyah@uho.ac.id
sulfatimahfebri220@gmail.com

Telp. +62401-3190403. muzuni_fmipa@uho.ac.id

²Jurusan Ilmu Peternakan, Universitas Halu Oleo, Kendari. yaminyaddi@gmail.com

³Proteksi Tanaman, Universitas Halu Oleo, Kendari. nurisnaini_ulfa@uho.ac.id

⁴Prodi Bioteknologi, Universitas Teknologi Sumbawa, Sumbawa. adelia.elviantari@uts.ac.id

*Koresponden Penulis e-mail :
muzuni_fmipa@uho.ac.id

Diterima: 02-04-2024

– Disetujui: 01-05-2024

- Dipublikasi: 31-05-2024

© 2024 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Halu Oleo Kendari

ABSTRACT

The study aims to isolate and molecularly identify lipolytic bacteria from mangrove sediment in Kendari Bay, Southeast Sulawesi. Lipolytic bacteria were inoculated into Nutrient Agar Rhodamin B containing an olive oil emulsion and 2% NaCl by spread plate, then incubated at room temperature for 24-48 hours. Genomics DNA was extracted using the saline tris-edta (STE) method, while 16S rRNA gene was amplified using PCR technique involving universal primers 63F and 1387R. PCR conditions consisting of pre-denaturation (94°C for 5 min), denaturation (95°C for 30 sec), primer annealing (55°C for 30 sec), extension (72°C for 1 min), and post extension (72°C for 7 min) were carried out 35 cycles. Bioinformatics analysis of 16S rRNA gene include similarity analysis using NCBI Blast, genetic distance matrix as well as phylogenetic tree reconstruction. The results revealed that two bacterial isolates (LMA1 and LMB3) exhibited lipolytic activity and had 16S rRNA gene sequence lengths of 1292 and 1283 bp, respectively. According to the results of BLAST analysis, the LMA1 isolate had a similarity value of 99.69% and a genetic distance of 0.0023 with *Vibrio fluvialis*, whereas LMB3 had a similarity value of 99.69% and a genetic distance of 0.0008 with *Acinetobacter junii*. This is also compatible with the phylogenetic tree classification of the two isolates. As a result, based on the partial 16S rRNA gene sequence, isolates LMA1 and LMB3 have the most genetic resemblance and/or are the same species as *Vibrio fluvialis* and *Acinetobacter junii*, respectively.

Key words: Lipolytic bacteria, 16S rRNA, mangrove sediment

ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri lipolitik secara molekuler yang berasal dari sedimen mangrove Teluk Kendari Sulawesi Tenggara. Bakteri lipolitik dari sedimen mangrove diinokulasi dengan menggunakan media NA rhodamin B yang mengandung emulsi minyak zaitun dan NaCl 2% dan ditumbuhkan pada suhu ruang selama 24-48 jam. Ekstraksi DNA genom isolat lipolitik dilakukan dengan menggunakan metode saline tris-edta (STE). Gen 16S rRNA diamplifikasi melalui teknik PCR dengan melibatkan primer 63F dan 1387R. Kondisi PCR terdiri dari pra-denaturasi (94°C selama 5 menit), denaturasi (95°C selama 30 detik), penempelan primer (55°C selama 30 detik), pemanjangan rantai (72°C selama 1 menit), dan post-extension (72°C selama 7 menit) yang dilakukan sebanyak 35 siklus. Analisis bioinformatika dari sekuen gen 16S rRNA isolat lipolitik terdiri dari analisis similaritas, matriks jarak genetik dan rekonstruksi pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat dua isolat lipolitik, yaitu LMA1 dan LMB3 yang diisolasi dari sedimen mangrove Teluk Kendari. Gen 16S rRNA LMA1 dan LMB3 yang berhasil diurutkan dengan aplikasi bioedit masing-masing sebesar 1292 pb dan 1283 pb. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa isolat LMA1 memiliki nilai similaritas 99.69% dan jarak genetik 0.0023 dengan *Vibrio fluvialis*, sedangkan LMB3 memiliki nilai

similaritas 99.69% dan jarak genetik 0.0008 dengan *Acinetobacter junii*. Hal ini konsisten pula dengan pengelompokan pohon filogenetik dari kedua isolat tersebut. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa berdasarkan sekuen gen parsial 16S rRNA isolat LMA1 dan LMB3 memiliki kemiripan genetik paling dekat dan/atau dapat diidentifikasi sebagai spesies yang sama masing-masing dengan *Vibrio fluvialis* dan *Acinetobacter junii*.

