

Optimasi Isolasi Genom untuk Analisis Keragaman Mikrob pada Fermentasi Singkong "Peyem" dengan Teknik *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP)

Optimising Isolation of Genomic DNA for Analysis of Microbial Diversity on Fermented Cassava "Peyem" with Terminal Restriction Fragment Technique Length Polymorphism (T-RFLP)

Tati Barus

*Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya
Jln. Jenderal Sudirman No. 51, Jakarta 12930
E-mail: tati.barus@atmajaya.ac.id*

Abstract

"Peyem" is one of Indonesian traditional fermented food. The quality of fermented food depends on the activities of microbial during fermentation process. One of the molecular techniques that have been widely used to analyze the microbial community is Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). The isolation of genom methods and types of primers used in the PCR are important in T-RFLP technique to assess microbial community. Therefore, this study aimed to compare four methods of isolation of the genome, and to compare the use of two primer sets to assess the bacterial community from "Peyem" with T-RFLP technique. The genome of a bacterial community was isolated using four methods: 1) the QIAamp DNA Stool Mini Kit (G1), 2) QIAamp DNA Stool Mini Kit + lysozyme (G2), 3) Genomic DNA Purification Kit (G3), and 4) Genomic DNA Purification Kit + lysozyme (G4). The 16S rDNA was amplified by PCR using two primer sets (forward primer 27F-FAM and reverse primer 1492R) and (forward primer 63F-FAM and reverse primer 1492R). The results showed the isolation of genomic using G4 method produced higher concentration of genome (330.20 ng / mL) than G1, G2, and G3 methods (163.50 ng / mL, 183.25 ng / mL, and 260.80 ng / mL). The forward primer 27F-FAM and reverse primer 1492R produced higher number of TRF peak (264) compared to 63F-FAM primer (177). The number of peak TRF on TRFLP technique illustrates the diversity of microbial communities. Therefore, using Genomic DNA Purification Kit + Lysozyme and 27F-FAM-1492R primers is the best to analyze the bacterial community from "Peyem" using T-RFLP technique.

Keywords: Genome, Primer, T-RFLP, Microbe, "Peyem"

Abstrak

"Peyem" merupakan salah satu pangan fermentasi Indonesia. Kualitas pangan fermentasi bergantung pada aktivitas mikrob yang terdapat selama proses fermentasi berlangsung. Salah satu teknik molekuler yang telah banyak digunakan untuk menganalisis komunitas mikrob pada suatu habitat adalah teknik Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). Metode isolasi genom dan jenis primer yang digunakan pada saat PCR penting pada teknik T-RFLP dalam mengkaji komunitas mikrob. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk membandingkan empat metode isolasi genom dan membandingkan penggunaan dua set primer dalam mengkaji komunitas bakteri dari "Peyem" dengan teknik T-RFLP. Genom komunitas bakteri diisolasi dengan menggunakan empat metode, yaitu: 1) QIAamp DNA Stool Mini Kit (G1), 2) QIAamp DNA Stool Mini Kit + lisozim (G2), 3) Genomic DNA Purification Kit (G3), dan 4) Genomic DNA Purification Kit + lisozim (G4). Untuk mengamplifikasi 16S rDNA digunakan dua set primer, yaitu: 1) primer 27F-FAM dan 1492R, 2) primer 63F-FAM dan 1387R. Hasil penelitian menunjukkan isolasi genom dengan metode G4 menghasilkan konsentrasi genom tertinggi (330,20 ng/ μ l) dibandingkan metode G1, G2, dan G3 (163,50 ng/ μ l; 183,25 ng/ μ l, dan 260,80 ng/ μ l). Primer 27F-FAM menghasilkan jumlah peak yang lebih tertinggi (264) dibandingkan dengan

primer 63F-FAM (177). Jumlah peak TRF pada teknik TRFLP menggambarkan keragaman komunitas mikrob. Dengan demikian isolasi genom dengan *Genomic DNA Purification Kit + lysozyme* dan penggunaan pasangan primer 27F-FAM-1492R adalah yang terbaik untuk menganalisis komunitas bakteri dari "Peyem" dengan teknik T-RFLP.

