

Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Pelarut Fosfat dari Gua Gamelan di Kawasan karst Kiskendo Kendal, Jawa Tengah

Hawari Rosdiana Mahmudah¹⁾, Agung Supriyadi¹⁾, Anto Budiharjo¹⁾,

Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedharto, SH, Tembalang, Semarang, Indonesia
Email: rosdianahawari374@gmail.com

Abstract

Phosphate solubilizing bacteria is a group of bacteria that dissolves unavailable phosphate into the form that can be absorbed by plants. This research aimed at isolation and molecular identification of phosphate solubilizing bacteria based on 16s rRNA from bat cave guano and potential microorganisms which were able to dissolve phosphate. Several stages of this research are, isolation PSB in *Pikovskaya* and *NBRIP* agar, Gram staining, and molecular identification. The isolation result obtained two isolates phosphate solubilizing bacteria, which are G4-1 and G5. Isolate G5 is the highest on solubilizing phosphate with a diameter of clear zone 22.01 mm, and Isolate G4-1 exhibited diameter of clear zone 19.8 mm. Isolates G4-1 and G5 are the gram-negative bacteria. DNA amplification of these bacteria employing universal primers 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and Primer 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') generated the 1520 bp and 1235 bp PCR product. The result of the analysis of 16s rRNA gene sequence showed that isolate G4-1 has 80% similarity with *Acinetobacter iwoffi* strain-JCM partial sequence, and isolate G5 has 92% similarity with *Serratia marcescens* strain-NBRC.

Key words: Phosphate solubilizing bacteria, 16SrRNA, *Serratia marcescens*

Abstrak

Bakteri pelarut fosfat (BPF) merupakan bakteri yang mampu melarutkan fosfat yang tidak tersedia menjadi tersedia sehingga dapat diserap oleh tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan identifikasi molekuler bakteri pelarut fosfat melalui identifikasi 16s rRNA dari guano gua gamelan dan kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Kegiatan penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu isolasi BPF dalam medium *pikovskaya* dan *NBRIP*, pewarnaan gram, serta identifikasi molekuler. Hasil isolasi diperoleh dua isolat bakteri, yaitu G4-1 dan G5. Isolat G5 yang paling tinggi melarutkan fosfat dengan diameter zona bening sebesar 22.01 mm, dan isolat G4-1 memiliki diameter zona bening 19.8 mm. Isolat G4-1 dan G5 merupakan bakteri gram-negatif. Hasil amplifikasi DNA BPF menggunakan primer universal 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan Primer 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') menghasilkan produk PCR berukuran 1520 bp dan 1235 bp. Hasil analisis sekuens gen 16s rRNA menunjukkan bahwa isolat G4-1 memiliki homologi sebesar 80% dengan *Acinetobacter iwoffi* strain-JCM parsial sekuens, sedangkan isolat G5 memiliki homologi sebesar 92% dengan *Serratia marcescens* strain-NBRC.

Kata Kunci: Bakteri Pelarut Fosfat, 16S rRNA, *Serratia marcescens*

PENDAHULUAN

Seiring berkembangnya pertanian organik akhir-akhir ini, guano yang berasal dari kotoran kelelawar menjadi salah satu alternative pengganti pupuk kimia atau buatan (anorganik). Guano dipilih karena memiliki unsur hara yang lengkap antara lain Nitrogen (N), Fosfor (P), Kalium (K), Kalsium (Ca), dan Sulfur (S) yang dibutuhkan sebagai penyubur tanah yang banyak dibutuhkan. Guano sendiri pada dasarnya adalah kotoran kelelawar yang terendapkan di lantai dasar gua serta pada dinding gua. Mikroorganisme yang ditemukan dalam guano diantaranya bakteri pathogen serta Bakteri Pelarut Fosfat (BPF).

Salah satu alternatif untuk meningkatkan efisiensi pemupukan fosfat, dalam mengatasi rendahnya fosfat tersedia dalam tanah adalah dengan memanfaatkan BPF. Kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat dapat diuji dengan menumbuhkan pada medium NBRIP (*National Botanical Research Institute Phosphorus*) yang mengandung $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Beberapa bakteri tanah dapat melarutkan fosfat. Prinsip mekanisme pelarutan mineral fosfat adalah produksi asam-asam organik, dan enzim asam fosfatase yang berperan dalam mineralisasi fosfat organik pada tanah (Setiawati & Pranoto, 2015).

