

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI ENDOSIMBION DARI CACING
TANAH *Lumbricus rubellus* MENGGUNAKAN METODE GEN 16S rRNA**

**UMMU ATHIRA SAKIR
H041 17 1505**



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI ENDOSIMBION DARI CACING
TANAH *Lumbricus rubellus* MENGGUNAKAN METODE GEN 16S rRNA**

*Skripsi ini dibuat untuk Melengkapi Tugas Akhir dan Memenuhi Syarat untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains pada Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin*

UMMU ATHIRA SAKIR

H041171505

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**IDENTIFIKASI ISOLAT BAKTERI ENDOSIMBION DARI CACING
TANAH *Lumbricus rubellus* MENGGUNAKAN METODE GEN 16S rRNA**

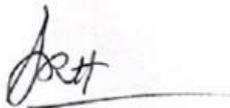
Disusun dan diajukan oleh

**UMMU ATHIRA SAKIR
H041171505**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam Rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas
Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada Tanggal 1 Juli 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



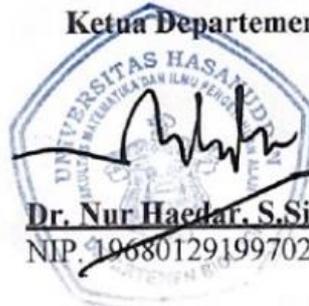
Prof. Dr. Dirayah Rauf Husain, DEA
NIP.196005251986012001

Pembimbing Pertama,



Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si
NIP.196512091990082001

Ketua Departemen,



Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si.
NIP.196801291997022001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Ummu Athira Sakir

NIM : H041171505

Program Studi : Biologi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Identifikasi Isolat Bakteri Endosimbion dari Cacing Tanah *Lumbricus rubellus* Menggunakan Metode Gen 16S rRNA adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, Juli 2021

Yang menyatakan,



Ummu Athira Sakir

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahiim,

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas Limpah Rahmat dan Karunia-nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul, “Identifikasi Isolat Bakteri Endosimbion dari Cacing Tanah *Lumbricus rubellus* Menggunakan Metode Gen 16S rRNA” yang menjadi salahsatu syarat untuk menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena menyadari segala keterbatasan yang ada. Oleh karena itu untuk menyempurnakan skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pemikiran yang berupa kritik dan saran yang bersifat membangun. Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis.

Penghargaan dan terima kasih yang setulus-tulusnya saya berikan kepada semua pihak yang penuh suka cita memberikan dukungan, motivasi, semangat serta bantuan selama proses pencapaian gelar sarjana terkhusus kepada Ayahanda tercinta M. Sakir dan Ibunda yang kusayangi Mardawiah yang telah mencurahkan segenap cinta dan kasih sayang serta perhatian mortil maupun materil serta kiriman doa yang tidak henti-hentinya dicurahkan kepada penulis. Terima kasih telah menjadi alasan utama dan motivasi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini,

semoga dengan meraih gelar sarjana ini menjadi hadiah terindah dari penulis untuk keluarga.

Teruntuk Ibu Prof. Dr. Dirayah Rauf Husain, DEA selaku pembimbing utama sekaligus Penasehat Akademik (PA) dan Ibu Dr. Zaraswati Dwiyana M.Si selaku pembimbing pertama, penulis menghanturkan banyak ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya atas segala bantuan, dukungan dan motifasi selama penulis melaksanakan proposal, penelitian hingga pada tahap penyusunan skripsi ini. Terimakasih telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan serta arahan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi pada waktu yang tepat. Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. Selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
2. Ibu Dr. Nur Haedar M.Si selaku Ketua Departemen Biologi Universitas Hasanuddin. Penulis mengucapkan terima kasih atas ilmu, masukan, saran dan dukungannya.
3. Bapak Dr. H. Muhtadin Asnady Salam, M.Si dan Bapak Dr. Ambeng, M.Si selaku dosen penguji terima kasih telah memberikan bimbingan, motivasi, saran dan ilmunya kepada penulis dari awal studi hingga penyusunan skripsi.
4. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Staf pegawai Departemen Biologi yang telah membantu

menyelesaikan baik administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.

5. Kak Fuad Gani S.Si. dan kak Heriadi, S.Si. M.Si. terima kasih atas dukungan, kritik, saran serta banyak membantu selama penelitian hingga penyusunan skripsi ini. Terima kasih atas segala ilmu dan kebaikan hatinya yang telah dicurahkan kepada penulis.
6. Kak Rihuh Wardhani S.Si. yang telah memberikan dukungan, ilmu serta kesabarannya dalam membantu penulis selama proposal, penelitian hingga menyelesaikan skripsi ini.
7. Teman-teman seperjuangan Biologi 2017 yang saya cintai, terima kasih atas dukungan, doa, motivasi serta pengalaman dan kebersamaan yang telah diberikan kepada penulis.
8. Kepada Sopia Lacuba, Arifah Zakaria, Nurul Fitra, Rizki Dwi Andira dan Nanda Febrialita terima kasih atas segala dukungan, doa, dan kebaikan hatinya kepada penulis sejak awal perhuliahan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
9. Kepada Fify Aulia dan seluruh keluarga besar H. Masse dan Hj. Caya terima kasih atas dukungan dan doa yang telah diberikan kepada penulis.
10. Kepada julak Hj. Masriang S.Pd terima kasih atas dukungan, doa dan banyak membantu selama perkuliahan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi.