Kata Kunci: Bakteri lipolitik, gen 16S rRNA, sedimen mangrove

PENDAHULUAN

Eksplorasi bakteri lipolitik kini menarik perhatian besar karena mampu menghasilkan enzim lipase yang memiliki bioprospek yang besar untuk diaplikasikan pada berbagai industri bioteknologi. Enzim lipase dapat berperan sebagai biokatalis dalam produksi biodiesel, formulasi deterjen dan industri farmasi (Contesini et al. 2020; Cavalcante et al. 2021; Gurkok & Ozdal 2021; Godoy et al. 2022). Sutapa et al. (2015) memproduksi biodiesel dari minyak *Calophyllum inophyllum* L. dengan menggunakan lipase sebagai biokatalisatornya. Produksi biodiesel secara enzimatik menghasilkan biodiesel yang lebih murni dibandingkan dengan menggunakan metode kimia (Sebastian et al. 2016).

Bakteri lipolitik dapat ditemukan pada berbagai ekosistem, diantaranya pada ekosistem mangrove (Bibi et al. 2017). Komponen biota yang terdapat pada ekosistem mangrove memiliki karakteristik unik yang berbeda dengan ekosistem lainnya, diantaranya organisme yang berasosiasi pada ekosistem tersebut toleran terhadap kadar garam yang tinggi. Araujo et al. (2020) berhasil mengidentifikasi carboxylesterase novel dari bakteri yang berasal dari sedimen mangrove Brazil yang memiliki similaritas sekitar 80% dengan esterase dari Gammaproteobacteria *Porticoccus hydrocarbonoclasticus*. Selain itu, bakteri lipolitik yang diisolasi dari akar mangrove *Rhizophora apiculata* sangat beragam diantaranya *Acinetobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Xanthomonas* sp., dan *Moraxella* sp. (Varghese et al. 2023).

Sumber sampel yang dapat digunakan sebagai sumber bakteri lipolitik di ekosistem mangrove sangat bervariasi, seperti rhizosfer mangrove, tanah atau sedimen mangrove.

Beberapa penelitian melakukan skrining bakteri lipolitik dengan menggunakan media seleksi seperti nutrient agar (NA) yang ditambahkan dengan rhodamin B dan minyak zaitun. Indikator lipolitik ditandai dengan adanya pendaran fluoresens pada koloni bakteri ketika diiradiasi dengan sinar UV (Putra et al. 2019; Syah et al. 2022). Selain itu, Bibi et al. (2017) menggunakan media *tributyryl agar* untuk melihat aktivitas lipolitik pada bakteri dengan indikator terbentuknya zona bening. Kedua media seleksi tersebut dapat digunakan sebagai acuan untuk menganalisis aktivitas lipolitik secara kualitatif. Intensitas pendaran fluoresens yang tinggi atau zona bening yang luas dapat mengindikasikan aktivitas lipolitik yang baik.

Hasil skrining bakteri lipolitik dapat diidentifikasi dengan pendekatan molekuler untuk memperoleh hasil yang lebih akurat. Gen 16S rRNA masih digunakan menjadi marka molekuler utama dalam identifikasi bakteri (Bibi et al. 2017; Ramnath et al. 2017; Giri et al. 2021). Penggunaan berbagai primer menjadi salah satu perbedaan utama para peneliti dalam mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan menggunakan teknik PCR. Namun, hal tersebut tidak mempengaruhi akurasi dalam identifikasi bakteri secara molekuler. Beberapa primer yang digunakan dalam amplifikasi gen 16S rRNA, diantaranya sepasang primer 27F-1492R (Soleha & Retnaningrum 2020; Pham et al. 2021),

primer 27F-1107R (Habibollahi & Salehzadeh 2018), dan primer 63F-1387R (Susilowati et al. 2018; Syah 2022).

Analisis similaritas dan rekonstruksi filogenetik dengan menggunakan sekuen gen 16S rRNA menjadi basis data dalam penentuan identitas bakteri. Nilai similaritas 99-100% antara sampel dengan sekuen gen 16S rRNA yang terdapat di GenBank cenderung dikategorikan sebagai satu spesies yang sama. Selain itu, penentuan identitas tersebut didukung dengan hubungan filogenetik yang membentuk satu klad atau monoklad dengan nilai jarak genetik yang sangat kecil. Hal inilah yang mendasari penggunaan pendekatan molekuler dalam mengidentifikasi bakteri lipolitik yang diisolasi dari sedimen mangrove Teluk Kendari Sulawesi Tenggara.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2022 yang bertempat di laboratorium genetika dan laboratorium Biomolekuler dan Lingkungan Fakultas MIPA, Universitas Halu Oleo (UHO) Kendari. Sampel sedimen mangrove diambil di ekosistem mangrove Teluk Kendari.

Alat dan Bahan

Alat-alat utama yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: Thermal cycler ABI Applied Biosystem Veriti PCR, perangkat elektrofresis Mupid Exu, sentrifugasi, mikropipet, *spin down*, dan *waterbath*, sedangkan bahan-bahan utama yang digunakan terdiri dari: Green Taq Master Mix (Gotaq), primer 63F dan 1387R (10 ng/ul), loading dye 6x, *nutrient broth* (Merck), agarosa, fenol kloroform, minyak zaitun, polivinil alkohol (PVA), rhodamin B 0.1%, sodium asetat, etanol absolut, larutan TAE 1x (Tria-acetic EDTA) dan etidium bromida.

