

Isolasi dan Karakterisasi Molekuler Gen 16S rRNA Bakteri Lipolitik Asal Limbah Kulit Biji Jambu Mete

Isolation and Molecular Characterization of Lipolytic Bacterial 16S rRNA Gene from Cashew Nutshell Waste

MUHAMAD AZWAR SYAH*

Program Studi Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo,
Kendari 93232

Diterima 1 April 2022/Disetujui 21 April 2022

Lipolytic bacteria attract great attention to various biotechnology industries because of their enzymatic potential. This study aims to isolate and identify lipolytic bacteria from cashew nutshell waste using the 16S rRNA gene as a molecular marker. Lipolytic bacteria were isolated using serial dilutions and inoculated on lipolytic media. A total of 3 isolates of lipolytic bacteria were obtained from cashew nutshell waste based on screening in LA *Rhodamine B*. The partial sequence of 16S rRNA gene from LB15 amplified using a pair of primers 63F and 1387R having a size of 1238 bp, while BL6 and BK6 were 1283 bp, respectively. Based on genetic distance analysis and phylogenetic reconstruction, we proposed that LB15 be identified as *Burkholderia* sp. with 99.92% similarity. In addition, because the 16S rRNA gene sequence similarity of BL6 was 99.87% with *Paraburkholderia kururiensis* strain 979, BL6 was classified as *Paraburkholderia kururiensis*. Then, isolate BK6 was identified as *Ralstonia* sp. with a similarity of 99.53%. The similarity value can be used as a reference in determining the identity of bacteria. A bacterium can be categorized as the same species if it has a similarity value of more than 99%.

Key words: Lipolytic Bacteria, 16S rRNA, Cashew Nutshell Waste

PENDAHULUAN

Dewasa ini, enzim lipolitik telah menarik perhatian besar terhadap berbagai industri karena potensi bioteknologinya. Lipase (EC. 3.1.1.3) merupakan salah satu kelompok enzim lipolitik yang sudah banyak diaplikasikan dalam industri, seperti produksi biodiesel secara enzimatik, formulasi deterjen, dan reduksi kandungan lipid dalam produksi kertas (Du *et al.* 2008; Ghaly *et al.* 2010; Chourasia *et al.* 2015). Potensi tersebut didukung dengan kemampuan lipase dalam berbagai reaksi kimia, seperti hidrolisis triasilgliserol, esterifikasi, transesterifikasi, interesterifikasi, dan asidolisis (Adina *et al.* 2021).

Enzim lipase dapat dihasilkan oleh berbagai organisme, namun lipase bakteri saat ini tengah dikembangkan oleh berbagai industri karena memiliki sifat termostabil dan fungsi biokimia yang lebih beragam. Purkan *et al.* (2020) berhasil mengisolasi bakteri lipolitik dari kompos limbah domestik yang diidentifikasi sebagai *Proteus* sp. dan enzim lipase yang dihasilkan berpotensi dalam produksi biodiesel.

Selain itu, Ramnath *et al.* (2017) mengisolasi bakteri lipolitik dari kayu *Eucalyptus* yang berpotensi dikembangkan dalam industri kertas.

Eksplorasi bakteri lipolitik saat ini tengah gencar dilakukan pada berbagai lingkungan untuk memperoleh kandidat enzim lipase yang berkualitas. Limbah kulit jambu mete dapat menjadi salah satu sumber bakteri lipolitik yang potensial karena memiliki keunikan dari karakteristik limbah tersebut. Kulit jambu mete mengandung minyak CNSL (*Cashew Nut Shell Liquid*) dalam bentuk triasilgliserol yang mengandung 70% *anacardic acid*, 18% *cardanol*, dan berbagai senyawa fenol lainnya (Cheriyana dan Abraham 2010). Senyawa fenol yang terkandung dalam jambu mete bersifat antibakteri. Minyak yang terdapat pada kulit jambu mete mengandung asam lemak bebas yang cenderung terdiri atas asam linoleat dan oleat (Guo *et al.* 2016). Kandungan asam lemak ini dapat memicu pertumbuhan bakteri yang memiliki kemampuan lipolitik. Beberapa bakteri aerob yang mendegradasi CNSL pada kulit jambu mete di antaranya ialah *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, dan *Sphingomonas paucimobilis* (Rajeswari *et al.* 2011; Prabha *et al.* 2011).

