

Karakterisasi Profil DNA Isolat Bakteri dari Sampel Air dengan Primer OPE 15 dan OPJ 20 Menggunakan Teknik RAPD

Rahmadana ^{1)*}, Zacki Rafila ¹⁾, Baginda Mulya ¹⁾

¹⁾Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Barat., Kec. Padang Utara, Kota Padang, Sumatera Barat 25171
Email : rahmadhana200211@gmail.com

ABSTRACT

Water is a compound that is easily exposed to bacteria and is a breeding medium for bacteria. The gallons of water consumed every day do not necessarily meet the standards suitable for consumption. Coliform bacteria and Escherichia Coli are bacteria that can generally be found in bottled drinking water (gallons). Bacterial isolation techniques can be used to obtain pure cultures of bacteria. In identifying bacteria, to find out the characteristics of the bacterial DNA found, previous researchers used PCR analysis techniques, one of which is PCR RAPD. The RAPD technique detects DNA polymorphism by identifying the appearance of DNA bands at a locus through sequence differences at the primer junction point. Molecular marker analysis using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) has been widely used to view the genetic and phylogenetic diversity of populations of organisms, including microbes or bacteria. In this study, the primers used were OPE 15 and OPJ 20, where these two oligonucleotides are used as primers to allow the DNA template to be copied by DNA polymerase.

Kata kunci: (Water, Bacteria, RAPD, OPE 15, OPE 20)

ABSTRACT

Air termasuk senyawa yang mudah terpapar bakteri dan merupakan medium berkembang biak bakteri. Air galon yang dikonsumsi sehari-hari belum tentu memenuhi standar layak konsumsi. Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli* merupakan bakteri yang pada umumnya dapat ditemui pada air minum kemasan (Galon). Teknik isolasi bakteri dapat digunakan untuk mendapatkan biakan murni dari bakteri. Dalam mengidentifikasi bakteri untuk mengetahui karakteristik DNA bakteri yang ditemukan para peneliti terdahulu melakukan teknik analisis PCR salah satunya yaitu PCR RAPD. Teknik RAPD mendeteksi polimorfisme DNA dengan mengidentifikasi kemunculan pita DNA pada suatu lokus melalui perbedaan urutan pada titik pertemuan primer. Analisis penanda molekuler menggunakan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) telah banyak digunakan untuk melihat diversitas genetik dan filogenetik dari populasi organisme diantaranya pada mikrobial atau bakteri. Dalam penelitian ini primer yang digunakan yaitu OPE 15 dan OPJ 20 yang dimana kedua oligonukleotida ini digunakan sebagai primer untuk memungkinkan DNA template dikopi oleh DNA polymerase.

Kata kunci: (Air; Bakteri; RAPD ; OPE 15 ; OPJ 20)

PENDAHULUAN

Air minum merupakan air yang telah melalui proses pengolahan atau tanpa pengolahan. Air minum harus memenuhi persyaratan mikrobiologis, kimiawi, dan

radioaktif agar aman untuk kesehatan. Dalam Kemasan (AMDK) dan Depot Air Minum Isi Ulang (DAMIU) karena dianggap lebih higienis dan praktis. Penelitian penggunaan AMDK yang dilakukan di Indonesia pada tahun 2000 didapatkan hasil sebanyak 0,86%, dan meningkat pada tahun 2016 sebanyak 31,30 % (Dea Afrila dkk, 2020).

Bakteri patogen dapat tersebar melalui air. Air merupakan kebutuhan dasar hidup di bumi yang menentukan kesehatan dan kesejahteraan manusia. Salah satu sumber air dengan potensi yang besar adalah sungai. Sungai adalah aliran air alami dari daerah hulu ke daerah hilir. Aliran alami sungai merupakan sumber utama untuk memenuhi kebutuhan rumah tangga, sanitasi lingkungan, pertanian, industri, pariwisata, olahraga, perikanan, dan tenaga listrik. Sungai banyak dijadikan sebagai tempat pembuangan kotoran dan sampah sehingga menjadi penyebaran bakteri patogen yang menyebabkan penyakit (Adrianto, 2018).