Fosfat yang terlarut merupakan salah satu parameter bahwa bakteri pelarut fosfat dapat digunakan sebagai bahan baku pupuk hayati (biofertilizer) yang dapat mendorong pertumbuhan dengan meningkatkan kebutuhan nutrisi tanaman. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini disusun untuk mengidentifikasi potensi bakteri sedimen gua yang memiliki daya pelarutan yang tinggi terhadap fosfat, menguji kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat, dan mengidentifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA.

BAHAN DAN METODE

BAHAN

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sedimen dari permukaan dinding serta lantai dasar Gua Gamelan di Kawasan Karst Kiskendo Kendal, Jawa Tengah, Akuadest steril, media NA (Nutrient Agar), media NB (Nutrient Broth), media Pikovskaya, media NBRIP, serbuk agar, Gram A (Kristal violet),

Gram B (lugol), Gram C (alkohol), dan Gram D (safranin), saponin 0.5%, minyak imersi, Larutan Buffer TAE, gel agarosa 1%, loading dye, *Gel Red*, primer 27 F, primer 1492 R, template DNA isolate bakteri, My Taq Polymerase.

METODE

Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat dari Sedimen Gua

Sampel Sedimen gua (diambil dari lantai dasar dan dinding Gua Gamelan di Kawasan Karst Kiskendo Kendal, Jawa Tengah). Isolasi bakteri yang berasal dari sedimen gua dilakukan menggunakan metode pengenceran bertingkat hingga pengenceran 10^{-6} . Pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ditanam sebanyak satu ml kedalam media Pikovskaya padat (Glukosa 2 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g, KCl 0,04 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g, NaCl 0,04 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0004 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0004 g, ekstrak yeast 0,1 g, dan 3 gr agar) dan *National Botanical Research Institute Phosphorus* (NBRIP) (Glukosa 2 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 1 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g, KCl 0,04 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,02 g, Agar 4 g) diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 35°C . Pertumbuhan BPF ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling koloni. Koloni bakteri dipurifikasi kembali sampai didapatkan isolat murni.

Kemampuan Bakteri Pelarut Fosfat dalam Melarutkan Fosfat

Kultur bakteri ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam, kemudian diambil sebanyak lima μL diinokulasikan pada media NBRIP padat dan diinkubasi selama 3-7 hari pada suhu 35°C . Zona bening yang terbentuk diukur dan dihitung rasio diameter zona bening dengan rumus sebagai berikut.

$$R = Z/K$$

Keterangan :

R = Rasio aktivitas zona bening

Z = Diameter zona bening

K = Diameter Koloni

Pewarnaan Gram

Teknik pewarnaan Gram dilakukan dengan memberikan pewarna Gram A (kristal violet), B (lugol), C (Alkohol), dan D (Safranin) secara bertahap. Tahap berikutnya adalah pengamatan morfologi bakteri serta sifat gram dari bakteri menggunakan mikroskop.

Identifikasi Molekuler Ekstraksi DNA Bakteri

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Chelex. Isolat bakteri G4-1 dan G5 masing-masing sebanyak tiga ose berumur 24 jam dimasukan kedalam tube steril 1.5 ml yang telah diberi 100 µl ddH₂O dan satu ml saponin 0,5 % dalam Phosphat Buffer Saline (PBS) 1x disimpan pada suhu 4°C *over night*. Bakteri kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Endapan yang terbentuk (pellet) kemudian ditambah 1 ml PBS 1x, kemudian disentrifuge kembali selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm kemudian *supernatant* dibuang. Endapan yang terbentuk kemudian ditambah Chelex 100 (20%) sebanyak 60 µl dan ddH₂O sebanyak 100 µl. Campuran tersebut kemudian dipanaskan selama sepuluh menit sambil dikocok menggunakan vortex setiap lima menit, dan dilanjutkan sentrifugasi selama sepuluh menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tube steril dan disimpan dalam suhu -20°C.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Primer universal digunakan dalam penelitian ini yaitu 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Richard Dan Farooq, 2001). Teknik PCR dilakukan menggunakan tube mikrofuge 0,5 ml. Total volume campuran reaksi adalah 50 µl yang mengandung 2 µl primer universal 27 F; 2 µl primer 1492 R, 5 µl DNA template, 25 µl My TAQ Hs Red DNA, dan 16 µl ddH₂O. Amplifikasi PCR dilakukan dengan kondisi predenaturasi pada suhu 95°C selama satu menit, denaturasi pada suhu 95°C selama

15detik, annealing pada suhu 54°C selama 15 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama sepuluhdetik, dilanjutkan dengan ekstensi akhir pada 72°C selama lima menit dengan jumlah 35 siklus.