*Penulis korespondensi:

E-mail: muhamadzawarsyah@uho.ac.id

Identifikasi bakteri lipolitik dari kulit biji jambu mete dapat dilakukan dengan menggunakan marka molekuler gen 16S rRNA untuk memperoleh identitas yang lebih akurat. Marka molekuler ini masih sering digunakan sebagai acuan dalam identifikasi bakteri. Penelitian Susilowati *et al.* (2018) mengidentifikasi bakteri lipolitik dari makanan tradisional *wajik* dan *jenang* dengan salah satu parameter yang digunakan adalah analisis similaritas gen 16S rRNA. Empat bakteri dikelompokkan kedalam genus *Acinetobacter* dengan similaritas 97-98% dan dua isolat bakteri diidentifikasi sebagai spesies *Serratia marcescens*. Hal ini menunjukkan bahwa nilai similaritas gen 16S rRNA <99% dapat mengindikasikan sebagai spesies baru.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Bahan-bahan yang digunakan terdiri atas sampel limbah kulit jambu mete yang diperoleh dari satu lokasi perkebunan jambu mete di Desa Bhone Kainsetala Kec. Muna Kab. Muna Sulawesi Tenggara, media Luria Bertani (LB), *Rhodamine B*, minyak zaitun (SIGMA), polivinil alkohol (PVA), Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, 1 kb DNA ladder (Promega), primer (63F dan 1387R), dan *GoTaq Green Master Mix* (Promega).

Waktu dan Tempat. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas IPB dan Laboratorium *Research and Development for Biotechnology* PT. Wilmar Benih Indonesia, Cikarang, Jakarta pada tahun 2021.

Isolasi dan Penapisan Bakteri Lipolitik. Sebanyak 10 gram kulit jambu mete dihaluskan dan dilarutkan ke dalam 90 ml NaCl 0.85%. Sebanyak 1 ml diambil dan dilarutkan ke dalam 9 ml NaCl 0.85%. Tahap ini dilakukan hingga pengenceran 10⁻⁶. Sebanyak 1 ml pengenceran 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, dan 10⁻⁶ diinokulasi pada media Luria Bertani (LB) agar *Rhodamin B* (0.1%) dengan metode sebar, dan diinkubasi pada suhu ruang (30°C) selama 24 jam. Koloni lipolitik yang tumbuh diamati dengan menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 350 nm yang ditandai dengan adanya pendaran fluoresens. Penapisan bakteri lipolitik berdasarkan intensitas fluoresens, perbedaan morfologi koloni, dan indeks lipolitik.

Ekstraksi DNA Genom dan Amplifikasi Gen 16S rRNA. DNA genom bakteri lipolitik diekstraksi dengan menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan metode PCR dengan komposisi yang terdiri atas 0.5 µl DNA genom, 5 µl *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 1 µl primer 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'), 1 µl primer 1387R (5'GGGCGGAW

GTGTACAAGGC-3'), dan 2.5 µl NFW dengan volume total 10 µl. Kondisi PCR terdiri atas pradenaturasi (94°C selama 5 menit), denaturasi (95°C selama 30 detik), penempelan primer (55°C selama 30 detik), dan pemanjangan rantai (72°C selama 1 menit), dan *post-extension* (72°C selama 7 menit) yang dilakukan sebanyak 30 siklus dengan menggunakan mesin PCR BIORAD *Thermal Cycler C1000*. Visualisasi amplifikasi gen 16S rRNA diuji dengan proses elektroforesis pada gel agarosa 1% dan menggunakan marker 1 kb.

