

Karakteristik Profil DNA Isolat Bakteri dari Sampel Air Galon Kantin Kimia FMIPA dengan Teknik RAPD Menggunakan Primer OPA 02 dan OPA 04

Laila Mardhiyah Nazri^{1)*}, Nadila Safitri¹⁾, Yulisa Fitri¹⁾, Afifatul Achyar¹⁾, Yuni Ahda¹⁾

¹⁾Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Barat., Kec. Padang Utara, Kota Padang, Sumatera Barat 2517

*Email: LaylaMardhiyah03@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to analyze the DNA characteristic profile of bacterial isolates from gallon water samples in the FMIPA Chemistry canteen using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique, which has been proven effective in evaluating bacterial genetic diversity. The RAPD technique using primers OPA 02 and OPA 04 has proven effective in evaluating bacterial genetic diversity. The sample did not show any bands on Primers OPA 02 and OPA 04. Because the primer sequences were not present in the bacteria, the primers could not be read, so they were not amplified. The isolated bacteria could not be amplified because they did not have DNA sequences and did not match the primers. According to theory, primer OPA 02 produces 12 DNA bands with a size of 200-1500 bp, and primer OPA 04 produces 10 DNA bands with a size of 300-1200 bp. The results of 16s RNA primer isolation from this study can be seen by using 16s RNA primers. The first isolate of 16s RNA primer has DNA bands, while the second isolate has no bands, which means there are genetic differences targeted by RAPD primers. This study shows that the RAPD method can be used to find and describe bacterial isolates from gallon water samples. This information is important for monitoring drinking water quality and preventing the spread of diseases caused by bacteria.

Keywords : *Molecular, Boiling, PCR RAPD, Electrophoresis, Bacteria*

ABSTRACT

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis profil karakteristik DNA isolat bakteri dari sampel air galon di kantin Kimia FMIPA menggunakan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), yang telah terbukti efektif dalam mengevaluasi keragaman genetik bakteri. Teknik RAPD menggunakan primer OPA 02 dan OPA 04 telah terbukti efektif dalam mengevaluasi keragaman genetik bakteri. Sampel tidak menunjukkan pita pada Primer OPA 02 dan OPA 04. Karena sekuensi primer tidak ada di bakteri, primer tidak dapat dibaca, sehingga tidak teramplifikasi. Bakteri yang diisolasi tidak dapat teramplifikasi karena tidak memiliki urutan DNA dan tidak sesuai dengan Primer. Menurut teori, primer OPA 02 menghasilkan 12 pita DNA dengan ukuran 200–1500 bp, dan primer OPA 04 menghasilkan 10 pita DNA dengan ukuran 300–1200 bp.

Kata kunci: *Molekular, Boiling, RAPD PCR, Elektroforesis, Bakteri*

PENDAHULUAN

Isolasi DNA genom adalah langkah awal dalam melakukan analisis genetika dan molekular. Isolasi DNA adalah teknik yang digunakan untuk mendapatkan DNA murni, yaitu yang tidak terdapat protein dan RNA dari suatu sel dalam jaringan. Tahapan isolasi DNA yaitu preparasi ekstrak sel, pemurniaan DNA dari ekstrak sel dan presipitasi DNA. Sel memiliki membran sel dan dinding sel yang kuat. Dinding sel tersusun atas polisakarida dan membrane sel terdiri dari ikatan protein dan lemak. Untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel, membran sel dan dinding sel harus dipecah. Pemecahan tersebut dapat secara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Isolasi DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode (Handayani, et al., 2021 dan Sirwati et al., 2024).

Metode boiling merupakan salah satu metode untuk mendapatkan DNA template. Metode boiling mampu mengekstrak DNA dari sampel sputum dengan cara dipanaskan dan diinkubasi pada waterbath, sehingga permeabilitas dinding sel bakteri meningkat yang mengakibatkan cairan di sekitar sel akan masuk dan materi- materi dari dalam sel seperti DNA akan keluar. DNA yang telah didapatkan dipisahkan dengan pemutaran, sehingga materi selain DNA akan mengendap pada dasar tabung sedangkan DNA terdapat dalam supernatant. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan NanoDrop Spectrophotometer sebelum sampel DNA diamplifikasi. Pada metode boiling, ekstraksi DNA dilakukan dengan memberikan pemanasan terhadap sel dengan suhu tinggi. Suhu yang diperlukan dan lamanya waktu pemanasan sangat dipengaruhi oleh sampel yang digunakan. Pemanasan menggunakan suhu tinggi dapat meningkatkan permeabilitas dan merusak dinding sel sehingga mengakibatkan terjadinya perpindahan cairan dan molekul di sekitar sel dengan komponen-komponen yang berada dari dalam sel (Fihiruddin, et al., 2022).