Elektroforesis

Produk PCR dirunning dalam 1% gel agarosa dengan penambahan Gelred. Lima µl produk PCR isolat bakteri G4-1 dan G5 masing-masing dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit dengan tegangan 100 volt. Pengamatan migrasi DNA dilakukan menggunakan lampu UV transiluminator.

Analisa Sekuen

Sekuens yang diperoleh dianalisis dengan menyajajarkan urutan nukleotida dengan sekuens yang diduga terdapat dalam gen bank menggunakan program MEGA 6.0, kemudian daerah yang memiliki kesamaan urutan sekuens dianalisis kembali menggunakan penyejajaran yang terdapat dalam fasilitas penyejajaran Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) untuk menentukan persentase kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di gen bank.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat dari Sedimen Gua

Berdasarkan hasil isolasi yang telah dilakukan didapatkan koloni-koloni bakteri yang berbeda, koloni bakteri tersebut dimurnikan dengan metode streak pada media NBRIP (*National Botanical Research Institute Phosphorus*) sehingga menghasilkan 11 koloni, lima koloni bakteri berasal dari medium Pikovskaya dan enam koloni bakteri berasal dari medium NBRIP. (Tabel 1.).

Kemampuan Bakteri Pelarut Fosfat dalam Melarutkan Fosfat

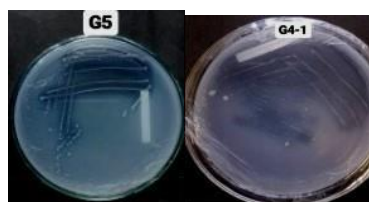
Potensi isolat bakteri gua dalam melarutkan fosfat dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada media NBRIP. Media ini mengandung sumber fosfat yang terikat dengan kalsium dalam senyawa Ca₃(PO₄)₂. Zona bening yang terbentuk disekitar isolat bakteri pada lempeng agar

NBRIP mengindikasikan adanya kemampuan bakteri gua tersebut dalam melarutkan fosfat, sedangkan isolat yang tidak mampu

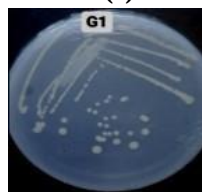
melarutkan fosfat dalam medium maka tidak terbentuk zona bening di sekitar koloni tersebut.

Tabel 1. Morfologi Koloni Bakteri Sedimen Gua

Sumber Pengenceran	Nama	Warna	Tepian	Bentuk	Elevasi
NBRIP 10^{-4}	G1	Putih kekuningan	Rata	Bulat	Cembung
Pikovskaya 10^{-4}	G2	Putih kekuningan	Rata	Bulat besar	Cembung
Pikovskaya 10^{-4}	G3	Putih	Bergerigi	Tidak beraturan	Datar
Pikovskaya 10^{-5}	G4-1	Putih kekuningan	Rata	Bulat	Datar
NBRIP 10^{-5}	G4-3	Putih	Rata	Bulat	Datar
NBRIP 10^{-5}	G4-5	Putih	Rata	Bulat	Datar
NBRIP 10^{-5}	G4-6	Putih	Rata	Tidak beraturan	Cembung
NBRIP 10^{-6}	G5	Putih kekuningan	Rata	Bulat	Cembung
NBRIP 10^{-6}	G6	Kuning	Rata	Bulat	Datar
Pikovskaya 10^{-5}	G7	Kuning	Rata	Bulat	Cembung
Pikovskaya 10^{-5}	G8	Kuning	Bergerigi	Tidak beraturan	Cembung



(a)



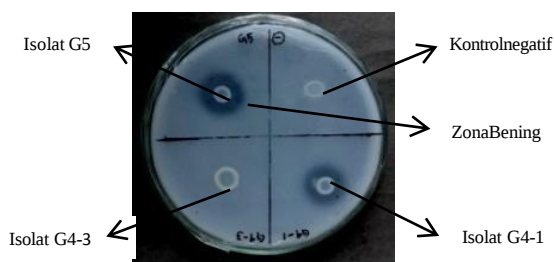
(b)