Purifikasi Produk PCR Gen 16S rRNA. Produk PCR dipurifikasi dengan menggunakan metode EXOSAP. Sebanyak 5 µl produk PCR ditambahkan 1 µl larutan EXO (*Exonuclease I*) dan 1 µl larutan SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*). Larutan tersebut dispin dan diberi perlakuan panas dengan suhu 37°C selama 15 menit, dan 80°C selama 15 menit.

Sekuensing Gen 16S rRNA. Hasil purifikasi produk PCR digunakan untuk proses sekuensing. Kondisi siklus sekuensing terdiri atas pradenaturasi 96°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 96°C selama 30 detik, penempelan primer 55°C selama 30 detik, tahap pemanjangan 60°C selama 1 menit 30 detik, dan *post extension* 60°C selama 5 menit. Siklus sekuensing terdiri atas larutan primer 63F dan 1387R. Komposisi PCR ddH₂O 17.3 µl, *BigDye buffer* 4.42 µl, *BigDye* 1.26 µl, primer masing-masing 1.01 µl, dan produk PCR 16S rRNA sebanyak 0.25 µl. Produk PCR pada siklus sekuensing dipurifikasi dengan dengan penambahan 18 µl SAM (*S-adenocylmethionine*) dan 4 µl Xbead terminator, dan divorteks selama 30 menit. Larutan hasil purifikasi disentrifugasi kecepatan 1000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro sekuensing, serta disekuensing menggunakan mesin *Applied Biosystems Hitachi 3130 Genetic Analyzer*. Hasil sekuensing diurutkan dengan menggunakan *software Geneious R7*.

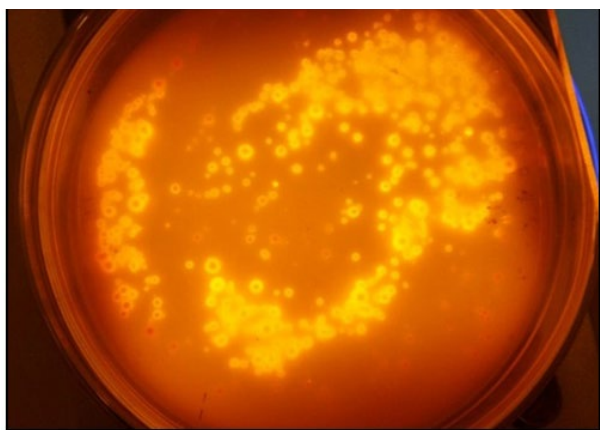
Analisis Bioinformatika. Sekuen gen 16S rRNA bakteri lipolitik dilakukan analisis similaritas dengan bakteri referensi yang terdapat pada *GenBank* menggunakan aplikasi BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tools for nucleotide*), analisis matriks jarak genetik dengan menggunakan pendekatan metode *p-distance*, dan rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan aplikasi Mega 6 dengan metode *maximum-likelihood*.

HASIL

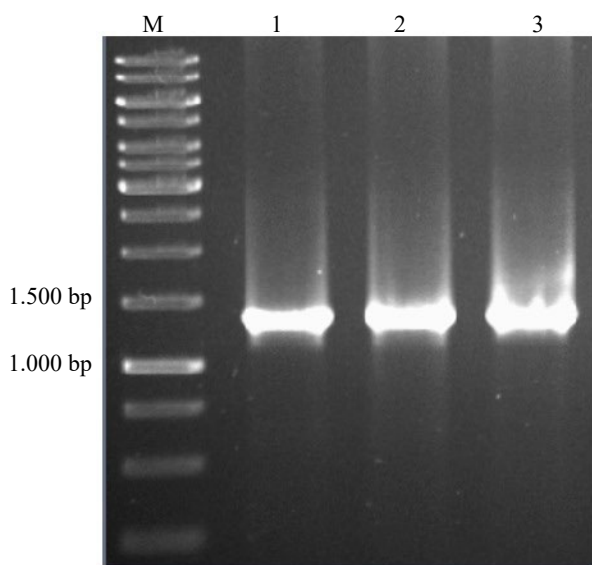
Isolasi Bakteri Lipolitik. Bakteri lipolitik dari limbah kulit jambu mete telah berhasil diisolasi dengan menggunakan media spesifik *LA rhodamin B* yang ditumbuhkan pada suhu 30°C yang ditandai dengan