Salah satu metode yang digunakan untuk menganalisis keragaman genetik adalah dengan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). RAPD merupakan salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat interspesies maupun antar spesies Teknik RAPD memiliki keunggulan diantaranya adalah murah dan relatif mudah dilakukan karena hanya memerlukan sejumlah kecil DNA, dimana penggunaan RAPD memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang dideteksi dengan menggunakan satu primer acak. RAPD mengidentifikasi polimorfis DNA dari organisme yang diteliti. DNA organisme tersebut diamplifikasi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Suatu organisme dapat berbeda pada tingkat DNA dalam hal perbedaan urutan nukleotida (Suarman, et al., 2021).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) adalah salah satu teknik studi keragaman genetik yang banyak digunakan. Keuntungan dari penggunaan marka molekuler RAPD hanya memerlukan kuantitas DNA yang kecil dan mudah karena tidak memerlukan proses radioaktif, blotting dan hibridisasi, serta dengan cepat dapat mendeteksi polimorfisme pada sejumlah lokus. Prinsip dasar teknik RAPD adalah menggunakan primer tunggal yang menempel pada beberapa lokasi di sepanjang

genom bakteri secara acak. Primer akan memulai proses amplifikasi pada lokasi- lokasi tersebut, menghasilkan produk PCR berupa fragmen-fragmen DNA dengan ukuran yang bervariasi. Pola pita DNA yang dihasilkan dari proses amplifikasi ini akan membentuk profil unik yang mencerminkan variasi genetik di antara isolat bakteri yang dianalisis.

Profil DNA yang dihasilkan dari teknik RAPD ini dapat digunakan untuk membedakan isolat bakteri yang berbeda, bahkan di antara strain yang sangat dekat hubungan kekerabatannya. Teknik ini berguna untuk mengidentifikasi strain bakteri, melacak sumber infeksi, serta mempelajari keanekaragaman genetik dan hubungan kekerabatan antar isolat bakteri. RAPD memiliki tingkat replikasi yang rendah, tetapi sangat efisien dalam menganalisis keragaman genetik karena tidak memerlukan sekuens data untuk merancang primer molekuler. Analisis RAPD yang digunakan saat ini studi untuk penilaian keragaman genetik adalah karena kesederhanaannya, cepat dan mudah dilakukan dan relatif lebih murah dan kebutuhan tidak ada kesadaran akan urutan DNA (Fitriyanti, *et al.*, 2023).

Kualitas DNA setelah pemaparan dengan microwave dianalisis dari pita DNA hasil elektroforesis produk PCR RAPD. Pemaparan bakteri dengan microwave menyebabkan perubahan pada DNA. Reaksi PCR RAPD menggunakan DNA hasil isolasi dari bakteri yang terpapar microwave menghasilkan pita baru pada hasil elektroforesis. Semakin lama bakteri dipaparkan microwave, semakin terang dan tebal pola pita DNA baru yang dihasilkan. Pemaparan kultur bakteri menggunakan microwave mempengaruhi DNA hasil isolasi. Semakin lama kultur dipaparkan microwave, semakin terang dan tebal pola pita DNA baru yang dihasilkan (Pratiwi, *et al.*, 2023 dan Sari *et al.*, 2022).

Prinsip dasar elektroforesis adalah pergerakan molekul bermuatan atau ion melalui medium semisolid di bawah pengaruh suatu medan listrik. Elektroforesis dapat digunakan untuk mengetahui ukuran DNA dengan menggunakan DNA marker yang sudah diketahui ukurannya. DNA marker ini berfungsi sebagai pembanding sehingga bisa diketahui perkiraan ukuran DNA sampel. Jika molekul yang bermuatan negatif (DNA) dilewatkan melalui gel agarosa, kemudian dialiri arus listrik dari satu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya, maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif, sehingga elektroforesis dapat memisahkan DNA berdasarkan ukuran panjangnya (Sundari, *et al.*, 2020).