Makassar 01 Juli 2021

Ummu Athira Sakir

ABSTRAK

Endosimbion merupakan bentuk hubungan evolusioner yang biasanya melibatkan organisme prokariotik dan eukariotik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi jenis bakteri endosimbion yang di peroleh dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* dengan menggunakan metode analisis molekuler sekuensing gen 16S rRNA terlebih dahulu, pengamatan morfologi koloni, morfologi sel dan uji biokimia pada isolat bakteri endosimbion tersebut. Identifikasi secara molekuler dimulai dari ekstraksi DNA, kemudian di amplifikasi dengan primer universal 16S rRNA (63F dan 1387R) menggunakan PCR, lalu dielektroforesis dan dilakukan sekuensing. Hasil sekuens gen dianalisis untuk pencarian homologi menggunakan program BLAST. Isolat F3 merupakan bakteri Gram-positif tunggal yang berbentuk batang, berwarna cream, permukaan koloni halus, berbentuk bulat, tepian rata, elevasi cembung, bersifat heterofermentatif katalase negatif, non motil. Hasil amplifikasi dengan PCR menunjukkan amplikasi 1300 bp dari sekuens DNA gen 16S rRNA. Hasil analisis sekuens dari bakteri endosimbion isolat F3 menunjukkan persen kemiripan yang tinggi (98.40%) dengan *Bacillus velezensis*. Hasil identifikasi tersebut menunjukkan bahwa isolat F3 yang diisolasi dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* merupakan *Bacillus velezensis* strain BvL03.

Kata Kunci: Identifikasi, Bakteri Endosimbion, Cacing Tanah *Lumbricus rubellus*, Gen 16S rRNA.

ABSTRACT

Endosymbionts are a form of evolutionary relationship that usually involves prokaryotic and eukaryotic organisms. The purpose of this study was to identify the types of endosymbiont bacteria obtained from the earthworm *Lumbricus rubellus* using the 16S rRNA gene sequencing method first, observation of colony morphology, cell morphology and biochemical tests on the endosymbiont bacteria isolates. Molecular identification was started from DNA extraction, then amplified with universal primers 16S rRNA (63F and 1387R) using PCR, then electrophoresis and sequencing. The results of the gene sequences were analyzed for homology search using the BLAST program. Isolate F3 is a single Gram-positive bacteria that is rod-shaped, cream-colored, smooth colony surface, round shape, flat edges, convex elevation, catalase negative heterofermentative character, non motile. The PCR amplification results showed 1300 bp amplification of the DNA sequence of the 16S rRNA gene. The results of the sequence analysis of endosymbiont bacteria isolate F3 showed a high percentage of similarity (98.40%) with *Bacillus velezensis*. The identification results indicated that the F3 isolate isolated from the earthworm *Lumbricus rubellus* was *Bacillus velezensis* strain BvL03.

Keywords: Identification, Endosymbiont Bacteria, *Lumbricus rubellus*, 16S rRNA gene.

DAFTAR ISI

LEMBAR SAMPUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian.....	3
I.3 Manfaat Penelitian.....	4
I.4 Waktu dan Tempat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Deskripsi Umum Cacing Tanah.....	5
II.1.1 Klasifikasi	5
II.1.2 Morfologi dan Anatomi	5
II.2 Eksistensi Mikroorganisme pada Cacing Tanah sebagai Endosimbion.....	6
II.3 Metode Identifikasi Bakteri	8

II.3.1 Identifikasi Bakteri Menggunakan Karakteristik Fenotifik dan Uji Biokimia	8
II.3.2 Gen 16S rRNA.....	10
II.4 Tahap Metode Identifikasi Menggunakan Gen 16S rRNA.....	11
II.4.1 Ekstraksi DNA.....	11
II.4.2 Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	12
II.4.3 Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis	17
II.4.4 Sekuensing DNA	19
II.4.5 Analisis Sekuen DNA.....	19
BAB III METODE PENELITIAN	21
III.1 Alat	21
III.2 Bahan	21
III.3 Cara Kerja.....	22
III.3.1 Sterilisasi Alat	22
III.3.2 Pembuatan Media.....	22
III.3.3 Pemurnian Bakteri Endosimbion <i>Lumbricus rubellus</i>	23
III.3.4 Uji Biokimia Pada Bakteri Endosimbion	24
III.3.5 Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Endosimbion.....	25
III.3.6 Pengecatan Gram Bakteri Endosimbion.....	26
III.3.7 Ekstraksi DNA	26
III.3.8 Amplifikasi Gen 16S rRNA	27
III.3.9 Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis.....	28
III.3.10 Sekuensing DNA.....	28