Kata kunci: Genom, Primer, T-RFLP, Mikrob, "Peyem"

Diterima: 21 Maret 2013, disetujui: 30 April 2013

Pendahuluan

Mempelajari komunitas mikrob pada suatu habitat dengan cara mengkultur akan menghasilkan informasi yang terbatas sebab sebagian besar belum dapat dikultur (Giraffa dan Neviani, 2001). Oleh sebab itu, karakteristik gen penyandi subunit kecil 16S ribosomal RNA (16S rRNA) sering digunakan karena terdapat pada semua jenis mikrob, memiliki region yang *conserved* dan *variable* dengan tingkat evolusi relatif rendah, dan telah banyak dikarakterisasi dari berbagai jenis mikrob (Liu dkk., 1997). Saat ini berbagai teknik molekuler yang berbasis PCR telah digunakan untuk mempelajari karakteristik gen tersebut. Salah satu di antaranya adalah teknik *Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) (Liu dkk., 1997).

T-RFLP merupakan teknik molekuler yang efektif untuk menganalisis komunitas mikrob (Tiedje dkk., 1999). Teknik molekuler ini bersifat sensitif, cepat (Engebretson dan Moyer, 2003), *reproducible*, dan akurat (Egert dan Friedrich, 2003). Oleh sebab itu, teknik ini telah banyak digunakan untuk menganalisis komunitas mikrob. Beberapa di antaranya telah digunakan mengkaji keragaman *Lactococcus lactis* (Aghajani dkk., 1996) dan *Mycobacterium* (Liu dkk., 1997), serta telah digunakan juga menganalisis komunitas mikrob pada tanah (Lukow dkk., 2000) dan vagina manusia (Coolen dkk., 2005). Telah dilaporkan bahwa T-RFLP lebih sensitif dibandingkan dengan *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) (Moeseneder dkk., 1999).

Pada teknik T-RFLP, setelah genom bakteri diisolasi langsung dari alam maka DNA target diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer yang dilabel dengan senyawa yang bersifat fluoresen (Moeseneder dkk., 1999). Selanjutnya, ampikon dipotong secara enzimatis sehingga dihasilkan peak TRF

dengan ukuran yang berbeda-beda. Polimorfisme ukuran peak TRF menggambarkan polimorfisme populasi mikrob dalam suatu komunitas (Egert dan Friedrich, 2003). Dengan demikian, isolasi genom dan pemilihan primer yang tepat merupakan hal penting pada teknik T-RFLP. Idealnya, metode isolasi yang digunakan harus dapat mengisolasi semua genom yang ada di habitat tersebut, dan primer yang digunakan harus dapat mengamplifikasi semua DNA target pada saat PCR. Oleh sebab itu, tujuan penelitian ini adalah membandingkan empat metode isolasi genom, dan membandingkan penggunaan dua set primer dalam mengkaji komunitas bakteri dari "Peyem" dengan teknik T-RFLP.

"Peyem" adalah salah satu bahan pangan fermentasi tradisional Indonesia. Selain "Peyem" masih ada beberapa jenis bahan pangan fermentasi lain yang berbasis singkong seperti tape. Salah satu faktor yang menentukan kualitas bahan pangan fermentasi adalah mikrob yang berperan selama proses fermentasi berlangsung. Namun, kajian tentang karakteristik mikrob dan perannya pada pangan fermentasi berbasis singkong di Indonesia masih sangat terbatas. Oleh sebab itu, hasil penelitian ini akan digunakan sebagai dasar untuk mengkaji komunitas mikrob dari "Peyem".

Metode Penelitian

Isolasi DNA genom bakteri dari "Peyem"

Masing-masing sebanyak 20 gram "Peyem" dimasukkan ke dalam masing-masing 180 ml 0,85% NaCl. Selanjutnya, satu bagian dihomogenkan dengan cara di stirrer, dan satu bagian lainnya di homogenkan dengan cara diblender. Sebanyak 2,0 ml masing-masing suspensi diambil dan disentrifugasi selama 10

menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pelet yang terbentuk diambil dan diresuspensi dengan menambahkan 1ml 0,85% NaCl dan disentrifugasi kembali. Tahapan ini diulang sebanyak tiga kali. Selanjutnya, isolasi genom dilakukan dari 200 µl tiap-tiap suspensi dengan metode: 1) QIAamp DNA Stool Mini Kit (G1), 2) QIAamp DNA Stool Mini Kit + lizozim (G2), 3) Genomic DNA Purification Kit (G3), dan 4) Genomic DNA Purification Kit + lizozim (G4).