terbentuknya pendaran fluoresens ketika disinari dengan sinar UV pada 350 nm (Gambar 1). Pendaran tersebut terbentuk karena adanya pembentukan kompleks asam lemak hasil hidrolisis triasilgliserol pada minyak zaitun dengan rhodamin B. Hasil penapisan bakteri lipolitik diperoleh tiga isolat (LB15, BK6, dan BL6) yang memiliki indeks lipolitik tertinggi dengan nilai masing-masing 1.12, 1.00, dan 1.00. Ketiga isolat tersebut dianalisis lebih lanjut untuk proses identifikasi secara molekuler dengan menggunakan marka molekuler gen 16S rRNA.

Amplifikasi Gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA pada ketiga sampel diamplifikasi dengan menggunakan primer 63F dan 1387R yang dikatalisis oleh enzim DNA Polymerase *Thermus aquaticus*. Gambar 2 menunjukkan adanya pita DNA yang berpendar pada gel agarosa 1% yang terletak pada ukuran DNA



Gambar 1. Bakteri lipolitik di bawah sinar UV 350 nm yang ditumbuhkan di media LB agar yang mengandung rhodamin B 0.1% dan minyak zaitun pada suhu 30°C selama 24 jam



Gambar 2. Hasil elektroforesis amplifikasi gen 16S rRNA dengan menggunakan primer 63F dan 1387R pada gel agarosa 1%, M: Marker 1 kb ladder, 1: LB15, 2: BL6, 3: BK6

antara 1000 pb dan 1500 pb. Hal ini mengindikasikan bahwa gen 16S rRNA ketiga sampel telah berhasil teramplifikasi dengan menggunakan primer 63F dan 1387R yang berukuran ~1300 pb. Kedua primer tersebut menghasilkan produk amplifikasi berupa sekuen parsial gen 16S rRNA. Hasil pengurutan DNA menunjukkan bahwa gen 16S rRNA sampel LB15 yang diamplifikasi dengan primer 63F dan 1387R memiliki ukuran 1238 pb, sedangkan sampel BL6 dan BK6 masing-masing dengan ukuran 1283 pb.

Analisis Similaritas Gen 16S RNA. Hasil analisis penjejarian dengan menggunakan fitur BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) pada NCBI menunjukkan bahwa sekuen gen 16S rRNA isolat BL6 secara konsisten memiliki nilai similaritas 99.76% dengan *Paraburkholderia kururiensis* strain 979, sedangkan gen 16S rRNA isolat LB15 dan BK6 memiliki similaritas yang cukup bervariasi dengan beberapa bakteri referensi (Tabel 1). Gen 16S rRNA LB15 memiliki similaritas 99.92% dengan *Burkholderia* sp. NRF60-BP8, dan nilai similaritas masing-masing 99.84% dengan *Burkholderia territorii* strain APP50, *Burkholderia cepacia* 16FK09, *Burkholderia cenocepacia* strain GP3, dan *Burkholderia seminalis* strain CP-RN-4. Selain itu, gen 16S rRNA BK6 memiliki similaritas masing-masing 99.53% dengan *Bacterium* strain U9, *Ralstonia mannitolilytica* strain NK20, *Ralstonia* sp. strain HZ15, *Bacterium* strain BS2078 dan *Ralstonia* sp. M103.