III.3.11 Analisis Data	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
IV.1 Pengamatan Morfologi Sel dan Koloni Bakteri Endosimbion	29
IV.1.1 Morfologi Koloni Bakteri Endosimbion	29
IV.1.2 Morfologi Sel Bakteri Endosimbion	30
IV.2 Uji Biokimia	32
IV.2.1 Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)	32
IV.2.2 Uji SIM (Sulfide Indol Motility)	33
IV.2.3 Uji MR (<i>Methyl-red</i>)	34
IV.2.4 Uji VP (<i>Voges-proskauer</i>).....	34
IV.2.5 Uji Sitrat	35
IV.2.6 Uji Katalase	36
IV.3 Ekstraksi DNA Bakteri Endosimbion	37
IV.4 Amplifikasi Gen 16S rRNA dan Visualisasi Hasil <i>Polymerase Chain</i> <i>Reaction</i>	39
IV 5. Analisis Fragmen 16s rRNA Dengan Sekuensing.....	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	45
V.1 Kesimpulan	45
V.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 1.	Hasil Uji Morfologi Koloni.....	30
Tabel 2.	Hasil Uji TSIA Bakteri Endosimbion	32
Tabel 3.	Hasil Analisis Sekuensing Bakteri Endosimbion F3	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 1.	Tahapan PCR.....	17
Gambar 2.	Morfologi Koloni Bakteri Endosimbion Isolat F3	29
Gambar 3.	Morfologi Sel Bakteri Endosimbion Isolat F3	30
Gambar 4.	Hasil Pengamatan Uji Biokimia TSIA	32
Gambar 5.	Hasil Pengamatan Uji Biokimia SIM.....	33
Gambar 6.	Hasil Pengamatan Uji MR (<i>Methyl red</i>)	34
Gambar 7.	Hasil Pengamatan Uji VP (<i>Voges proskauer</i>)	35
Gambar 8.	Hasil Pengamatan Uji Sitrat	36
Gambar 9.	Hasil Uji Katalase Bakteri Endosimbion F3	36
Gambar 10.	Hasil Ekstraksi DNA Bakteri Endosimbion.....	38
Gambar 11.	Hasil Amplifikasi Gen 16s rRNA Dengan Primer 63F dan 1387R ..	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1.	Skema Kerja Penelitian	52
Lampiran 2.	Peremajaan Isolat Bakteri Endosimbion.....	53
Lampiran 3.	Sekema Kerja Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Endosimbion	54
Lampiran 4.	Skema Kerja Pengecatan Gram Bakteri Endosimbion	55
Lampiran 5.	Skema Kerja Uji Biokimia Bakteri Endosimbion	56
Lampiran 6.	Ekstraksi DNA Bakteri gram positif	57
Lampiran 7.	Amplifikasi DNA	58
Lampiran 8.	Sekema kerja Visualisasi Produk PCR Dengan Elektroforesis	59
Lampiran 9.	Dokumentasi Peremajaan dan Pembuatan Stok Isolat Bakteri Endosimbion	60
Lampiran 10.	Dokumentasi Pengamatan Morfologi Koloni dan Morfologi Sel Bakteri Endosimbion Isolat F3.....	61
Lampiran 11.	Dokumentasi Uji Biokimia Bakteri Endosimbion Isolat F3	62
Lampiran 12.	Dokumentasi Ekstraksi DNA Bakteri Endosimbion Isolat F3	65
Lampiran 13.	Dokumentasi Amplifikasi DNA dengan PCR	67
Lampiran 14.	Dokumentasi Visualisasi Produk PCR Dengan Elektroforesis	68
Lampiran 15.	Hasil Analisis Sekuens DNA Isolat F3.....	69

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Cacing tanah khususnya *Lumbricus* sp. digunakan sebagai obat herbal di Korea, Vietnam, dan banyak tempat lain di Asia Tenggara sejak ribuan tahun yang lalu. Cacing tanah telah dicantumkan dalam “Ben Cao Gang Mu”, buku bahan obat standar (farmakope) pengobatan tradisional Cina. Dalam dunia modern sekarang ini, senyawa aktif cacing tanah digunakan sebagai bahan obat herbal, bahkan dalam produk kosmetik sebagai bahan aktif digunakan untuk pelembut kulit, pelembab wajah, dan antiinfeksi. Sebagai produk herbal, telah banyak merek produk yang menggunakan ekstrak cacing tanah sebagai campuran bahan aktif (Suryani, 2010). Dalam penelitian yang telah dilakukan oleh Dharmawati *et al.* (2019) *Lumbricus rubellus* mengandung antimikroba peptida (AMP) disebut Lumbricin-1 yang berfungsi sebagai pertahanan alami melawan mikroba patogen.

Penelitian lain mengungkap potensi bakteri endosimbion cacing tanah dalam menghasilkan senyawa antimikroba, seperti penelitian dari Husain *et al.* (2018) yang mengevaluasi aktivitas antimikroba dari senyawa bakteri endosimbion cacing tanah *Pheretima* sp. Berdasarkan hasil isolasi dan uji daya hambat isolat bakteri endosimbion cacing tanah *Pheretima* sp. disimpulkan bahwa isolat yang teridentifikasi sebagai *Bacillus choshinensis* dan *Bacillus brevis* dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *S. thypi* dan *S. aureus*.