Prosedur Kerja

Isolasi Bakteri Lipolitik

Sampel sedimen mangrove sebanyak 10 g dimasukkan ke dalam 90 ml larutan NaCl 0.85% dan divorteks hingga homogen. Setelah itu, suspensi sampel diambil 1 ml dan dilarutkan ke dalam 9 ml larutan pengencer. Tahap ini dilakukan hingga pengenceran ke-6. Sebanyak 100 µl suspensi sampel dari pengenceran ke-5 dan ke-6 di inokulasikan ke media *nutrient agar* (NA) yang mengandung rhodamin B 0.1%, minyak zaitun, PVA 2% dan NaCl 2% dengan menggunakan metode sebar, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni bakteri lipolitik ditandai dengan adanya pendaran fluoresens ketika diiradiasi di bawah sinar UV.

Ekstraksi DNA genom

Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan menggunakan metode STE (Salt Tris EDTA) yang telah dimodifikasi (Miller et al. 1988; Morono et al. 2014). Kultur cair bakteri diambil sebanyak 1.5 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C, perlakuan ini diulang sebanyak 6 kali. Setelah dilakukan sentrifugasi, pelet diambil dan ditambahkan dengan 500 µl bufer STE serta dihomogenkan menggunakan vortex. Larutan pelet ditambahkan dengan larutan TE 500 µl dan SDS 100 µl kemudian diinkubasi di *waterbath* selama 1 jam pada suhu 60°C. Setiap 5 menit di bolak-balik untuk mengoptimalkan lisis sel. Selanjutnya, ditambahkan larutan fenol kloroform sebanyak 500 µl dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 16°C selama 15 menit. Setelah itu, supernatan diambil sebanyak 400 µL dan ditambahkan etanol absolut sebanyak 800 µl dan sodium asetat 400 µl lalu diinkubasi di dalam freezer pada suhu 4°C semalaman.

Langkah selanjutnya, larutan sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 10°C selama 15 menit, dan

supernatan dibuang serta menyisahkan pelet yang terletak di dasar mikrotub. Pelet ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 500 μ L dan disentrifugasi kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan pelet dikering-anginkan selama 15-30 menit atau bisa dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C selama 5 menit. Pelet yang telah dikeringkan ditambahkan sebanyak 30-50 μ L *nuclease free water* (NFW) sebagai ekstrak DNA genom. Keberhasilan ekstraksi DNA dapat diuji dengan proses elektroforesis.

Migrasi DNA dengan Elektroforesis

Ekstrak DNA genom sebanyak 4 μ l ditambahkan dengan 2 μ l loading dye dimasukan ke dalam sumuran gel agarosa 1% yang telah terendam oleh bufer TAE 1x dalam perangkat elektroforesis. Langkah selanjutnya, migrasi DNA dengan menggunakan elektroforesis Mupid Exu 100 volt dan arus listrik 0.4 A selama 60 menit. Gel agarosa kemudian dimasukkan ke dalam larutan etidium bromida selama 10 menit, dan ke dalam akuades selama 5-10 menit. Visualisasi dilakukan di bawah sinar UV dengan menggunakan Geldoc atau photophoresis dengan indikator keberhasilan berupa pita DNA yang berpendar.

Amplifikasi dan Sekuensing Gen Parsial 16S rRNA

Gen 16S rRNA isolat lipolitik diamplifikasi menggunakan teknik PCR dengan komposisi yang terdiri atas DNA genom 1 μ l, primer 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1387R (5'-GGCGGAWGTGTACAAGGC-3') masing-masing 0.5 μ l, *Gotaq Master Mix* 5 μ l, dan NFW 3 μ l (volume total 10 μ l). Kondisi PCR, meliputi pra-denaturasi (94°C selama 5 menit), denaturasi (95°C selama 30 detik), penempelan primer (55°C selama 30 detik), pemanjangan rantai (72°C selama 1 menit), dan *post-extension* (72°C selama 7 menit) yang dilakukan sebanyak 35 siklus dengan menggunakan PCR veriti ABI

Applied Biosystem. Hasil amplifikasi gen parsial 16S rRNA diuji dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%. Produk amplifikasi dilakukan sekuensing menggunakan metode Sanger melalui jasa PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta.