Amplifikasi gen 16S rRNA

Untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA bakteri dari "Peyem" digunakan dua set primer, yaitu primer 27F-FAM (59-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-39) dan 1492R (59-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-39) (Moeseneder dkk., 1999) dan primer 63F-FAM (5'-CAGGCCTAACACATGCAA GTC) dan 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') (Marchesi dkk., 1998). Komposisi master mix dan kondisi PCR dilakukan dengan mengikuti metode Barus (2008). Komposisi master mix terdiri atas 36 µl ddH₂O, 5 µl 10 x bufer polimerase, 1 µl dNTPs, 1 µl DNA polimerase, masing-masing 2 µl primer (5 pmol/µl), dan 3 µl DNA sampel. Campuran tersebut diinkubasi pada mesin PCR (GeneAmp PCR sistem 2400, Perkin Elmer, USA). Protokol PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi 92°C selama 30 detik, *annealing* primer 62°C selama 30 detik, *elongasi* atau pemanjangan 72°C selama 30 detik, *post PCR* 72°C selama 7 menit, dan suhu penyimpanan 4°C. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR ini dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil PCR kemudian diamati dengan elektroforesis gel agarose 0,8%. Pita DNA yang berukuran sekitar 1300 bp dipotong untuk selanjutnya dipurifikasi menggunakan Wizard® SV Gel and Clean-Up System. DNA yang diperoleh dari hasil purifikasi ini ditambah *nuclease free-water* 35 µl.

Pemotongan amplicon dengan enzim restriksi

Untuk mendapatkan polimorfisme ukuran peak TRF, amplicon hasil PCR yang telah dipurifikasi dari gel selanjutnya dipotong menggunakan Enzim restriksi *Bsu*UI yang

bersifat memotong sering, yaitu yang mengenali situs empat basa (New England Biolab, Beverly, MA). Proses pemotongan amplicon dilakukan mengikuti metode Barus (2008) dengan komposisi sebagai berikut: 1,0 µl enzim, 1,0 µl 10X bufer restriksi, dan 8 µl DNA. Selanjutnya, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 60°C selama ± 16 jam. Hasil pemotongan selanjutnya dipurifikasi dengan metode *Ethanol Precipitation* (Barus (2008)). DNA hasil purifikasi ditambah *nuclease free-water* 5 µl untuk selanjutnya dianalisis menggunakan ABI 310 *genetic analyzer* (Perkin-Elmer, US) di PT Wilmar Benih Indonesia.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi genom

Isolasi genom bakteri "Peyem" telah berhasil dilakukan menggunakan empat metode (G1-G4) dengan tingkat kemurnian 1,89 nm sampai 1,97 nm (Tabel 1). Konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA ditentukan dengan menggunakan NanoDrop ND-1000 *Spectrophotometer*. Di antara empat metode isolasi (G1-G4), metode G4 menghasilkan konsentrasi DNA tertinggi (330,2 ng/µl) dibandingkan dengan tiga metode lainnya (G1, G2, dan G3). Metode G4 juga menghasilkan jumlah peak TRF tertinggi dibandingkan dengan metode G1, G2, dan G3 (data tidak ditunjukkan). Penambahan lizozim (G2 dan G4) tampak dapat menghasilkan konsentrasi genom bakteri yang lebih tinggi, yaitu masing-masing 183,25 ng/µl dan 330,20 ng/µl dibandingkan dengan tanpa lizozim (G1 dan G2) masing-masing 163,50 ng/µl dan 260,80 ng/µl.

Isolasi genom untuk mendapatkan kualitas DNA yang baik untuk proses PCR merupakan tahapan penting dalam analisis komunitas mikrob dengan menggunakan teknik molekuler seperti T-RFLP. Isolasi dan purifikasi genom menggunakan kit yang telah siap pakai mempermudah proses isolasi yang dilakukan. Namun, tetap diperlukan adanya kajian untuk mendapatkan jenis kit yang tepat sehingga diperoleh kualitas DNA yang baik.