Menurut Bara *et al.* (2015) Organisme endosimbionik memiliki potensi yang sangat besar untuk dieksploitasi dan menghasilkan produk alami baru yang bermanfaat di bidang kedokteran, pertanian, dan industri. Diketahui setiap organisme multiseluler di alam yang tersebar di bumi kita, masing-masing individu tersebut merupakan inang dari satu atau lebih mikroba endosimbion (Strobel *et al.*, 2004). Pentingnya simbiosis adalah memberikan fungsi biologis baru pada inang telah lama diketahui. Bakteri simbiosis dari cacing tanah pertama kali ditemukan melalui studi mikroskop yang dilakukan oleh Knop pada tahun 1926. Bakteri berbentuk batang berada pada ampula, daerah spesifiknya di nefridia, tempat mereka membentuk sebuah biofilm padat (Lund *et al.*, 2014).

Partisipasi mikroorganisme dalam saluran pencernaan cacing tanah sangat penting mengingat banyak dari mikroorganisme tersebut yang terlibat dalam degradasi bahan organik. Bakteri yang ada di dalam usus cacing tanah jenisnya beragam, metode dan teknik yang digunakan untuk membantu dalam mengidentifikasi spesies bakteri yang ada pada cacing tanah telah dilakukan dan didapatkan jenis genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Aeromonas* dan *Enterobacter*. Kristufek *et al.* (1993) mengidentifikasi dua spesies *Streptomyces diastatochromogenes* dan *Streptomyces noglalater* yang merupakan karakteristik bakteri yang berasal dari tanah yang hidup dalam saluran pencernaan dua spesies cacing tanah yaitu *Lumbricus rubellus* dan *Octolasion montanum* (Vega and David, 2009). Identifikasi bakteri menjadi penting dilakukan untuk mengetahui spesies bakteri potensial, seperti bakteri endosimbion cacing tanah *Pheretima* sp.

Identifikasi mikroorganisme secara konvensional dilakukan melalui metode pembiakan dan dilanjutkan dengan pemeriksaan karakteristik fisiologis dan uji biokimia. Saat ini telah dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, dengan melakukan ekstraksi DNA, kemudian DNA yang telah diekstraksi selanjutnya di amplifikasi menggunakan metode PCR dengan primer universal gen 16S rRNA dan dilanjutkan dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (16S ribosomal Ribonucleic acid/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan Svedberg, yaitu satuan ukuran ribosom) (Rinanda, 2011).

Gen 16S rRNA merupakan urutan gen lestari yang dimiliki oleh semua spesies bakteri. Urutan gen ini menyediakan informasi yang penting untuk identifikasi semua spesies. Gen 16S rRNA nyatanya sangat efektif digunakan karena memiliki keakuratan yang tinggi dan juga tidak memakan waktu dalam pengidentifikasiannya (Akihary and Beivy, 2020). Berdasarkan uraian diatas maka dilakukan penelitian ini untuk mengidentifikasi bakteri endosimbion yang diisolasi dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* dengan menggunakan PCR metode gen 16S rRNA.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi jenis bakteri endosimbion yang di peroleh dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* dengan menggunakan metode analisis molekuler sekuensing gen 16S rRNA.

I.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini yaitu memberikan informasi ilmiah mengenai salah satu jenis bakteri endosimbion yang berpotensi sebagai anti bakteri dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* menggunakan metode 16S rRNA.

I.4 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2020 - Maret 2021. Penyiapan sediaan bakteri Endosimbion dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi dan Preparasi DNA sampel dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Science Building, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Deskripsi Umum Cacing Tanah

Cacing tanah merupakan hewan tingkat rendah yang tidak mempunyai tulang belakang. Cacing tanah mempunyai banyak manfaat, antara lain dapat digunakan sebagai pendegradasi sampah, pakan ternak, bahan baku obat, dan bahan baku kosmetik. Keragaman cacing tanah pada suatu area dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yang meliputi jenis bahan organik, pH tanah, kadar air tanah, dan suhu tanah. Populasi cacing tanah pada musim hujan lebih banyak dibandingkan pada musim kemarau. Hal tersebut terkait dengan kadar air tanah, yang pada musim hujan lebih tinggi dibandingkan pada musim kemarau (Ratnawati *et al.*, 2019).

II.1.1 Klasifikasi

Berikut merupakan klasifikasi dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* (Hasbuna *et al.*, 2018).

Filum : Annelida

Kelas : Clitellata

Ordo : Haplotaxida

Famili : Lumbricidae

Genus : *Lumbricus*

Spesies : *Lumbricus rubellus*

II.1.2 Morfologi dan Anatomi

Secara morfologi, tubuh cacing tanah tersusun atas segmen-segmen yang berbentuk cincin, dan setiap segmen memiliki seta kecuali pada 2 segmen pertama. Seta adalah struktur seperti rambut yang berfungsi untuk menggali substrat dan

memegang pasangan saat kopulasi, serta sebagai alat gerak cacing tanah. Cacing tanah memiliki mulut pada ujung anterior (tidak bersegmen) yang disebut prostomium. Sebagai hewan hermaprodit, organ reproduksi cacing tanah, baik organ kelamin jantan dan betina, terletak pada beberapa segmen bagian anterior tubuhnya. Secara umum organ kelamin jantan terdiri dari dua pasang testis, yang terletak pada segmen ke-10 dan 11, sedangkan organ kelamin betina yaitu ovarium terletak pada segmen ke-13. Setelah dewasa akan terjadi penebalan epitelium pada posisi segmen tertentu membentuk klitellum (tabung peranakan atau rahim). Klitellum tersebut dapat berwarna lebih pekat atau lebih pudar dibandingkan dengan bagian tubuh lainnya (Roslim *et al.*, 2013).