Analisis Bioinformatika

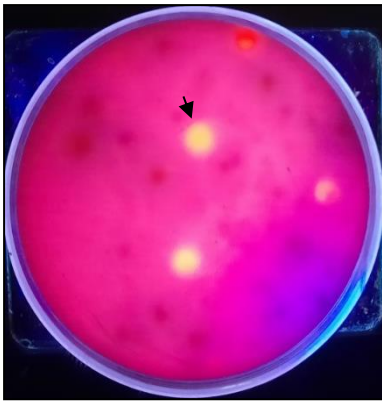
Analisis bioinformatika gen 16S rRNA meliputi pengurutan sekuen DNA, analisis similaritas, jarak genetik dan rekonstruksi filogenetik. Hasil sekuensing gen 16S rRNA diurutkan dengan menggunakan aplikasi BioEdit. Analisis similaritas dilakukan dengan membandingkan sekuen gen 16S rRNA isolat lipolitik dengan sekuen referensi yang terdapat di data GenBank melalui fitur NCBI BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tools for nucleotide*), sedangkan matriks jarak genetik dianalisis dengan pendekatan *p-distance*. Keakuratan hasil analisis similaritas memperhatikan rendahnya skor *E-value* dan tingginya nilai *query cover*. Selain itu, pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan aplikasi MEGA 6.0 dengan metode *maximum parsimony* dan *boostraps* 1000x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Lipolitik

Bakteri lipolitik dari sampel sedimen mangrove Teluk Kendari telah berhasil diisolasi dengan menggunakan media NA rhodamin B yang ditambahkan dengan minyak zaitun dan NaCl 2%. Hal ini ditandai dengan adanya koloni bakteri yang menghasilkan pendaran fluoresens ketika diiradiasi di bawah sinar UV (Gambar 1). Pendaran tersebut mengindikasikan adanya aktivitas hidrolisis substrat minyak zaitun yang terdapat pada media yang dikatalisis oleh lipase yang disekresikan bakteri lipolitik. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa aktivitas lipolitik bakteri pada media yang mengandung rhodamin B ditandai dengan terbentuknya pendaran fluoresens

(Al-Tameemi et al. 2021; Sedijani et al. 2022; Syah 2022).



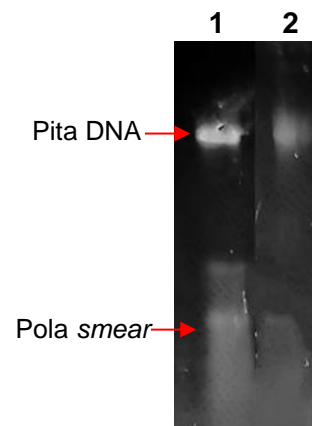
Gambar 1. Koloni bakteri lipolitik yang berpendar di bawah sinar UV yang ditumbuhkan di media NA yang mengandung rhodamin B 0.1% dan minyak zaitun

Asam lemak bebas sebagai salah satu produk hidrolisis triasilgliserol minyak zaitun membentuk kompleks dengan rhodamin B sehingga memicu terbentuknya pendaran fluoresens pada koloni bakteri ketika diiradiasi dengan sinar UV. Penambahan NaCl pada media bertujuan untuk menciptakan kondisi salinitas pada media pertumbuhan bakteri. Hasil isolasi bakteri lipolitik dari sampel sedimen mangrove Teluk Kendari diperoleh dua isolat (LMA1 dan LMB3) yang dilanjutkan pada tahap identifikasi molekuler.

Ekstraksi DNA Genom

Hasil isolasi DNA genom isolat LMA1 dan LMB3 menunjukkan adanya pita tunggal yang berpendar dan disertai dengan pola *smear* yang terdapat pada sisi bawah gel agarosa 1% ketika dielektroforesis selama 45 menit (Gambar 2). Pita tunggal yang berpendar mengindikasikan bahwa DNA genom kedua isolat tersebut telah berhasil diekstraksi dan dapat digunakan sebagai DNA cetakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA. Pendaran fluoresens terbentuk karena terjadi pembentukan kompleks DNA dengan etidium bromida sehingga ketika disinari di

bawah sinar UV akan menghasilkan pendaran.



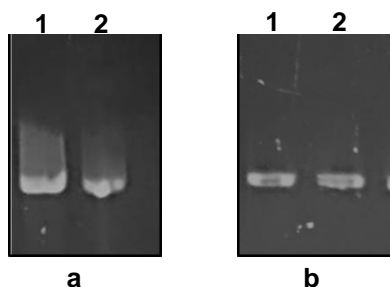
Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA Genom pada gel agarosa 1% selama 45 menit, 1: LMA1, 2: LMB3

Pola *smear* yang terdapat pada gel agarosa mengindikasikan bahwa hasil ekstrak DNA yang diperoleh masih mengandung senyawa kontaminan, seperti protein, garam-garam organik, atau molekul RNA. Hal ini dapat dipengaruhi oleh kurang optimalnya kerja fenol kloroform dalam mendegradasi protein dan tidak ada penambahan larutan RNase yang dapat menghilangkan molekul RNA selama proses ekstraksi DNA.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA isolat LMA1 dan LMB3 diamplifikasi dengan melibatkan sepasang primer universal 63F dan 1387R yang dikatalisis oleh enzim DNA Polymerase Taq (*Thermus aquaticus*). Hasil visualisasi elektroforesis pada gel agarosa 1% menunjukkan adanya pita DNA yang berpendar dengan sedikit pola *smear* pada kedua produk PCR (Gambar 3a). Hal ini mengindikasikan bahwa gen 16S rRNA kedua isolat telah berhasil teramplifikasi, namun kedua produk PCR tersebut masih perlu dioptimasi untuk meningkatkan kemurnian dan spesifisitas ampikon. Produk PCR yang masih memiliki pola

smear dapat berpengaruh terhadap kualitas hasil sekuensing DNA.