Gambar 1. Skrining bakteri pelarut fosfat pada media NBRIP

(a) Koloni positif melarutkan fosfat memiliki zona bening

(b) Koloni tidak mampu melarutkan fosfat

Berdasarkan hasil dari 11 koloni yang diuji skrining pada media NBRIP diperoleh dua isolat bakteri potensial yang kemudian diukur kemampuannya dalam melarutkan fosfat yaitu dengan mengukur lebar zona bening yang terbentuk. Isolat yang telah dipurifikasi kemudian diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat dengan cara ditumbuhkan sebanyak lima ul pada media NBRIP dan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 35°C . Berdasarkan lebar zona bening yang terbentuk, diketahui bahwa isolat G5 memiliki rata-rata lebar zona bening tertinggi yakni 2.20 cm daripada isolat G4-1 yang memiliki lebar zona bening 1.98 cm.



Gambar 2. Aktivitas pelarutan fosfat oleh bakteri sedimen gua

Berdasarkan lebar zona bening yang terbentuk, diketahui bahwa isolat dengan kode G5 memiliki rata-rata lebar zona bening paling besar daripada isolat G4-1, dan isolat G4-3 pada saat skrining menghasilkan sedikit daya larut terhadap sumber fosfat pada medium sedangkan pada saat uji kelarutan fosfat tidak menghasilkan zona bening. Situmorang *et al.*, (2015) menyatakan bahwa semakin tinggi aktifitas enzim fosfatase yang dihasilkan bakteri pelarut fosfat, maka semakin besar zona bening yang dihasilkan.

Tabel 2. Diameter Zona Bening Isolat Bakteri Pelarut Fosfat (mm)

Isolat	24 Jam	72 Jam	168 Jam
Kontrol (-)	-	-	-
G4-1	-	11.3	19.8
G4-3	-	-	-
G5	-	12.4	22.01

(-) Tidak terbentuk zona bening

Bakteri pelarut fosfat melakukan aktivitasnya yang membebaskan sejumlah asam-asam organik, seperti asam sitrat, glutamat, oksalat, malat, fumarat. Menurut Tan (1982), menjelaskan bahwa meningkatnya asam-asam organik tersebut biasanya diikuti dengan penurunan pH, adanya kecenderungan Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , dan Al^{3+} untuk membentuk khelat (kompleks yang stabil) dengan asam-asam organik juga menyebabkan terjadinya pembebasan P menjadi larut. Asam organik mampu berikatan dengan ion Ca dari $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dan membebaskan H_2PO_4 sehingga

membentuk area yang berwarna jernih dan mengakibatkan fosfat terikat menjadi bentuk yang tersedia.

Tabel 3. Hasil seleksi Bakteri Pelarut Fosfat Berdasarkan Rasio Diameter Zona Bening terhadap Rasio Diameter Koloni

Rasio Diameter Zona Bening Isolat Bakteri Pelarut Fosfat			
No.	KodeIsolat		Rasio Z/K
Kriteria			
1.	Kontrol (-)	-	-
2.	G4-1	2.82	Tinggi
3.	G4-3	-	-
4.	G5	3.12	Tinggi

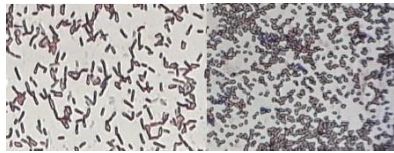
Keterangan : Z menunjukkan diameter Zona Bening
K menunjukkan diameter Koloni Bakteri

Rasio yang didapatkan berkisar antara 2.5-3.5 dengan rasio tertinggi dihasilkan oleh isolat G5. Widawati (2006), mengatakan bahwa nilai Rasio Z/K yang dihasilkan isolat BPF memiliki kriteria tinggi (Rasio Z/K >2), kriteria sedang (Rasio Z/K 1,5-2), dan kriteria rendah (Rasio Z/K <1,5). Isolat yang mampu tumbuh pada media tersebut diasumsikan dapat memanfaatkan P dari sumber tidak larut berupa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sehingga dianggap mampu melarutkan P tidak larut. Ginting *et al.*, (2006), menyebutkan bahwa semakin tinggi rasio zona bening menandakan bahwa semakin tinggi kemampuan mikroba tersebut melarutkan fosfat dari sumber P tidak larut.