Cacing tanah dewasa (usia 10 minggu) dapat kawin setiap 10 hari sekali dan menghasilkan satu atau dua kokon dengan masing-masing kokon menampung sekitar 10 telur. Penetasan telur akan dipengaruhi oleh suhu lingkungan, berkisar tiga minggu hingga tiga bulan. Optimum pada suhu 60°F hingga 70°F (± 15.56 °C-21.11°C) (Anggada *et al.*, 2019).

II.2 Eksistensi Mikroorganisme pada Cacing Tanah sebagai Endosimbion

Cacing tanah berperan meningkatkan jumlah populasi mikroba tanah. Menurut Parmelee *et al.* (1990) di dalam usus cacing tanah terjadi pertumbuhan mikroba tanah yang lebih baik dan lebih banyak daripada di dalam tanah, sehingga cacing tanah dapat dianggap sebagai tempat pembenihan mikroba tanah. Peranan penting cacing tanah dalam meningkatkan kesuburan tanah antara lain dengan menyebarkan bahan organik dan mikroorganisme ke lapisan tanah yang lebih dalam serta meningkatkan aerasi tanah. Cacing tanah yang mati merupakan

sumber makanan mikroorganisme tanah dan unsur hara yang dilepaskan dapat meningkatkan kesuburan tanah. Selain itu terdapat mikroorganisme yang bersifat endosimbion pada cacing tanah yang memiliki senyawa antibiotik. Mikroorganisme sangat berperan penting dalam memanfaatkan bahan organik yang terdapat pada saluran pencernaan cacing tanah yang dapat membantu cacing tanah dalam menghasilkan senyawa antibiotik (Kosman and Subowo, 2010).

Endosimbion dan inangnya merupakan domain kehidupan yang berbeda. Sebagai konsekuensinya, penggabungan mereka bisa menghasilkan kombinasi yang baru, akibatnya penggabungan tersebut berkemampuan menghasilkan biokimia dan dua spesies yang saling terkait akan berkembang di lingkungan yang mungkin tidak ramah terhadap salah satunya. Misalnya, hubungan dari keduanya sering melibatkan endosimbion bakteri hidup dalam inang eukariotik. Dari sudut pandang evolusi, bakteri berkembang beberapa miliar tahun sebelum eukariota. Tak heran, bakteri membawa banyak proses biokimia penting yang berfungsi bagi ekosistem. Hal ini termasuk satu-satunya bentuk energi primer yang diketahui seperti fotosintesis dan kemosintesis, serta mekanisme daur ulang hara, seperti fiksasi nitrogen (Wernegreen, 2012).

Definisi endosimbiosis yang paling komprehensif mencakup spektrum penuh jenis interaksi, dari primer yang berbahaya (parasit) hingga yang bermanfaat menjadi bentuk yang dapat digunakan, dan mensintesis nutrisi yang melengkapi makanan inang, hanyalah beberapa di antaranya. Contoh di bawah ini termasuk endosimbion bakteri dan protista yang menghuni sel protista, tumbuhan, dan invertebrata. Bukan kebetulan bahwa contoh inang vertebrata hilang. Dengan satu pengecualian yang diketahui dari alga menguntungkan yang hidup di dalam sel

salamander, endosimbion intraseluler bersifat patogen pada vertebrata (Wernegreen, 2012).

II.3 Metode Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode, baik secara konvensional maupun yang lebih spesifik secara molekuler. Identifikasi secara konvensional dapat dilakukan dengan pengamatan ciri morfologi, pewarnaan Gram, maupun dari aktivitas enzimatik. Teknik molekuler untuk identifikasi spesies suatu bakteri salah satunya adalah dengan menggunakan analisis 16S rRNA. Analisis 16S rRNA berupa sekuens untuk mengidentifikasi bakteri dari urutan pasangan basanya, sehingga diperoleh hasil yang lebih akurat (Wulandari and Desi, 2019).

II.3.1 Identifikasi Bakteri Menggunakan Karakteristik Fenotifik dan Uji Biokimia

Karakterisasi fenotipik bakteri dapat dilakukan dengan cara mikroskopik, perbedaan metabolisme dan uji biokimia (Hasanah, 2012):

a. Ukuran dan Bentuk

Ukuran dan bentuk mikroorganisme dapat dengan mudah ditentukan dengan pemeriksaan mikroskopis. Berdasarkan ukuran dan bentuk, dapat ditentukan jenis organismenya. Apakah organisme tersebut tergolong prokariotik, jamur atau protozoa.

b. Pengecatan Gram

Metode ini dapat mengidentifikasi antara gram negatif dan positif berdasarkan dinding sel dan permeabilitas membran sel.