Gambar 3. Hasil visualisasi produk PCR gen 16S rRNA pada gel agarosa 1% setelah direndam ke dalam larutan etidium bromida, 1: LMA1, 2: LMB3, a: DNA genom tanpa pengenceran, b: DNA genom diencerkan 50x

Gambar 3b menunjukkan bahwa hasil visualisasi produk PCR yang memiliki pita tunggal dan tidak terdapat pola smear setelah DNA cetakan dilakukan pengenceran 50x. Pada dasarnya, konsentrasi optimal DNA genom yang dibutuhkan dalam proses PCR adalah 30-300 ng/ul. Konsentrasi DNA genom yang terlalu tinggi dapat mengganggu optimalisasi dalam amplifikasi DNA, sedangkan konsentrasi DNA genom yang terlalu rendah dapat menghasilkan produk ampikon yang rendah.

Hasil pengurutan DNA dengan menggunakan metode Sanger menunjukkan bahwa gen 16S rRNA isolat LMA1 dan LMB3 yang berhasil teramplifikasi bersifat parsial dengan ukuran masing-masing 1292 pb dan 1283 pb. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa produk gen 16S rRNA yang diamplifikasi dengan primer 63F dan 1387R memiliki ukuran \pm 1300 pb (Susilowati et al. 2018; Syah 2022).

Produk gen 16S rRNA berperan penting sebagai salah satu penyusun sub unit kecil ribosom pada bakteri. Ribosom berfungsi sebagai organel yang melakukan sintesis protein pada sel organisme. Pada dasarnya ribosom prokariotik maupun eukariot hanya disusun oleh molekul RNA dan protein-protein. Perbedaan utama kedua kelompok organisme tersebut terletak pada ukuran rRNA pada masing-masing bagian ribosom. Ribosom subunit besar disusun oleh molekul 23S rRNA dan 5S rRNA, sedangkan ribosom subunit kecil disusun oleh molekul 16S rRNA (Alzubaidy et al. 2016; Bibi et al. 2017).

Gen 16S rRNA menjadi salah satu marka molekuler yang hingga saat ini masih populer digunakan sebagai acuan standar identifikasi bakteri secara molekuler dan studi filogenetika diantara spesies bakteri. Ukuran gen 16S rRNA sekitar 1500 pb yang dapat diklasifikasikan ke dalam 4 domain. Gen ini memiliki sembilan daerah yang sangat bervariasi dengan ukuran sekitar 30-100 pb yang akan membentuk struktur sekunder (Bartram et al. 2011; Sanschagrin dan Yergeau 2014; Yang et al. 2016).

Analisis Similaritas Gen Parsial 16S rRNA

Hasil analisis similaritas gen 16S rRNA menggunakan NCBI BLASTn menunjukkan bahwa isolat LMA1 memiliki nilai similaritas 99.69% dengan bakteri *Vibrio fluvialis* strain IMP-BGBO33 (KY952877.1), sedangkan LMB3 memiliki nilai similaritas 99.69% dengan bakteri *Acinetobacter junii* strain ZM06 (CP077415.1). Hal ini mengindikasikan bahwa LMA1 dan LMB3 kemungkinan besar masing-masing satu spesies yang sama dengan *Vibrio fluvialis* dan *Acinetobacter junii*. Pada dasarnya, nilai similaritas gen 16S rRNA \geq 99% cenderung dikategorikan sebagai satu spesies yang sama, namun dalam perkembangan penelitian taksonomi bakteri masih ditemukan nilai similaritas di atas

99% dengan spesies bakteri yang berbeda. Oleh karena itu, beberapa penelitian dalam taksonomi bakteri menggunakan gen gyrase B (*gyrB*) untuk konfirmasi atau penguatan terhadap identifikasi molekuler bakteri yang melibatkan gen 16S rRNA (Corney et al. 2008; Radl et al. 2020; Dia et al. 2021).

Akurasi hasil penajajaran menggunakan NCBI Blast dapat dilihat pada beberapa parameter, seperti tingginya nilai *query cover* dan rendahnya nilai *E-value*. Nilai *query cover* pada hasil penajajaran pada masing-masing sampel sebesar 100% dengan *E-value* 0.0. Hal ini mengindikasikan bahwa hasil penajajaran pada kedua sampel tersebut akurat. Nilai *query cover* menunjukkan persentase jumlah nukleotida yang terakomodir untuk dibandingkan dengan nukleotida referensi yang terdapat pada *GenBank*. Berbeda halnya dengan *E-value* yang merupakan nilai probabilitas yang memungkinkan diperolehnya hasil yang berbeda ketika

analisis penajajaran dilakukan berulang kali. Semakin kecil nilai *E-value* maka semakin baik hasil penajajaran yang diperoleh.