Widawati dan Suliasih (2006) menyatakan bahwa aktifitas bakteri pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat tidak larut sangat bergantung pada temperatur, kelembaban, pH, suplai makanan, dan kondisi lingkungan selama pertumbuhannya.

Karakteristik Mikroskopik

Pengecatan isolat bakteri pelarut fosfat dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri yang diperoleh serta mengetahui jenis bakteri berdasarkan dinding selnya agar dapat diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif atau Gram negatif.



A. Isolat G5 B. Isolat G4-1

Gambar 3. Bentuk Morfologi Mikroskopis Isolat Bakteri Pelarut Fosfat

Hasil pewarnaan gram (Gambar 3.) menunjukkan bahwa isolat G4-1 merupakan bakteri berbentuk bulat sedangkan isolat G5 berbentuk batang, kedua bakteri tersebut menghasilkan warna merah muda sehingga isolat G4-1 dan isolat G5 tergolong ke dalam bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif diketahui dari sel bakteri yang terwarnai merah pada pengamatan mikroskop perbesaran 1000x. Bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan yang lebih tipis dan banyak mengandung lipopolisakarida dari pada bakteri Gram positif (James *et al.*, 2008).

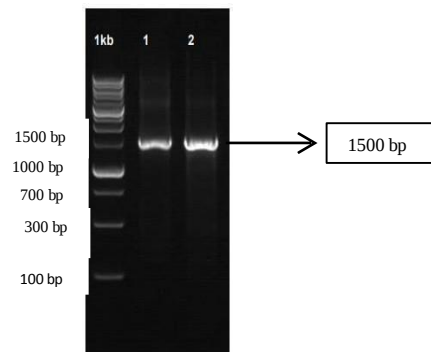
Identifikasi Molekuler Bakteri Pelarut Fosfat

Identifikasi molekuler isolat bakteri G4-1 dan G5 diawali dengan ekstraksi dari kultur bakteri pada media Nutrient Agar (NA). Metode ekstraksi DNA bakteri yang digunakan yaitu metode chelex 100. Metode chelex 100 yang digunakan merupakan suatu metode ekstraksi DNA yang mudah dan tidak memerlukan banyak alat dan reagen seperti metode ekstraksi DNA lainnya. Musapa *et al.*, (2013), menambahkan bahwa keuntungan ekstraksi DNA dengan menggunakan metode chelex adalah sederhana, reagen yang digunakan lebih sedikit dibandingkan dengan metode standar lainnya, hemat biaya, aman serta waktu proses yang lebih singkat.

Hasil ekstraksi DNA isolat bakteri G4-1 dan G5 masing-masing menunjukkan konsentrasi sebesar 37,1 ng/μl dengan kemurnian sebesar 1.84 pada rasio 260/280 untuk isolat G4-1 dan konsentrasi sebesar 105.0 ng/μl dengan kemurnian 1.92 pada rasio 260/280 untuk G5. Pengukuran ekstrak DNA isolat bakteri G4-1 dan G5 menggunakan Nanodrop 2000 UV-Vis- Spectrophotometer.

Nilai kemurnian DNA isolat bakteri G4-1 dan G5 menunjukkan nilai yang sesuai. Nilai kemurnian DNA 1,72 mengindikasikan DNA terkontaminasi protein. Sambrook *et al* (1989), mengemukakan bahwa nilai kemurnian DNA yang terbebas dari pengotor RNA dan protein berkisar antara 1,8-2,0.

Hasil ekstraksi DNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi dengan PCR, menggunakan 16S rRNA dari isolat bakteri G4-1 dan G5 sebagai fragmen target. Primer yang digunakan untuk memperoleh wilayah gen 16S rRNA adalah primer universal 27F dan 1492R. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus. Menurut Janda dan Sharon (2007), gen 16s rRNA hampir terdapat pada seluruh bakteri, fungsi gen 16s rRNA pada waktu yang lama tidak berubah, dan gen 16s rRNA cukup panjang untuk tujuan bioinformatika (1500 bp). Menurut Osborne *et al.*, (2005), primer 27F dan 1492R yang digunakan untuk amplifikasi gen 16s rRNA memungkinkan amplifikasi yang hampir sempurna pada gen 16s rRNA dari kebanyakan bakteri yang telah diketahui dan telah digunakan pula untuk mempelajari bakteri pada berbagai habitat.