Analisis Keragaman Mikrob pada Fermentasi Singkong "Peyem"

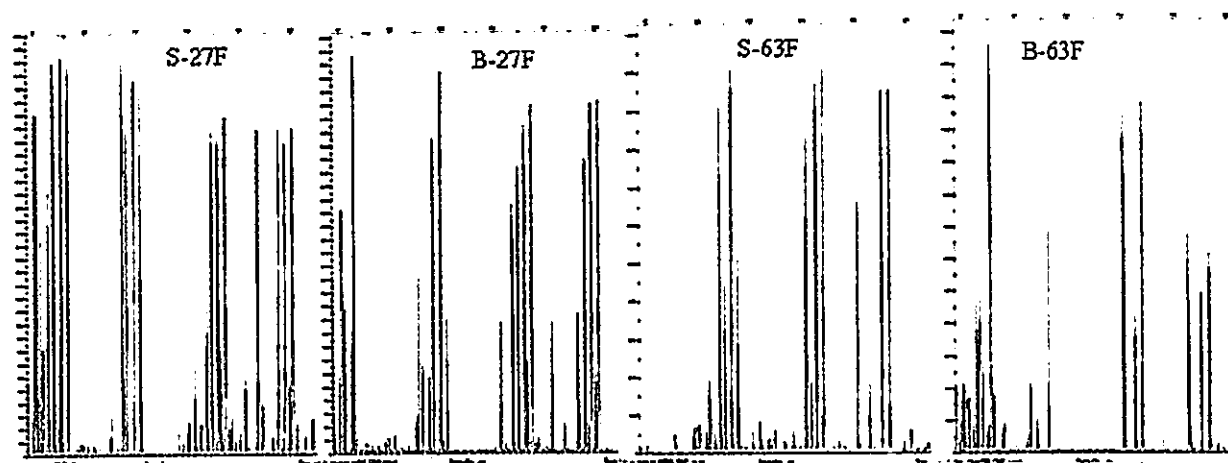
Pada penelitian ini tampak semua metode yang digunakan berhasil untuk mengisolasi genom, tetapi ada perbedaan konsentrasi genom yang dihasilkan (Tabel 1). Metode G4 (Genomic DNA Purification Kit yang dimodifikasi dengan penambahan lisozim) memberikan hasil terbaik dibandingkan G1, G2, dan G3. Dengan demikian tampak perlu dilakukan proses optimasi isolasi genom dilakukan terlebih dahulu sebelum analisis komunitas mikrob lebih lanjut dilakukan. Hal ini sejalan dengan hasil-hasil penelitian yang telah dilaporkan oleh Gupta dan Preet (2012), Miller dkk, (1999), Schmerer dkk, (1999) dan Li dkk, (2007).

Selain pemilihan metode yang tepat untuk isolasi genom, proses persiapan sampel

"Peyem" perlu juga dikaji. Tujuannya adalah agar semua komunitas bakteri dari "Peyem" ikut dalam proses isolasi genom. Pada penelitian ini persiapan sampel "Peyem" dilakukan dengan dua metode, yaitu dengan cara distirrer (S-27F dan S-63F) dan dengan cara diblender (B-27F dan B-63F) (Gambar 1 dan Gambar 2). Di antara dua metode, dengan cara distirrer tampak lebih baik karena dapat menghasilkan jumlah peak TRF yang lebih banyak (Gambar 1). Dengan cara distirrer diperoleh 289 (S-27F) dan 206 (S-63F) peak TRF, sedangkan metode dengan cara diblender hanya 238 (B-27F) dan 148 (B-63) peak TRF saja (Gambar 2). Peak TRF yang diperhitungkan pada penelitian ini berukuran dari 50 bp hingga 500 bp sesuai dengan standar internal yang digunakan (ROX 500).

Tabel 1. Kualitas genom bakteri dari "Peyem" yang diisolasi dengan empat metode

Metode isolasi genom	Konsentrasi DNA (ng/μl)	260/230 (nm)	260/280 (nm)
QIAamp DNA Stool Mini Kit (G1)	163,50 ± 23,30	1,97 ± 0,13	1,90 ± 0,36
QIAamp DNA Stool Mini Kit + lisozim (G2)	183,25 ± 33,30	1,90 ± 0,33	1,89 ± 0,26
Genomic DNA Purification Kit (G3)	260,80 ± 27,50	1,93 ± 0,81	1,93 ± 0,27
Genomic DNA Purification Kit + lisozim (G4)	330,20 ± 58,30	1,92 ± 0,28	1,97 ± 0,29



Gambar 1. Elektroferogram dari T-RFLP menggunakan *Bsu*UI yang memotong sekuen 16S rDNA komunitas bakteri dari "Peyem". "Peyem" distirrer (S-27F) dan "Peyem" diblender (B-27F) dengan menggunakan primer 27F. "Peyem" distirrer (S-63F) dan "Peyem" diblender (B-63F) dengan menggunakan primer 63F.