Berdasarkan hasil analisis similaritas gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat BL6 diidentifikasi sebagai satu yang spesies yang sama dengan *Paraburkholderia kururiensis* karena memiliki nilai similaritas $\geq 99\%$. Pada dasarnya, penentuan batasan nilai similaritas dalam mengklasifikasikan suatu bakteri ke dalam spesies atau genus cenderung dinamis tergantung pada database yang menjadi referensi acuan. Namun, nilai similaritas gen 16S rRNA $< 98\%$ cenderung dikelompokkan ke dalam satu genus atau satu tingkatan taksonomi dengan di atasnya.

Analisis Jarak Genetik. Jarak genetik dapat mengkonfirmasi kedekatan genetik diantara sampel dan/atau antara sampel dengan populasi. Analisis jarak genetik yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan aplikasi Mega 6 dengan model *p-distance*. Hasil analisis jarak genetik berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa sampel LB15 memiliki jarak genetik paling kecil dengan *Burkholderia* sp. NRF60-BP8 (0.001) dan paling besar dengan *Bacterium* strain BS2078 (Gambar 3). Hal ini mengindikasikan bahwa isolat LB15 memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Burkholderia* sp. dibandingkan dengan bakteri referensi lainnya. Sampel BL6 memiliki jarak genetik yang rendah dengan *Paraburkholderia kururiensis* (0.002) dan paling tinggi dengan *Paraburkholderia*

Tabel 1. Analisis similaritas gen 16S rRNA

Sampel	Bakteri referensi	Kode akses	Similaritas (%)	Perbedaan nukleotida
Isolat BL6	<i>Paraburkholderia kururiensis</i> 979	MN372025.1	99.76	3
	<i>Burkholderia</i> sp. NRF60-BP8	CP013372.1	99.92	1
	<i>Burkholderia territorii</i> strain APP50	MT533826.1	99.84	2
Isolat LB15	<i>Burkholderia cepacia</i> 16FK09	LC507241.1	99.84	2
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> GP3	MN240932.1	99.84	2
	<i>Burkholderia seminalis</i> CP-RN-4	MH842736.1	99.84	2
Isolat BK6	<i>Bacterium</i> strain U9	MK311319.1	99.53	6
	<i>Ralstonia mannitolilytica</i> NK20	MK519151.1	99.53	6
	<i>Ralstonia</i> sp. strain HZ15	MK999968.1	99.53	6
	<i>Bacterium</i> strain BS2078	MK825266.1	99.53	6
	<i>Ralstonia</i> sp. M103	LC385687.1	99.53	6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>B. cenocepacia</i> GP3																			
2. <i>B. cepacia</i> 16FK09	0.002																		
3. <i>B. diffusa</i>	0.007	0.005																	
4. <i>Bacterium</i> BS2078	0.083	0.083	0.083																
5. <i>B. metallica</i> R-16017T	0.003	0.003	0.007	0.082															
6. <i>B. territorii</i> APP50	0.002	0.002	0.007	0.082	0.003														
7. <i>Burkholderia</i> sp. NRF60-BP8	0.002	0.002	0.007	0.081	0.004	0.001													
8. Isolat LB15	0.002	0.002	0.007	0.082	0.005	0.002	0.001												
9. <i>P. hospita</i> HJ03	0.045	0.047	0.049	0.083	0.046	0.047	0.047	0.046											
10. <i>P. tropica</i> S41-2	0.042	0.40	0.038	0.085	0.042	0.042	0.041	0.040	0.038										
11. <i>B. kururiensis</i> NBRC 107107	0.051	0.052	0.052	0.087	0.052	0.052	0.053	0.052	0.037	0.039									
12. <i>P. kururiensis</i> 979	0.051	0.052	0.052	0.087	0.052	0.052	0.053	0.052	0.037	0.039	0.00								
13. Isolat BL6	0.052	0.054	0.053	0.087	0.053	0.054	0.053	0.052	0.036	0.039	0.002	0.002							
14. <i>Bacterium</i> U9	0.083	0.083	0.083	0.00	0.082	0.082	0.081	0.082	0.083	0.085	0.087	0.087	0.087						
15. <i>R. mannitolilytica</i> NK20	0.083	0.083	0.083	0.00	0.082	0.082	0.081	0.082	0.083	0.085	0.087	0.087	0.087	0.00					
16. <i>Ralstonia</i> sp. M103	0.083	0.083	0.083	0.00	0.082	0.082	0.081	0.082	0.083	0.085	0.087	0.087	0.087	0.00	0.00				
17. <i>Ralstonia</i> sp. HZ15	0.083	0.083	0.083	0.00	0.082	0.082	0.081	0.082	0.083	0.085	0.087	0.087	0.087	0.00	0.00	0.00			
18. <i>R. syzygii</i> ATCC 49543	0.083	0.082	0.083	0.010	0.081	0.081	0.080	0.081	0.078	0.084	0.083	0.083	0.082	0.010	0.010	0.010	0.010		
19. <i>R. thomasi</i> LMG6866	0.084	0.083	0.084	0.007	0.083	0.083	0.082	0.083	0.084	0.087	0.087	0.087	0.087	0.007	0.007	0.007	0.007	0.011	
20. Isolat BK6	0.083	0.083	0.083	0.00	0.082	0.082	0.081	0.082	0.083	0.085	0.087	0.087	0.087	0.00	0.00	0.00	0.00	0.010	0.007