Semua informasi genetik yang diperlukan untuk sel bakteri berfungsi dikodekan dalam DNA genomik bakteri. Karena gen pengkode 16S rRNA memiliki daerah konservatif dan variatif, pendekatan molekular banyak digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Untuk analisis DNA seperti PCR dan sekuensing, isolasi DNA genomik mikroorganisme yang cepat sangat penting. Gen pengkode 16S rRNA dapat diamplifikasi dengan metode PCR dengan menggunakan teknik ini. Primer universal spesifik terhadap gen 16S rRNA, produk PCR dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis bakteri melalui metode sekuensing (Afif, *et al.*, 2019).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik profil DNA isolat bakteri dari sampel air galon kantin kimia fmipa dengan teknik RAPD menggunakan primer OPA 02 dan OPA 04.

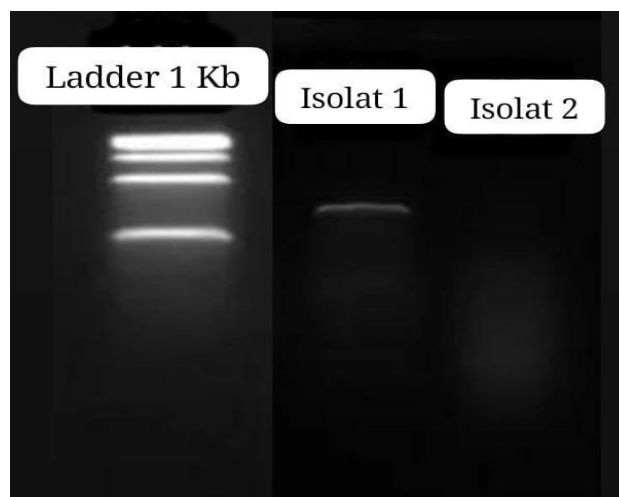
METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif, Penelitian ini dilaksanakan pada semester Genap Tahun Ajaran 2024/2025 tepatnya pada bulan Mei - Juni. Lokasi penelitian berada di laboratorium Genetika dan Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Adapun sampel dari penelitian ini adalah bakteri dari air galon kantin fmipa. Pada penelitian ini menggunakan teknik isolasi bakteri (Afif & Putri., 2019), RAPD PCR dan Elektroforesis. Hasil visualisasi elektroforesis yang didapat akan dianalisis dengan membandingkan jumlah pita DNA monomorfik dan polimorfik.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Primer OPA 02 dan OPA 04



Gambar 2. Primer 16s RNA

Profil DNA isolat bakteri dari sampel air galon kantin Kimia FMIPA menggunakan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dapat memberikan informasi yang berguna dalam karakterisasi genetik bakteri yang ditemukan di lingkungan tersebut. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Mei sampai bulan Juni 2024 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik profil DNA isolat bakteri dari sampel air galon kantin kimia fmipa dengan teknik RAPD menggunakan primer OPA 02 dan OPA 04.

Hasil isolasi isolat 1 dengan konsentrasi 27,200 ng/ μ L dan kemurnian A260/A280 adalah 1,343. Dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, konsentrasi Isolat 1 diukur. Spektrum absorbansi Isolat 1 menunjukkan puncak absorbansi pada panjang gelombang 260 nm, yang merupakan panjang gelombang absorbansi maksimum DNA. Kemurnian Isolat 1 diukur dengan menggunakan rasio A260/A280, yang merupakan rasio antara absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan absorbansi pada panjang gelombang 280 nm, dengan nilai ideal rasio A260/A280 adalah antara 1,8 dan 2,0. Rasio A260/A280 di sini adalah 1,343, yang menunjukkan bahwa Isolat 1 masih tercemar dengan protein dan RNA.