Gambar 4. Visualisasi hasil amplifikasi gen 16s rDNA isolat G4-1 dan G5 dalam konsentrasi 0,8% agarosa dengan marker 1 kb DNA Ladder (1st BASEAsia).

Visualisasi produk amplifikasi 16S rRNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa, menggunakan marker 100 bp ladder. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA tunggal, lumayan tebal, dan dan terang yang menandakan bahwa primer dan suhu

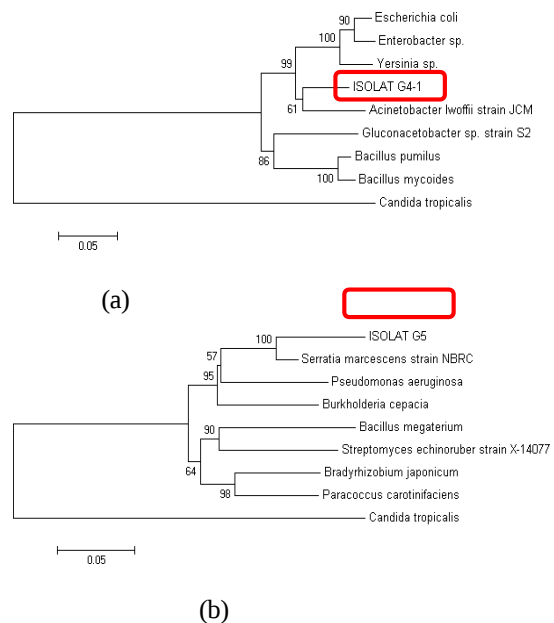
annealing yang digunakan sudah tepat dengan kisaran panjang 1.500 bp (Gambar 4.).

Hasil sekuensing yang telah dilakukan oleh perusahaan 1st BASE terhadap primer *reverse* dan *forward*, disejajarkan melalui *Basic Local Alignment search Tool* (BLAST). Hasil penjajaran isolat bakteri G4-1 dan G5 dengan primer 27F menunjukkan bahwa bakteri G4-1 dan G5 memiliki ukuran *Query length* sebesar 1235 bp dan 1520 bp, dan diperoleh hasil bahwa pada isolat G5 memiliki *Query cover* 96% dengan *Serratia marcescens* strain NBRC dan menunjukkan nilai *E value* 0.00 dengan *Max Score* tertinggi 2010 sedangkan pada isolat G4-1 diperoleh *Query cover* sebesar 37% dengan *Acinetobacter iwoffii* strain JCM parsial sekuens *E-value* menunjukkan diatas diatas 0.00 yaitu $2e-88$ dengan *Max Score* 326. Nilai pada grafik yang berada dibawah angka 50 menunjukkan tingkat homologi sekuens rendah yang dideskripsikan dengan warna hitam dan biru. Warna merah muda, hijau dan merah menunjukkan tingkat homologi yang semakin tinggi.

Janda dan Sharon (2007), menjelaskan bahwa data sekuens gen 16s rDNA pada strain individu dengan tetangga terdekat menunjukkan nilai kemiripan <97% mewakili spesies baru, penentuan kriteria identifikasi menggunakan kemiripan 99,5% adalah sama spesies.

Penggunaan pensejajaran berganda ini bertujuan untuk mensejajarkan dan mencocokkan hasil sekuensing yang diperoleh dari sampel penelitian dengan data di *genebank*. Analisis hasil BLAST tersebut memberikan informasi mengenai bakteri apa yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel. Miller (1990), mengatakan bahwa informasi dari hasil BLAST tersebut berupa *Score*, *Query Coverage*, *E-value*, dan *Maximum Identity*. Nilai skor menunjukkan keakuratan nilai penjajaran sekuens berupa nukleotida yang tidak diketahui dengan sekuens nukleotida yang terdapat didalam *genebank*. Semakin tinggi nilai skor yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat homologi kedua sekuens. *Query Coverage* adalah persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat dalam BLAST. *Max Identity* adalah nilai tertinggi dari persentasi identitas atau kecocokan antara

sekuens *query* dengan sekuens database yang tersejajarkan. Nilai *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuens. Claverie (2007) juga mengatakan bahwa, Nilai *E-value* yang semakin tinggi menunjukkan tingkat antara sekuens semakin rendah, begitupunsebaliknya. Nilai *E-value* bernilai 0 (nol) menunjukkan bahwa kedua sekuens tersebut identik.