Salah satu parameter kualitas air adalah tidak tercemar *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Shigella* sp. Metode isolasi DNA menjadi tahapan penting untuk menghasilkan DNA murni. Isolasi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari partikel-partikel lainnya seperti lipid, protein, polisakarida, dan zat lainnya. Proses tersebut membutuhkan preparasi sampel untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang baik karena akan digunakan untuk berbagai analisis molekuler. Analisis molekuler dilakukan pada setiap sampel dan untuk setiap sampel dibutuhkan optimasi untuk mendapatkan hasil yang optimal pada tahap isolasi sehingga DNA dapat terlihat jelas. Isolasi DNA berguna untuk beberapa analisis molekuler dan rekayasa genetika seperti PCR. Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan setelah mendapat optimasi yang optimal. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah salah satu teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi sekuen DNA spesifik menjadi ribuan sampai jutaan kopi sekuen DNA (Putri dkk, 2023)

Tahap PCR yaitu denaturasi, annealing (penempelan primer), extension (pemanjangan primer) (Lorenz *et al.*, 2014). Teknik PCR ini dapat menghasilkan produk atau hasil yang lebih baik daripada metode konvensional karena metode tersebut memerlukan waktu yang lama, jumlah sampel banyak, dan pembacaan hasil yang tidak tepat karena terjadinya kontaminasi bakteri lain karena kurang steril dalam pengerjaannya (Bakri *et al.*, 2017).

Primer adalah rantai asam nukleat yang berfungsi sebagai titik awal untuk mensintesis DNA, yang diperlukan untuk replikasi DNA karena enzim-enzim yang mengkatalisis proses ini yaitu DNA polimerase. Seleksi primer bertujuan untuk mendapatkan tingkat polimorfik yang tinggi. Pemilihan primer pada analisis genetik berpengaruh terhadap pita polimorfik yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri. Pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer menjadi berbeda, baik dalam ukuran banyaknya pasang basa maupun jumlah pita DNA. Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi cetakan DNA yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik, serta konsentrasi DNA cetakan yang terlalu

kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas (Gusmiati dkk, 2021).

Dalam penelitian ini, karakteristik DNA isolat air minum akan dianalisis dengan menggunakan beberapa tahapan dengan metode RAPD analisis DNA yang telah dikembangkan sebelumnya. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui profil DNA isolat bakteri air galon menggunakan teknik RAPD (*Random Application Polimerase DNA*).

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan pada penelitian ini bersifat eksperimental, karena penelitian ini dilakukan untuk meneliti pengaruh perlakuan tertentu terhadap gejala atau kejadian suatu perlakuan tertentu dan dibandingkan dengan perlakuan lain yang mendapatkan perlakuan berbeda. Karakteristik DNA isolat air minum akan dianalisis melalui beberapa tahapan seperti isolasi DNA *boiling*, PCR RAPD, dan elektroforesis.

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan selama satu minggu di bulan Mei - Juni 2024 bertempat di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah jarum ose, spiritus, master mix, qPCR, elektroforesis, *laminar air flow*, *water bath*, mikropipet, sentrifuge, *microtube*, styrofoam, tube PCR, dan tips berbagai ukuran.

Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari sampel isolat bakteri, primer RAPD (OPE 15 dan OPJ 20), NFW (nuclease free water) 3ml, agarose, buffer TE (1x), dan DNA template.

Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel air galon. Sampel air galon diambil di kantin Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Air galon yang sudah diambil kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik. Air galon berkemungkinan mengandung bakteri karena air merupakan senyawa yang mudah terpapar akan bakteri dan patogen.

Pembuatan Isolat

Sampel air galon yang sudah diambil kemudian dilakukan pembuatan suatu biakan murni menggunakan medium NA (natrium agar). Yang dimana biakan murni didapatkan setelah 2-3 hari.

Isolasi bakteri (*Boiling*)

Isolasi menggunakan teknik *boiling* yaitu dengan suhu panas. Isolat bakteri di ose dan dilarutkan pada larutan buffer TAE 50x 700µl kemudian dipanaskan di dalam

waterbath selama 30 menit. Lalu sentrifugasi 12.000 rpm selama 15 menit dan dilakukan uji konsentrasinya.

PCR RAPD

Tabel 1. Konsentrasi PCR mix

Komponen PCR	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	V1	Reaksi	Mix PCR
Master mix	2x	1x	5	5	25
Primer RAPD	10	0,4	0,4	5	2
NFW	-	-	2,6	5	13
DNA template	50µg/µl	100µg/µl	2		

Elektroforesis DNA

Hasil PCR divisualisasikan dengan metode elektroforesis yang menggunakan gel agarose 2%.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian eksperimental ini menggunakan teknik RAPD (*Random Application Polimerase DNA*) yang dimana sampel air galon yang digunakan dibentuk dalam 2 bentuk isolat kemudian melakukan teknik isolasi tipe *boiling*. Penggunaan teknik isolasi *boiling* ini yaitu lebih cepat dan lebih simpel. Dilanjutkan dengan metode PCR dan elektroforesis.