Hasil isolasi isolat 2 dengan konsentrasi 45,50 ng/ μ L dan kemurnian A260/A280 adalah 1,802. Dengan konsentrasi 45,50 ng/ μ L dan kemurnian 100%, isolasi isolat 2 berhasil dan menghasilkan isolat yang murni. Prinsip RAPD ini memanfaatkan primer acak (random primer) untuk mengamplifikasi (memperbanyak) fragmen DNA secara acak di seluruh genom bakteri. Keunggulan RAPD adalah metode yang cepat, relatif murah, dan tidak memerlukan pengetahuan sekuens DNA sebelumnya. Hal ini membuatnya cocok untuk studi awal karakterisasi genetik bakteri tanpa perlu informasi genomik mendalam. Hasil dari analisis RAPD adalah pola-pola amplifikasi DNA yang diperoleh dari masing-masing isolat bakteri. Pola ini biasanya direpresentasikan sebagai pola pita (band) pada gel elektroforesis, di mana setiap pola dapat mewakili variasi genetik antar isolat. Jenis Pola RAPD terdapat berbagai jenis pola RAPD yang mungkin ditemukan, tergantung pada primer yang digunakan dan variasi genetik dalam populasi bakteri. Pada uji sebelumnya menggunakan Primer OPA 02 dan OPA 04. Primer OPA 02 dan OPA 04 adalah dekamer (oligonukleotida sintetis sepanjang 10 basa) yang umum digunakan dalam teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). RAPD teknik amplifikasi DNA yang acak dan multilokus yang digunakan untuk menganalisis keragaman genetik pada berbagai organisme.

Tabel 1. Karakteristik Primer OPA 02 dan OPA 04 (Utomo, et al., 2021).

Primer kode	Sekuens	Ukuran pita DNA
OPA 02	5'-TGC CGA GCT G-3'	49-96 bp
OPA 04	5'-AAT CGG GCT G-3'	384-465 bp

Keunggulan Primer OPA 02 dan OPA 04 ini mudah digunakan dan murah, RAPD adalah teknik yang relatif sederhana dan tidak memerlukan peralatan yang mahal. kedua tidak memerlukan informasi sekuen DNA sebelumnya: RAPD dapat digunakan tanpa mengetahui urutan DNA target. Ketiga Sensitif, RAPD dapat mendeteksi perbedaan genetik yang kecil, dan Hasil yang cepat, Profil RAPD dapat diperoleh dalam waktu yang singkat. Sedangkan Kekurangan Primer OPA 02 dan OPA 04 yaitu Hasil yang bervariasi, Hasil RAPD dapat bervariasi tergantung pada kondisi reaksi, seperti temperatur annealing dan konsentrasi primer. Sulit untuk diinterpretasikan, Pola pita DNA yang kompleks dapat sulit untuk diinterpretasikan. Tidak dapat mendeteksi semua mutase, RAPD hanya dapat mendeteksi mutasi yang menghasilkan perubahan ukuran pita DNA.

Pada hasil visualisasi DNA dari isolat bakteri tidak ditemukan adanya pita DNA. Hal tersebut dapat dipengaruhi dari faktor. Faktor yang menyebabkan tidak ditemukan pita saat uji elektroforesis DNA yaitu pada primer, karena sekuensi primer itu tidak ada di bakteri menyebabkan primer tidak terbaca sehingga tidak teramplifikasi. Primer RAPD, Primer acak jadi pada bakteri yang digunakan dan bakteri yang diisolasi itu dari bakteri air tidak ada urutan DNA disana tidak sesuai dengan primer maka dari itu menyebabkan tidak teramplifikasi sehingga tidak keluar pita saat elektroforesis. Oleh sebab itu untuk membuktikan bahwa terdapat pita dari hasil isolasi maka digunakan primer 16s RNA. Pada Primer 16s RNA ditemukan pita pada isolat pertama sedangkan yang isolat kedua tidak ditemukan pita. Tidak ditemukan pita pada isolat kedua kemungkinan dapat terjadi perbedaan genetik, kedua isolat memiliki perbedaan genetik di daerah yang ditargetkan oleh primer RAPD. Hal ini dapat disebabkan oleh mutasi, indel, atau variasi lainnya dalam urutan DNA. Primer 16s RNA berperan penting dalam berbagai aplikasi biologi molekuler, di antaranya analisis filogenetik bakteri, urutan gen 16s RNA dapat digunakan untuk merekonstruksi hubungan evolusi antar spesies bakteri.