Gambar 3. Matriks nilai jarak genetik sekuen gen 16S rRNA pada sampel dengan bakteri referensi menggunakan model *p-distance*

tropica (0.039). Hal ini berkorelasi dengan hasil analisis similaritas yang menunjukkan bahwa sekuen gen 16S rRNA BL6 lebih berkerabat dengan bakteri *Paraburkholderia kururiensis*.

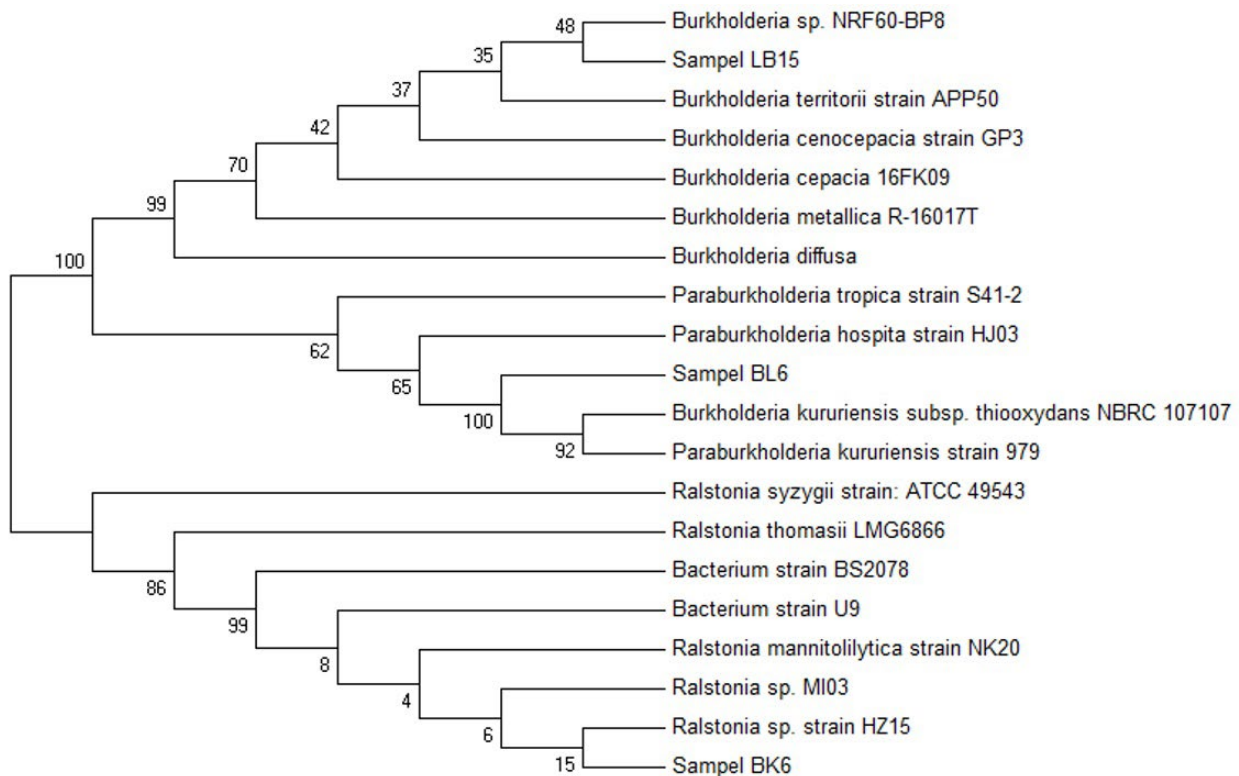
Sekuen gen 16S rRNA isolat BK6 memiliki jarak genetik paling kecil (0.000) dengan beberapa spesies bakteri, seperti *Bacterium* strain u9, *Ralstonia mannitolilytica* strain NK20, *Ralstonia* sp. M103, dan *Ralstonia* sp. strain HZ15 (Gambar 3). Jarak genetik yang sama pada keempat spesies tersebut dikarenakan karena keempat bakteri referensi tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat, dan kemungkinan termasuk dalam satu spesies. Similaritas sekuen gen 16S rRNA sampel terhadap beberapa spesies bakteri dapat ditindaklanjuti dengan analisis matriks jarak genetik.