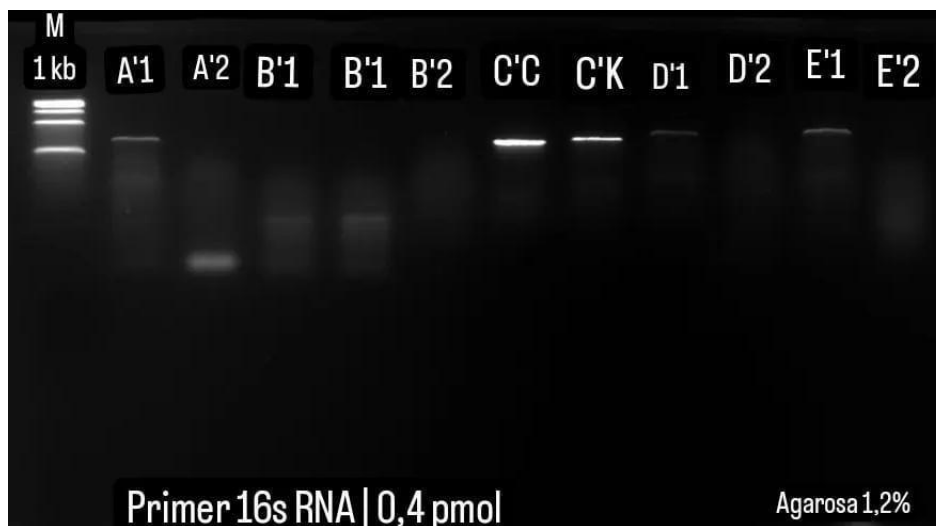
Gambar 1. Hasil Elektroforesis menggunakan primer RAPD OPE 15 dan OPJ 20

Hasil amplifikasi DNA pada Gambar 1 menunjukkan tingkat ketebalan pita yang bervariasi pada setiap sampel. Hal ini disebabkan oleh kualitas DNA hasil isolasi yang berbeda-beda pada setiap sampel sehingga sangat menentukan dalam tahapan PCR.

Pada hasil visualisasi akhir tampak di sebelah kanan yaitu primer OPJ 20 dan bagian kiri primer OPE 15. Setelah diamati dijumpai untai pita terbentuk pada primer OPJ 20 sepanjang 250bp, namun tidak pada primer OPE 15. Hal ini dapat dikarenakan terjadi kontaminasi atau rendahnya konsentrasi pada isolat yang terdapat pada primer

bersangkutan. Namun dalam hal lain ini dapat terjadi karena primer tersebut tidak berlaku pada isolat tersebut. Sehingga mengakibatkan pita pada sumur tidak terbentuk.

Optimasi isolasi dilakukan untuk mengetahui isolasi yang optimal demi mendapatkan DNA bakteri yang murni. Optimasi isolasi DNA dilakukan setiap tahapan proses isolasi yaitu tahap pelisisan sel, ekstraksi DNA, dan pemurnian DNA. Sampel yang dioptimasi disentrifugasi untuk mengendapkan sel dari komponen yang ada di sampel berdasarkan jenis molekul (Putri dkk., 2023). Metode boiling merupakan salah satu metode ekstraksi DNA sederhana dengan memberikan gangguan fisik terhadap sel bakteri berupa pemanasan dengan suhu tinggi (95-100oC). Pemanasan dengan suhu tinggi dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga mengakibatkan masuknya cairan dan molekul di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel. Kemudian DNA dipisahkan untuk selanjutnya digunakan sebagai DNA dalam cetakan proses PCR (Sunarno, 2013).



Gambar 2. Hasil elektroforesis menggunakan primer 16 sRNA

Pada gambar 2 dilakukan pengulangan kedua untuk primer yang berbeda yaitu 16 sRNA dengan ukuran pita terbentuk 150 bp untuk melihat profil lebih jelas dari DNA isolat bakteri air galon tersebut. Pemilihan primer pada analisis RAPD berpengaruh terhadap polimorfisme pita yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri, akibatnya pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer menjadi berbeda, baik dalam ukuran banyaknya pasang basa maupun jumlah pita DNA. Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi cetakan DNA.

Primer tersebut merupakan primer yang dapat menghasilkan pita-pita polimorfik, jelas, reproduksibilitas baik, hasil amplifikasi pita DNA relatif stabil dan mudah dibaca. Pemilihan primer untuk analisis keragaman genetik sangat berpengaruh terhadap polimorfisme pita yang dihasilkan, karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri akibatnya pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer menjadi berbeda baik dari ukuran pasang basa

maupun jumlah pita DNA.