Perbedaan kecil dalam urutan gen 16s RNA dapat merepresentasikan perbedaan evolusi yang signifikan antar spesies. Pada PCR, primer 16s RNA digunakan untuk mengikat secara spesifik pada urutan target dalam gen 16s RNA sampel DNA bakteri. Enzim DNA polimerase kemudian memperpanjang primer, menghasilkan salinan DNA target yang dapat dianalisis lebih lanjut. Konsentrasi primer yang rendah membantu meminimalkan amplifikasi produk non-spesifik dan meningkatkan akurasi hasil PCR. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi primer 16s RNA yang optimal dalam suatu percobaan, antara lain.

Panjang primer, Primer yang lebih panjang umumnya membutuhkan konsentrasi yang lebih rendah daripada primer yang lebih pendek. Kompleksitas templat DNA, Templat DNA yang kompleks dengan banyak struktur sekunder mungkin memerlukan konsentrasi primer yang lebih tinggi untuk memastikan amplifikasi yang efisien. Sensitivitas metode deteksi, Jika metode deteksi yang digunakan sangat sensitif, konsentrasi primer yang lebih rendah mungkin cukup.

KESIMPULAN

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) adalah salah satu teknik studi keragaman genetik yang banyak digunakan. Keuntungan dari penggunaan RAPD hanya memerlukan kuantitas DNA yang kecil dan mudah karena tidak memerlukan proses radioaktif, blotting dan hibridisasi, serta dengan cepat dapat mendeteksi polimorfisme pada sejumlah lokus. Pada primer OPA 02 dan OPA 04 tidak ditemukan pita saat visualisasi elektroforesis. Dalam pengerjaan penelitian selanjutnya disarankan agar untuk lebih berhati-hati lagi dalam proses isolasi, RAPD dan elektroforesis. Dan lebih memperhatikan lagi konsentrasi dan kesterilan dari bahan-bahan yang digunakan.

REFERENSI

- Afif, R., & Putri, D. H. (2019). 16S rRNA Gene amplification of endophytic bacteria which produces antimicrobial compounds. *Serambi Biologi*, 4.
- Fihiruddin, F., Ilmi, H. F., & Khusuma, A. (2022). Variasi Temperatur Boiling pada Amplifikasi Gen inhA M. tuberculosis Metode PCR. *Titian Ilmu: Jurnal Ilmiah Multi Sciences*, 14(2), 57-62.
- Fitriyanti, R. I., Yuniastuti, E., & Nandariyah, N. (2023). Hubungan Kekerbatan Genetik Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Berdasarkan Lima Marka RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). *Agrikultura*, 34(2), 264-273.
- 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
- Pratiwi, N., Pramila, C., Safitri, F., Namidya, S. K., & Putri, D. H. (2023). The Effect of Micro Radiation on Microbial DNA. *Jurnal Serambi Biologi*, 8(1), 74-78.
- 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
- Suarman, f, D., Pramila, C., Oktavira, I, A., Putri, A, A., Ananda, C., Wahyuni, Y., Satria, R., & Achyar, A. (2021) Analisis Variasi Genetik Semut Pekerja (*Oecophylla smaragdina*) Menggunakan Teknik RAPD-PCR. Prosiding SEMNAS BIO Universitas Negeri Padang.
- Sundari, S., & Priadi, B. (2020). Teknik isolasi dan elektroforesis DNA ikan tapah. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 17(2), 87-90
- Utomo, A. H. P., Pramono, T. B., Soedibya, H. T., Sukardi, P., & Syakuri, H. (2021). Analisis Polimorfisme DNA Ikan Gabus (*Channa striata*) Berbeda Ukuran Menggunakan Teknik RAPD. *Sainteks*, 17(2), 133-143.

UCAPAN TERIMAKASIH

Dalam menyelesaikan artikel ini, penulis sangat merasakan sekali bantuan dari berbagai pihak baik itu berupa dukungan, kritik, saran material dan lain-lain. Pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Afifatul Achyar, S.Si., M.Si dan ibu Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si selaku dosen pengampu mata kuliah teknik biologi molekuler serta kepada asisten Kakak Eja dan Kakak Fifi.