Analisis Jarak Genetik

Hasil analisis jarak genetik dengan menggunakan pendekatan *p-distance* menunjukkan bahwa LMA1 memiliki jarak genetik yang paling dekat dengan *Vibrio fluvialis* strain IMP-BGBO33 (0,0023) dan yang paling besar dengan *Vibrio cholerae* strain TS-15B (0,0727), sedangkan LMB3 memiliki jarak genetik paling dekat dengan *Acinetobacter junii* strain ZM06 (0,0008). Nilai jarak genetik yang semakin kecil dapat mengindikasikan hubungan genetik yang sangat dekat. Jarak genetik tidak hanya memperlihatkan gambaran hubungan genetik antar spesies, tetapi dapat digunakan untuk mengestimasi potensi terjadinya mekanisme transfer gen antar bakteri (Ellabaan et al. 2021; Arnold et al. 2022).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. LMA1													
2. <i>Vibrio fluvialis</i> strain IMP-BGBO33 (KY952877.1)	0.0023												
3. <i>Vibrio furnissii</i> strain S1-17 (MF327706.1)	0.0031	0.0008											
4. <i>Vibrio</i> sp. strain 201707CJKOP-YL77 (MG593741)	0.0031	0.0008	0.0016										
5. <i>Vibrio vulnificus</i> strain: NBRC 15645 (AB680930.1)	0.0310	0.0285	0.0277	0.0277									
6. <i>Vibrio cholerae</i> TS15-B (LC487865.1)	0.0727	0.0701	0.0709	0.0692	0.0594								
7. LMB3	0.1911	0.1880	0.1870	0.1880	0.1917	0.1861							
8. <i>Acinetobacter junii</i> strain ZM06 (CP077415.1)	0.1902	0.1870	0.1860	0.1870	0.1907	0.1851	0.0008						
9. <i>Acinetobacter</i> sp. YC11 16S (KU353560.1)	0.1892	0.1860	0.1850	0.1860	0.1897	0.1841	0.0016	0.0008					
10. <i>Acinetobacter baumannii</i> strain O190037 (MN749519.1)	0.2065	0.2032	0.2022	0.2032	0.2129	0.1951	0.0396	0.0387	0.0379				
11. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> strain Xg2 (KF740571.1)	0.1977	0.1945	0.1935	0.1945	0.2006	0.1954	0.0456	0.0447	0.0439	0.0305			
12. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain ATCC 23055 (A.J889984.1)	0.1912	0.1881	0.1871	0.1881	0.1992	0.1934	0.0387	0.0379	0.0371	0.0355	0.0287		
13. <i>Acinetobacter haemolyticus</i> strain ATCC 17906 (HE651915.1)	0.1924	0.1892	0.1882	0.1892	0.1988	0.1935	0.0314	0.0305	0.0297	0.0255	0.0295	0.0247	

Gambar 4. Matriks jarak genetik isolat LMA1 dan LMB3 dengan bakteri referensi berdasarkan sekuen gen 16S rRNA yang dianalisis dengan pendekatan *p-distance*

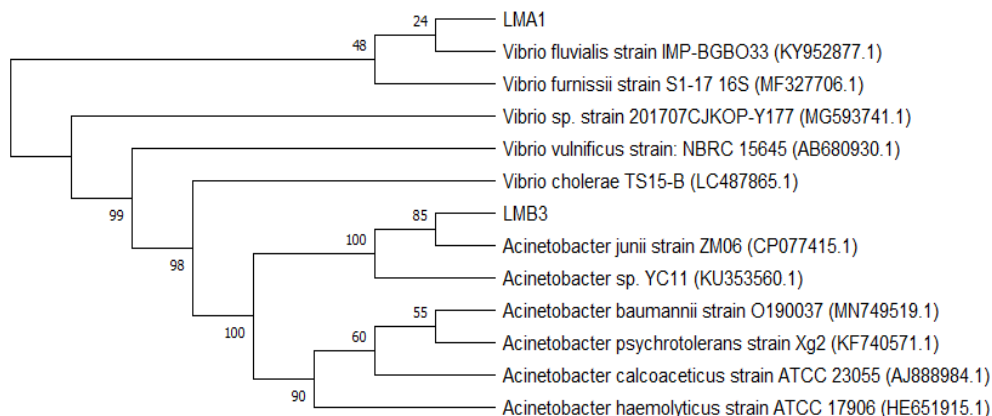
Rekonstruksi Pohon Filogenetik

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa LMA1 membentuk monoklad dengan *Vibrio fluvialis* dan LMB3 membentuk mono klad dengan *Acinetobacter junii*. Hal ini mengindikasikan bahwa LMA1 dan LMB3 masing-masing berkerabat dekat dengan *Vibrio fluvialis* dan *Acinetobacter junii*. Pohon filogenetik ini membuktikan adanya konsistensi terhadap