Gambar 5. Pohon Filogenetik 16s rRNA menunjukkan posisi sekuens isolat bakteri G4-1 dan G5 dengan sekuens homolog. Metode NJ digunakan untuk pembuatan pohon filogenetik dengan model perhitungan *p-distance*.

Pohon filogenetik dibuat dengan membandingkan sekuens isolat G5 dan sekuens yang memiliki nilai kemiripan dengan sekuens G5 yaitu *Serratia marcescens* serta beberapa genus lainnya yang juga merupakan kelompok bakteri pelarut fosfat yang memiliki pigmen seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces echinoruber*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus carotinifaciens*, sedangkan pohon filogenetik sekuens isolat G4-1 yang homolog dengan sekuens

pembandingan yaitu *Acinetobacter iwoffi* strain JCM berdasarkan analisis BLAST. Hasil yang didapat dari pohon filogeni sekuens isolat G4-1 perlu dilakukan pengulangan sekuensing minimal tiga kali untuk meminimalisir terjadinya kesalahan pembacaan urutan basa nukleotida dari sekuens pengkode 16s rRNA yang teliti.

Pembuatan pohon filogenetik dengan cara *Neighbor-joining* dirasa mudah dan sederhana. Pohon filogenetik dibuat untuk mengetahui kekerabatan antara isolat G4-1 dan G5 dengan spesies yang memiliki tingkat kemiripan berdasarkan urutan basa nukleotidanya. Penelitian kali ini pohon filogenetik diuji secara statistik menggunakan metode bootstrap sebanyak 1000 kali ulangan (Swofford 1996). Angka yang terdapat dibawah setiap cabang pohon filogenetik memperlihatkan nilai *bootstrap*. Nilai tersebut merupakan nilai kepercayaan suatu cabang.

Berdasarkan gambar 5. diketahui bahwa isolat G5 memiliki kekerabatan paling dekat dengan *Serratia marcescens* strain NBRC dengan nilai bootstrap sebesar 100%. Pohon filogenetik dengan scale bar 0,05 menunjukkan adanya jarak genetik dengan perubahan nukleotid sebanyak 5 kali dalam setiap 1000 bp. Menurut Lemey et al., (2009), nilai *bootstrap* lebih besar dari 70 menunjukkan bahwa data relatif stabil sehingga baik dalam analisis NJ. Berdasarkan perbandingan morfologi antara isolat G5 dan *Serratia marcescens* diketahui keduanya memiliki karakteristik yang sama (Tabel 4.)

Tabel 4. Morfologi koloni dan sel isolat bakteri G5 dan *Serratia marcescens*

Karakter	Isolat G5	<i>Serratia marcescens</i>
Morfologi Koloni		
Bentuk	Bulat	Bulat
Warna	Merah	Kuning-
Gram	Negatif	Negatif
Tepian	Entire	Entire
Bentuk sel	Basil	Basil

(Ledenbach dan Marshall, 2009).

Serratia marcescens adalah suhu jenis bakteri gram negatif dari famili enterobacteriaceae. Bakteri ini berbentuk basil (batang) dan dapat tumbuh dalam kisaran suhu 5°- 40°C dan dalam kisaran pH antara 5-9. Koloni Bakteri ini pada suhu kamar menghasilkan pigmen atau warna merah. Bakteri ini jenis anaerob fakultatif yang tidak terlalu membutuhkan oksigen. Habitat *Serratia marcescens* banyak ditemukan di alam terutama di air dan ditanah. Hal ini sesuai dengan kondisi dan tempat isolat G5 diperoleh yaitu di dalam gua. Kondisi dalam gua sendiri cenderung lembab dan rendahnya kadar oksigen.

Kesimpulan

Diperoleh 11 koloni bakteri yang berasal dari sedimen dan dinding gua gamelan, dua diantaranya berpotensi melarutkan fosfat yaitu G4-1 dan G5. Isolat G5 menghasilkan lebar zona bening sebesar 22.01 mm sedangkan isolat G4-1 menghasilkan lebar zona bening sebesar 19.8 mm. Hasil identifikasi menggunakan sekuens gen 16s rRNA menunjukkan bahwa isolat G5 tersebut memiliki homologi sebesar 92% dengan *Serratia marcescens* strain NBRC, sedangkan isolat G4-1 memiliki homologi sebesar 80% dengan *Acinetobacter iwoffi* strain JCM.