c. Karakterisasi Menggunakan Media Petumbuhan

Metode ini menggunakan media selektif dan diferensial untuk melihat proses metabolisme suatu mikroorganisme secara langsung dan dapat mengidentifikasi dari perubahan yang terjadi pada media.

d. Uji Katalase

Uji katalase merupakan pendeteksi keberadaan enzim katalase yang dihasilkan suatu bakteri. Uji ini dilakukan dengan meneteskan hidrogen peroksida pada suatu koloni bakteri. Katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung oksigen pada koloni bakteri yang ditetaskan hidrogen peroksida.

e. Uji Motilitas

Uji Motilitas untuk mengetahui kemampuan pergerakan bakteri; uji Indole dengan cara mengamati perubahan warna yang terjadi setelah penambahan reagen Kovacs kedalam media Tryptone Soya Broth (TSB) yang telah diinokulasikan isolat bakteri selama 1-2 hari

f. Uji Simon citrat

Uji Simon citrat dilakukan dengan cara biakan bakteri diinokulasikan kedalam medium Simmon's Citrate Agar dengan cara goresan menggunakan jarum ose steril selama 1-4 hari, untuk menguji kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon utama bagi bakteri.

G. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji ini memiliki dua prinsip yaitu dapat mengidentifikasi fermentasi karbohidrat dan produksi *hydrogen sulfide*. Uji ini digunakan untuk membantu mengidentifikasi bakteri enterik. Uji ini dilakukan dengan menginokulasikan

suspensi bakteri ke dalam media TSIA dengan cara menusuk bagian *butt* dan menggores bakteri pada bagian *slant*. Bila mikroorganisme hanya dapat memfermentasikan glukosa, maka bagian *butt* media akan berwarna kuning (bersifat asam) dan bagian *slant*-nya akan terdapat warna merah yaitu bersifat basa. Bila mikroorganisme juga dapat memfermentasikan laktosa atau sukrosa atau bisa juga keduanya, maka bagian *slant* dan *butt* media akan berwarna kuning (bersifat asam) serta bagian *butt* media kadangkala terpecah akibat pembentukan gas seperti H₂ dan CO₂.

II.3.2 Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA adalah gen yang digunakan dalam menentukan filogenetik dan taksonomi dari bakteri secara molekuler. Penggunaan 16S rRNA sekuensing gen di laboratorium klinis menjadi umum untuk mengidentifikasi bakteri biokimia tak dikenal atau menyediakan referensi identifikasi untuk strain yang tidak biasa (Janda and Abbott, 2007). Penggunaan gen 16S rRNA dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) memungkinkan untuk mengidentifikasi bakteri amilolitik dengan cepat dan spesifik. PCR merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro* (Sabbathini *et al.*, 2017).

Proses identifikasi bakteri secara konvensional berdasarkan karakter fenotip bakteri seperti pewarnaan Gram, morfologi koloni, dan aktivitas enzim seringkali tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan adanya evolusi. Kesalahan identifikasi seringkali terjadi dikarenakan hadirnya karakteristik fenotip bakteri yang tidak biasa ataupun kurangnya pengalaman dalam menginterpretasikan data

karakter fenotip. Hal ini menimbulkan hadirnya metode identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Hal ini juga mengurangi prasangka penafsiran dan menyingkirkan kebutuhan untuk kemungkinan "pretest" mengenai klasifikasi mikroorganisme untuk pemeriksaan langsung dan pemilihan database (Sabbathini *et al.*, 2017).

Saat ini telah dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (16S ribosomal Ribonucleic acid/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan Svedberg, yaitu satuan ukuran ribosom). Gen 16S rRNA juga sering disebut sebagai 16S rDNA (16S ribosomal deoxyribose nucleic acid), namun menurut konsensus dari American Society for Microbiology (ASM), istilah 16S rRNA dinilai lebih tepat (Rinanda, 2011).

II.4 Tahap Metode Identifikasi Menggunakan Gen 16S rRNA

II.4.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA adalah proses dan tahapan pertama yang dilakukan untuk mendapatkan total DNA dari suatu biota. Secara umum, ekstraksi DNA meliputi beberapa tahapan proses penting, yaitu dari mulai tahap persiapan hingga akhirnya diperoleh ekstrak DNA yang terlarut dalam suatu larutan penyangga (*buffer*) khusus (Marwayana, 2015).

Adapun tahapan proses ekstraksi DNA, dimulai dari persiapan sampel, pemilihan metode ekstraksi yang tepat, hingga didapatkan ekstrak DNA. Keberhasilan proses ekstraksi DNA dapat diukur melalui beberapa proses, diantaranya adalah melalui pengecekan keberadaan *band* DNA dengan metode

elektroforesis atau melalui pengukuran konsentrasi DNA terlarut dengan metode spektrofotometri (Marwayana, 2015).

Metode *double spin column* yaitu penggunaan membran silika untuk memerangkap DNA yang telah keluar dari sel. Reaksi enzimatik dari proteinase K yang digunakan dalam metode ini mampu melisiskan DNA dari dalam selnya, sehingga mempermudah proses ekstraksi DNA. Penggunaan reagen khusus untuk mengikat dan membersihkan sisa alkohol dan pengotor lainnya, seperti beberapa enzim inhibitor, protein, dan kation bivalen yang masih tersisa dari proses preservasi sampel. Proses pembilasan yang lebih dari sekali dengan menggunakan reagen khusus, dan proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi (8000 rpm hingga 14000 rpm) yang diterapkan dalam metode tersebut, mampu menghasilkan ekstrak DNA yang lebih bersih, lebih murni, dan dengan konsentrasi yang lebih tinggi (Marwayana, 2015).