Penggunaan dua set primer

Dari Gambar 1 dapat dilihat keragaman peak TRF yang diperoleh dengan menggunakan dua set primer universal yang telah dilabel dengan senyawa yang berfluoresen (primer 27F dan primer 63F). Di antara dua primer tersebut tampak bahwa primer 27F (S-27F dan B-27F) lebih baik dibandingkan dengan primer 63F (S-63F dan B-63F) karena menghasilkan peak TRF yang lebih beragam (Gambar 1). Rata-rata jumlah peak TRF dengan primer 27F adalah 264, sedangkan dengan primer 63F hanya 177 saja (Gambar 2). Telah dilaporkan tentang perlu adanya optimasi penggunaan primer dalam analisis komunitas pada suatu habitat dengan teknik molekuler yang berbasis PCR. Beberapa di antaranya adalah Euringer dan Lueders (2008) dalam mengkaji komunitas protista dan Jones dkk., (2007) dalam mengkaji komunitas bakteri air.

Teknik T-RFLP membedakan genetik mikroba berdasarkan polimorfisme terminal peak TRF dari produk PCR hasil pemotongan enzim yang digunakan. Menurut Tiedje dkk., (1999) dan Engebretson dan Moyer (2003), enzim restriksi yang dapat menghasilkan polimorfisme terminal peak TRF untuk komunitas bakteri adalah *HhaI* (*isoschizomer* dengan *HinP1*), *RsaI*, *BstUI*, *DdeI* dan *MspI*. Oleh sebab itu, dalam penelitian ini dipilih salah satu, yaitu jenis *BstUI*.

Simpulan

Informasi tentang keberadaan komunitas mikroba pada suatu habitat yang berbasis PCR, ditentukan oleh metode isolasi genom dan jenis primer yang digunakan. Kombinasi penggunaan *Genomic DNA Purification Kit* dengan penambahan lisozim dan pasangan primer 27F FAM-1492R memberikan hasil keragamankomunitasmikrobdari "Peyem" yang bersifat komprehensif.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Program Hibah Kompetitif Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya.

Daftar Pustaka

- Aghajani, E.A., Jones, K., Holtzman, A., Aronson, T., Glover, N., Boian, M., Froman, S. dan Brunk, C.F. 1996. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. *Journal Clinical Microbiol*, 98-102.
- Barus, T. 2008. Peran Komunitas Bakteri dalam Pembentukan Rasa Pahit pada Tempe: Analisis Mikrobiologi dan *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP). *Disertasi*. Bogor: Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Hlm. 21-23.
- Coolen, M.J., Post, E., Davis, C.C. dan Forney, L.J. 2005. Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8729-8737.
- Egert, M. dan Friedrich, M.W. 2003. Formation of Pseudo-Terminal Restriction Fragment, a affecting Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2555-2562.
- Engebretson, J.J. dan Moyer, C.L. 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4823-4829.
- Euringer, K. dan Lueders, T. 2008. An optimised PCR/T-RFLP fingerprinting approach for the investigation of protistan communities in groundwater environments. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 262-268.
- Giraffa, G. dan Neviani. 2001. DNA-based, culture - independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystem. *Journal Food Microbiol*, 67: 19-34.
- Gupta, S. dan Preet, S. 2012. Protocol optimization for genomic DNA extraction and RAPD-PCR in mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Annals of Biological Research*, 3 (3): 1553-156.
- Jones, S.E., Shade, A.L., McMahon, K.D. dan Kent, A.D. 2007. Comparison of Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Aquatic Bacterial Communities: an Ecological Perspective. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 659-662.

Analisis Keragaman Mikrob pada Fermentasi Singkong "Peyem"

- Li, G., Hullar, M.A.J. dan Lampe, J.W. 2007. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota. *Journal Microbiol Methods*, 68: 303–311.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. dan Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 1S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4516–4522.
- Lukow, T., Dunfield, P.F. dan Liesack, W. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within agricultural soil planted with transgenic and non transgenic potato plants. *FEMS Microbiol Ecol.*, 32: 241–247.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. dan Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:795–799.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L. dan Ghiorse, W.C. 1999. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples *Section of Microbiology. Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4715–4724.
- Mösesener, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C. dan Herndl, G.J. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3518–3525.
- Schmerer, W.M., Hummel, S. dan Herrmann, B. 1999. Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis*, 20: 1712–1716.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nu'sslein, K., Marsh, T.L. dan Flynn, S.J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13: 109–122.