DAFTAR PUSTAKA

- Barrow, G.I. & R.K.A Feltham. 1993. *Cowan and Steel Manual for the Identification of Medical Bacteria*. New York : Cambridge University Press.
- Clarridge JE. 2004. Impact of 16s rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. *ClinMicrobiol Rev* 17:840-862.
- Doughari, Hamuel J., Patrick Alois Ndakidemi.,Izanne Susan Human., Spinney Benade. 2011. *The ecology, biology, and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview*, Microbes and Environment, Applied Sciences Faculty, Cape Peninsula

- University Of Technology, South Africa.
- Ginting, R.C.B., R. Saraswati dan E. Husen. 2006. *Mikroorganisme Pelarut Fosfat*. Dalam Simanungkalit, R.D.M., Suriadikarta, D.A., Saraswati, R., Setyorim, D., dan Hartatik, W. Pupuk Organik dan Pupuk Hayati. Selected reading, hlm. 141-158. Balai Besar Litbang Sumber daya Lahan Pertanian. Bogor.
- Illmer, P., Barbato, A., and Schinner, F. 1995. Solubilization of Hardly-Soluble AlPO_4 with P-solubilizing Microorganisms. *Soil Biol.Biochem.* 27:265-270.
- James, J., C. Baker, H. Swain. 2008. *Prinsip-prinsip sains untuk keperawatan*. Erlangga, Jakarta.
- Janda, J.M. and S. L. Abbott. 2007. 16s rRNA gene sequencing for bacterial identifications in the diagnostic laboratories: *Pluses, perils, and pitfalls*. *J. Clinic Microbiol.* 45(9):2761-2761.
- Lemey, P., M. Salemi & A.M. Vandamme. 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press. UK.
- Mohan, M., G. Selvakumar, S.N. Sushil, J.C. 2011. Entomopathogenicity of endophytic *Serratia marcescens* Strain SRM against larvae of *Helicoverpaarmigera* (Noctuidae: Lepidoptera). *World J. Microbiol. Biotechnol.* Published online 07 april 2011.
- Musapa, M., T .Kumwenda, M. Mkulama, S. Chishimba, D. E. Noris, P. E. Thuma, dan S. Mharakurwa. 2013. *A simple chelex protocol for DNA extraction from Anopheles spp.* *J. Vis. Exp.* 71: 1- 7
- Osborne, C. A., M. Galic, P. Sangwan, dan P. H. Jansen. 2005. PCR generated artifact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 183-187.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual. Second Edition*. CSH Centennial.
- Setiawati, M. R. & Pranoto, E. 2015. Perbandingan Beberapa Bakteri Pelarut Fosfat Eksogen pada Tanah Andisol sebagai areal Pertanaman Teh Dominan di Indonesia. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina* 8(2): 158-164.
- Simanungkalit, R. D. M dan Suriadikarta, D. A. 2006. *Pupuk Organik dan Pupuk Hayati*. Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor.
- Situmorang, E. C., Prameswara, A. S. H. C., Mathius, N. T. & Liwan, T. 2015. *Indigenous Phospate Solubilizing Bacteria from Peat Soil* Solé, M., Francia A., Rius, N., & Lorén, J. G. 1997. The Role of pH in The “Glucose Effect” on Prodigiosin Production by Non-proliferating Cells of *Serratia marcescens*. *Lett Appl Microbiol.* 25: 81–84.
- SWOFFORD, D.L., G.J. OLSEN., P.J. WADDELL and D.M. HILLS. 1996. Phylogenetic inference. In: *Molecular Systematics*, 2nd Edition. HILLS, D.M., C. MORITZ and B.K. MABLE (Eds.) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. *Chap. 5 pp.* 407 – 514
- Widawati S & Suliasih. 2006. Populasi Bakteri Pelarut P (BPF) di Cikini, Gunung Botol dan Ciptarasa serta Kemampuannya dalam melarutkan P Terikat di Media Pikovskaya Padat. *Jurnal Biodiversitas.* 7 (2) : 109 – 113.
- Widyati E. 2007. Formulasi inokulum Mikroba: MA, BPF dan Rhizobium Asal Lahan Bekas Tambang Batubara untuk Bibit Acacia crassicarpa Cunn. Ex-Benth. *Jurnal Biodiversitas* 8 (3) : 238 - 241.
- Yukimasa N, Takeshi I, Hiroshi I. 1988. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int J Syst Bacteriol.* 38(2): 209-211.