II.4.2 Amplifikasi Gen 16S rRNA

Aplikasi molekuler untuk menganalisis keragaman bakteri melalui analisis gen 16S rRNA dapat mengatasi kesulitan untuk kultivasi bakteri. Gen 16S-rRNA sesuai untuk identifikasi bakteri karena gen ini terdapat pada semua organisme. Gen penyandi 16S rRNA mempunyai daerah berbeda yang terdiri atas sekuen gen yang konservatif dan berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenik yang lebih diskriminatif. Sekuen gen penyandi 16S rRNA dari berbagai organisme yang sudah dapat dikulturkan maupun yang tidak dapat dikulturkan telah dibuat dalam bentuk database. Terdapat lebih dari 4000 sekuen yang terdapat pada database 16S-rRNA dan mencakup sekitar 1800 spesies yang jumlahnya terus bertambah (Ambarsari and Efi, 2009).

Spesies bakteri resisten merkuri telah banyak dipelajari, gen 16SrRNA digunakan untuk mempelajari spesies bakteri, dengan alasan bahwa (1) gen 16SrRNA terdapat di dalam semua sel bakteri, sering sebagai kelompok multigen atau operon (2) fungsi gen 16SrRNA dalam waktu yang lama tidak berubah tergantung jarak evolusinya, dan (3) gen 16SrRNA cukup panjang yaitu 1500 bp (Kepel and Fatimawali, 2015).

Salah satu teknik identifikasi molekuler yang dapat digunakan sebagai sarana diagnosis penyakit adalah teknik amplifikasi DNA. Teknik ini mampu melipatnggandakan untai DNA sampel sehingga dapat dianalisis dengan lebih jelas. Sejak awal ditemukannya, teknik amplifikasi DNA yang digunakan adalah Polymerase Chain Reaction (PCR).

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi tahap denaturasi, pemisahan kedua untai DNA pada temperatur tinggi. DNA akan terdenaturasi pada temperatur 90 hingga 97 °C. Pada teknik PCR, denaturasi optimum terjadi pada temperatur 95°C selama 30 detik annealing, tahap penempelan primer pada pita DNA yang sesuai, pada suhu 55 hingga 60°C selama 30 detik dan ekstensi oleh enzim DNA polimerase pada suhu 72°C dalam waktu yang disesuaikan dengan panjang atau pendeknya ukuran DNA yang diharapkan sebagai produk amplifikasi. Umumnya, waktu yang digunakan untuk ekstensi DNA pada PCR yaitu 2 – 3 menit (Feranisa, 2016).

Terdapat beberapa faktor yang dapat menentukan tingkat keberhasilan teknik amplifikasi DNA menggunakan PCR. Faktor-faktor itu antara lain deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP); oligonukleotida primer; DNA cetakan

(template); komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, dan faktor teknis dan non-teknis lainnya, seperti kontaminasi. PCR memiliki keunggulan yaitu mampu melipatgandakan suatu fragmen DNA sehingga mencapai 10⁹ kali lipat. Oleh karena itu, adanya kontaminasi dalam jumlah sangat sedikit sekalipun dapat mengakibatkan terjadinya kesalahan dengan menghasilkan produk amplifikasi yang tidak diharapkan. Amplikon, atau hasil amplifikasi DNA dengan PCR dapat dilihat setelah melalui teknik elektroforesis. DNA amplikon diberi pewarnaan dengan ethidium bromida yang akan berfluoresens ketika dipaparkan pada sinar UV level medium dengan panjang gelombang 300nm dari UV transilluminator (Feranisa, 2016).

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama adalah (Yusuf, 2010):

- a. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10⁵ – 10⁶ molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
- b. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Dan mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60%.
- c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg²⁺ sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
- d. Enzim DNA Polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari Eubacterium yang disebut *Thermus*

aquaticus, spesies ini diisolasi dari taman Yellowstone pada tahun 1969. Enzim polimerase taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.

- e. Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20°C), 50 mM KCl, 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%, disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM MgCl.

Pada proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi.

Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat (Yusuf, 2010):

- a. Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase.

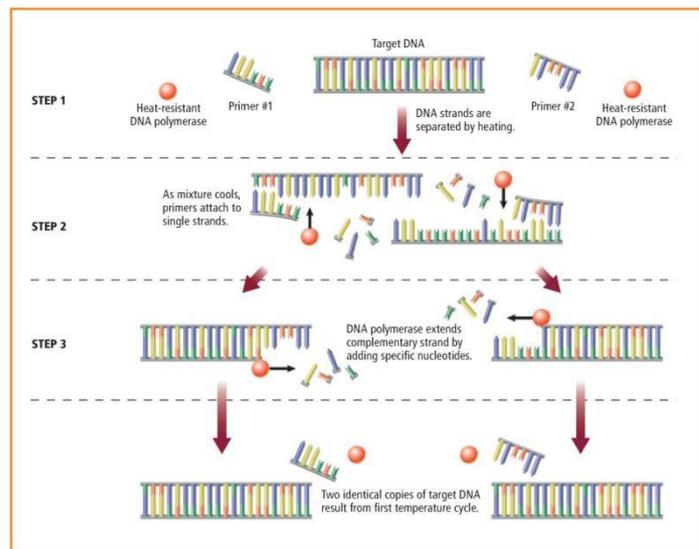
Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5, 95 dan 97,5°C.

b. Annealing (penempelan primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.

c. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Yusuf, 2010).