data dari hasil analisis similaritas dan jarak genetik yang telah disajikan sebelumnya. Hasil penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa *Vibrio fluvialis* memiliki aktivitas lipolitik, meskipun eksplorasi lipolitik dari bakteri ini masih jarang (Myatt et al. 1989). Berbeda dengan, *Acinetobacter junii* yang telah banyak dieksplorasi terkait dengan aktivitas lipolitik dari bakteri tersebut, diantaranya mampu

berperan dalam biodegradasi pada pencemaran limbah minyak di lingkungan

dan aktivitas lipolitik lainnya (Tan et al. 2022; Jiang et al. 2023).



Gambar 5. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik isolat LMA1 dan LMB3 berdasarkan gen parsial 16S rRNA menggunakan metode maximum parsimony dengan bootstraps 1000x

KESIMPULAN

Gen parsial 16S rRNA isolat LMA1 dan LMB3 yang berhasil dikarakterisasi memiliki ukuran masing-masing 1292 pb dan 1283 pb. Berdasarkan hasil analisis similaritas, jarak genetik dan rekonstruksi filogenetik dengan menggunakan marka molekuler gen parsial 16S rRNA dapat disimpulkan bahwa isolat LMA1 dan LMB3 memiliki kemiripan genetik yang sangat tinggi dan/atau dapat diidentifikasi sebagai satu spesies yang sama masing-masing dengan *Vibrio fluvialis* dan *Acinetobacter junii*. Identifikasi molekuler dapat diperkuat kedepannya dengan penggunaan *housekeeping gene*, seperti gen gyrase B (*gyrB*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Universitas Halu Oleo (UHO) yang telah mendukung dan mendanai penelitian ini dalam skema penelitian dosen pemula internal.

DAFTAR PUSTAKA

Alzubaidy, H., Essack, M., Malas, T. B., Bokhari, A., Motwalli, O., Kamanu, F.

K., Jamhor S. A, Mokhtar, N. A., Antunes, A., Simoes, M. F., Alam, I., Bougouffa, S., Lafi, F. F., Bajic, V. B., & Archer, J. A. (2016). Rhizosphere microbiome metagenomics of gray mangroves (*Avicennia marina*) in the Red Sea. *Gene*, 576(2), 626-636.

Araujo, F. J., Hissa, D. C., Silva, G. O., Antunes, A. S., Nogueira, V. L., Gonçalves, L. R., & Melo, V. M. (2020). A novel bacterial carboxylesterase identified in a metagenome derived-clone from Brazilian mangrove sediments. *Molecular Biology Reports*, 47, 3919-3928.

Arnold, B. J., Huang, I. T., & Hanage, W. P. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 20(4), 206-218.

Bartram, A. K., Lynch, M. D., Stearns, J. C., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J. D. (2011). Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3846-3852.

Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A. K., & Azhar, E. I. (2017). Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo-and endophytic bacteria

- associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 16(2).
- Cavalcante, F. T. T., Neto, F. S., de Aguiar Falcão, I. R., da Silva Souza, J. E., de Moura Junior, L. S., da Silva Sousa, P., Rocha, T. G., de Sousa, I. G., de Lima Gomes, P. H., de Souza, M. C. M., & dos Santos, J. C. (2021). Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. *Fuel*, 288, 119577.
- Contesini, F. J., Davanço, M. G., Borin, G. P., Vanegas, K. G., Cirino, J. P. G., Melo, R. R. D., Mortensen, U. H., Hilden, K., Campos, D. R., & Carvalho, P. D. O. (2020). Advances in recombinant lipases: Production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry. *Catalysts*, 10(9), 1032.
- Corney, B. G., Slack, A. T., Symonds, M. L., Dohnt, M. F., McClintock, C. S., McGowan, M. R., & Smythe, L. D. (2008). *Leptospira weilii* serovar Topaz, a new member of the Tarassovi serogroup isolated from a bovine source in Queensland, Australia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(10), 2249-2252.
- Dia, N. C., Van Vaerenbergh, J., Van Malderghem, C., Blom, J., Smits, T. H., Cottyn, B., & Pothier, J. F. (2021). *Xanthomonas hydrangeae* sp. nov., a novel plant pathogen isolated from *Hydrangea arborescens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 71(12), 005163.
- Ellabaan, M. M., Munck, C., Porse, A., Imamovic, L., & Sommer, M. O. (2021). Forecasting the dissemination of antibiotic resistance genes across bacterial genomes. *Nature communications*, 12(1), 2435.
- Giri, A., Khandayataray, P., Murthy, M. K., & Samal, D. (2021). Biochemical and molecular identification of lipolytic bacteria isolated from beverage industrial wastewater and optimization of lipase-secreting bacteria. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12.
- Godoy, C. A., Pardo-Tamayo, J. S., & Barbosa, O. (2022). Microbial lipases and their potential in the production of pharmaceutical building blocks. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9933.
- Gurkok, S., & Ozdal, M. (2021). Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein expression and purification*, 180, 105819.
- Habibollahi, H., & Salehzadeh, A. (2018). Isolation, optimization, and molecular characterization of a lipase producing bacterium from oil contaminated soils. *Pollution*, 4(1), 119-128.
- Jiang, S., Fan, Q., Zhang, Z., Deng, Y., Wang, L., Dai, Q., Wang, J., Lin, M., Zhou, J., Long, Z., He, G., & Zhou, Z. (2023). Biodegradation of Oil by a Newly Isolated Strain *Acinetobacter Junii* WCO-9 and Its Comparative Pan-Genome Analysis. *Microorganisms*, 11(2), 407.
- Kareem Hussein Al-Tameemi, K. A., AlKabee, H. J., Madhkoor, H. A., & Ali Wasfi, R. M. (2021). Isolation, Genetic Identification And Detection of Lipolytic Bacterial Strains From Various Sources of Milk Products. *Biochemical & Cellular Archives*, 21(2).
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.
- Morono, Y., Terada, T., Hoshino, T., & Inagaki, F. (2014). Hot-alkaline DNA extraction method for deep-subseafloor archaeal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1985-1994.
- Myatt, D. C., & Davis, G. H. (1989). Isolation of medically significant *Vibrio* species from riverine sources in south east Queensland. *Microbios*, 60(243), 111-123.