Kemampuan primer yang dirancang untuk mengamplifikasi atau memperkuat daerah yang diinginkan dapat diuji dengan menggunakan reaksi PCR. PCR didasarkan pada kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA baru yang melengkapi untai cetakan yang diinginkan. Prinsip reaksi PCR adalah amplifikasi eksponensial sekuens DNA secara *in vitro* menggunakan primer spesifik, yang kemudian dilakukan elektroforesis untuk mengidentifikasi kelompok DNA yang dihasilkan (Syamsurizal *et al.*, 2019).

Keberhasilan amplifikasi sangat bergantung pada primer yang digunakan sehingga untuk mendapatkan produk PCR yang spesifik diperlukan primer yang tepat. Selain primer, keberhasilan PCR juga dipengaruhi oleh suhu annealing (T_a). Suhu annealing adalah suhu yang diperlukan oleh primer untuk menempel pada DNA cetakan secara stabil (Sasmito *et al.*, 2014). Pemilihan suhu annealing yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan yang tidak spesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan sulit terbentuknya ikatan primer dan DNA template (Amanda *et al.*, 2019).

KESIMPULAN

Metoda RAPD digunakan untuk mendeteksi polimorfisme DNA, metode ini menggunakan oligonukleotida pendek (biasanya 10 bp) sebagai primer yang akan berikatan dengan bagian (sites) komplemennya. Primer pada RAPD menentukan daerah genom mana yang akan diamplifikasi melalui PCR. Berdasarkan hasil visualisasi pengamatan membuktikan bahwa primer OPJ 20 lebih optimal menunjukkan pita DNA dari sampel air galon yang digunakan dibandingkan primer OPE 15.

REFERENSI

- Afif, R., & Putri, D. H. (2019). 16S rRNA Gene amplification of endophytic bacteria which produces antimicrobial compounds. *Serambi Biologi*, 4.
- Adrianto, R. 2018. Pemantauan Jumlah Bakteri Coliform di Perairan Sungai Provinsi Lampung. *Jurnal Teknologi Agro Industri*. 10(1): 1-6
- Amanda, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimasi Suhu Annealing Proses PCR Amplifikasi Gen *shv* Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–6.
- Bakri, Z., Hatta, M., & Massi, M. N. (2017). Deteksi Keberadaan Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada Feses Penderita Diare dengan Metode Kultur dan PCR. *JST Kesehatan*, 5(2), 184–19
- Dea Afrila, Rahmiati., Husnul Khatimah., Noor Muthmainah., & Ida Yuliana. 2020. Identifikasi *Staphylococcus aureus* PADA AIR GALON BERMEREK DAN ISI ULANG DI BANJARMASIN. *Homeostasis* Vol. 3 No. 2, Agustus 2020: 161-168
- Gusmiaty Sari, N.A., Safira, T.N., & Budiman A., Larekeng, S.H. 2021. Polimorfisme

Penanda RAPD Untuk Analisis Keragaman Genetik Kemiri *Aleurites mollucana* Di Kabupaten Maros. *BIOMA: JURNAL BIOLOGI MAKASSAR*. ISSN:2548 - 6659

Handayani, S. O., & Putri, D. H. (2021). Comparison of Fenol-Kloroform Method and Mini-Prep CTAB Method for Chili (*Capsicum annum* L.) Plant DNA Isolation. *Jurnal Serambi Biologi*, 6(2), 37-41

Putri, A. A., Ahda, Y., Putri, H. D., Achyar, A. 2023. Optimasi Isolasi DNA Bakteri Patogen pada Sampel Air Sungai Berbasis PCR. *Serambi Biologi* e-ISSN: 2722-2829

Sasmito, D., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Informatika Medis*, 93–102.

Sari, R. M., Afifatul A., Ahda, Y., Putri, D.H (2022). *Genotyping of Sumatera local variety of citrus using random amplified polymorphism DNA (RAPD) technique*. *Tropical Genetics*, 2(2), 56-65

Sirwati, F., Nurfalinda, S., Salsabila, S., Putri, D.H. (2024). *Comparison of Boiling Methods for Bacterial DNA Isolation Using Waterbath and Heatblock*. *Jurnal Serambi Biologi*, 9(1), 115-118

Syamsurizal, S., Handayani, D., Kadri, H., & Badriyya, E. (2019). Genotyping. *Journal of Physics: Conference Series*, 1317, 1–8.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada ibu dosen Afifatul Achyar S.Si, M.Si dan Dr. Yuni Ahda S.Si, M. Si selaku dosen pengampu mata kuliah Teknik Biologi Molekuler beserta asisten laboratorium Hafizah Fadhillah S. Si dan Hafizhah Putrizalda S. Si yang telah membantu dalam kegiatan penelitian ini.