Gambar 1. Tahapan PCR (Yusuf, 2010).

Reaksi-reaksi di atas diulangi lagi dari 25 – 30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi. Produk PCR dapat diidentifikasi melalui ukurannya dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Metode ini terdiri atas menginjeksi DNA ke dalam gel agarosa dan menyatukan gel tersebut dengan listrik. Hasilnya untai DNA kecil pindah dengan cepat dan untai yang besar diantara gel menunjukkan hasil positif (Yusuf, 2010).

II.4.3 Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan yang memanfaatkan medan listrik yang dihasilkan dari elektroda-elektroda untuk memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki muatan berupa kation ataupun anion. Elektroforesis terdiri dari beberapa komponen utama dalam penggunaannya yang

pertama adalah larutan elektrolit yang berfungsi sebagai pembawa komponen. Umumnya berupa larutan buffer dengan pH tertentu sesuai dengan karakteristik senyawa yang akan dipisahkan. Berikutnya media pemisah merupakan tempat proses pemisahan terjadi. Media pemisah ini berupa kertas (selulosa asetat, selulosa nitrat), gel kanji, gel polikrilamid, busa poliuretan atau agar-agar. Selanjutnya yang paling penting adalah elektroda yang berfungsi sebagai penghubung arus listrik dengan media pemisah dan baterai atau arus listrik sebagai sumber energi (*source*) pada rangkaian alat (Harahap, 2018)

Keberhasilan dari teknik elektroforesis dipengaruhi pemilihan medium pemisahannya. Ada dua medium yang sering digunakan dalam menggunakan elektroforesis. Yang pertama gel Agarosa. Merupakan metode standar untuk mengidentifikasi serta memurnikan fragmen-fragmen *Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)* dan *Ribose Nucleic Acid*. Senyawaan tersebut merupakan pembawa genetika pada makhluk hidup-dilakukan pada medan listrik horizontal. Kelebihan dari gel ini lebih mudah, sederhana dan laju pemisahannya lebih cepat membentuk fragmen-fragmen dan tidak bersifat toksik. Hanya saja kelemahannya gel ini memiliki sensitifitas tinggi dan mudah rusak sehingga memerlukan ketelitian dan kehati-hatian pada proses pengerjaannya. Yang kedua gel poliakrilamida. Gel ini memiliki resolusi tinggi pada hasil pemisahannya. Membutuhkan tegangan listrik yang tinggi pada pengerjaannya dan dilakukan pada medan listrik vertical. Persiapan pengerjaan membutuhkan waktu relatif lama, mahal dan memiliki laju pemisahan yang lebih lambat dibandingkan gel Agarosa (Harahap, 2018).

II.4.4 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA atau pengurutan basa DNA merupakan teknik kunci dalam perkembangan ilmu pengetahuan, di antaranya genetika, bioteknologi, biologi molekuler, dan genomika. Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) suatu sampel DNA. Salah satu contoh aplikasi ambisius teknologi sekuensing DNA yaitu pengurutan genom manusia melalui proyek yang dikenal *Human Genome Project* (Tasma, 2015).

II.4.5 Analisis Sekuen DNA

Kesuksesan suatu reaksi PCR terlihat melalui *band* atau pita yang dihasilkan ketika hasil amplifikasi divisualisasikan melalui alat UV-transiluminator (Untu dkk, 2015). Gen 16S rRNA adalah salah satu gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme. Ribuan sekuens dari berbagai isolat klinis dan dari lingkungan telah terkumpul di satu database yaitu National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang dapat diakses pada www.ncbi.nlm.nih.gov, serta Ribosomal Database Project yang dapat diakses di www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html. Database ini juga menyediakan aplikasi yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens yang telah terdaftar di database tersebut (Rinanda, 2011).

Produk PCR yang telah dimurnikan ditentukan urutan nukleotidanya dengan metode sekuensing. Pada tahap sekuensing produk PCR dengan ukuran tertentu digunakan sebagai cetakan. Primer pada tahap PCR juga digunakan dalam sekuensing, hanya saja masing-masing primer digunakan secara terpisah dalam

satu siklus sekuensing (forward saja atau reverse saja). Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan primer reverse dan forward dan umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (consensus sequence). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database menggunakan software tertentu. Beberapa sistem dapat menentukan urutan nukleotida melalui pembacaan satu primer, namun pembacaan dengan dua primer memberikan hasil yang lebih akurat. Beberapa database yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens 16S rRNA antara lain GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch>) dan Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>) (Rinanda, 2011).