- Pham, V. H. T., Kim, J., Shim, J., Chang, S., & Chung, W. (2021). Purification and characterization of strong simultaneous enzyme production of protease and α -Amylase from an extremophile-Bacillus sp. FW2 and its possibility in food waste degradation. *Fermentation*, 8(1), 12.
- Putra, L., Natadiputri, G. H., Meryandini, A., & Suwanto, A. (2019). Isolation, cloning and co-expression of lipase and foldase genes of Burkholderia territorii GP3 from mount papandayan soil.
- Radl, V., Simoes-Araujo, J. L., Leite, J., Passos, S. R., Martins, L. M. V., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., Baldani, J. I., & Zilli, J. E. (2014). Microvirga vignae sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_3), 725-730.
- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, 114-124.
- Sanschagrín, S., & Yergeau, E. (2014). Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (90), e51709.
- Sebastian, J., Muraleedharan, C., & Santhiagu, A. (2016). A comparative study between chemical and enzymatic transesterification of high free fatty acid contained rubber seed oil for biodiesel production. *Cogent Engineering*, 3(1), 1178370.
- Sedijani, P., Rasmi, D. A. C., Kusmiyati, K., Eniarti, M., & Rohimah, S. (2022). Isolation and Activity Test of Lipolitik Bacteria on Different pH and Temperature. *Jurnal Biologi Tropis*, 22(3), 1084-1091.
- Soleha, S., & Retnaningrum, E. (2020). Screening and molecular identification of lipolytic bacteria from spent bleaching earth. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(9).
- Susilowati, A., Puspita, A. A., & Yunus, A. (2018, March). Drought resistant of bacteria producing exopolysaccharide and IAA in rhizosphere of soybean plant (Glycine max) in Wonogiri Regency Central Java Indonesia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 142, p. 012058). IOP Publishing.
- Sutapa, I. W., Latuputy, L., & Tellusa, I. (2015). Production of biodiesel from Calophyllum inophyllum L. oil by lipase enzyme as biocatalyst. *Int. J. Eng. Sci. Res. Technol*, 4(8), 437-441.
- Syah, M. A. (2022). Isolasi dan Karakterisasi Molekuler Gen 16S rRNA Bakteri Lipolitik Asal Limbah Kulit Biji Jambu Mete. *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 8(1), 20-26.
- Syah, M. A., Satya, A. A., Puspitasari, E., Suwanto, A., & Mubarik, N. R. (2023). Cloning and Co-Expression of Lipase and its Specific Foldase from Ralstonia pickettii BK6. *HAYATI Journal of Biosciences*, 30(1), 71-80.
- Tan, Z., Chen, G., Zhao, Y., Shi, H., Wang, S., Bilal, M., Li, D. & Li, X. (2022). Digging and identification of novel microorganisms from the soil environments with high methanol-tolerant lipase production for biodiesel preparation. *Environmental Research*, 212, 113570.
- Varghese, M. A., Thomas, A. M., & Kumar, R. S. (2023). Depth integrated variation in the distribution of soil bacteria and its enzyme production from Ayiramthengu mangrove ecosystem of Kerala coast, India. *Macedonian Journal of Ecology and Environment*, 25(2), 61-66.
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, 17, 1-8.