Analisis Filogenetik Berdasarkan Gen 16S rRNA.

Pohon filogenetik pada penelitian ini direkonstruksi dengan 5 metode, seperti metode UPGMA, *neighbor-joining*, *minumum evolution*, *maximum parsimony*, dan *maximum likelihood*. Penggunaan beberapa metode tersebut digunakan untuk menguji konsistensi dalam menghasilkan pohon filogenetik yang akurat

dan presisi. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik dengan menggunakan metode UPGMA, *neighbor-joining*, *minumum evolution*, dan *maximum likelihood* secara konsisten menunjukkan bahwa sampel LB15 membentuk satu klad dengan *Burkholderia* sp. NRF60-BP8, dan membentuk klad yang cukup jauh dengan *Burkholderia diffusa* (Gambar 4). Hal ini mengindikasikan bahwa sampel LB15 berkerabat dekat dengan *Burkholderia* sp. NRF60-BP8 dan memiliki hubungan kekerabatan yang jauh dengan *Burkholderia diffusa*. Hubungan kekerabatan tersebut berkorelasi dengan nilai similaritas yang tinggi dan jarak genetik yang kecil antara sampel dengan bakteri referensi tersebut.

Sampel BL6 membentuk satu klad dengan *Paraburkholderia kururiensis* strain 979, sedangkan BK6 membentuk satu klad dengan *Ralstonia* sp. strain HZ15. Hal ini mengindikasikan bahwa sampel BL6 dan BK6 memiliki hubungan filogenetik yang dekat masing-masing dengan *Paraburkholderia kururiensis* strain 979 dan *Ralstonia* sp. strain HZ15 dibandingkan dengan bakteri referensi lainnya berdasarkan marka molekuler gen 16S rRNA.



Gambar 4. Pohon filogenetik yang direkonstruksi dengan metode *maximum-likelihood* menggunakan Mega 6 (1000x bootstrap)

PEMBAHASAN

Gen 16S rRNA merupakan gen penyusun ribosom subunit kecil yang hingga saat ini masih menjadi marka molekuler yang digunakan dalam identifikasi bakteri memiliki ukuran total sekitar 1500 pb. Johnson *et al.* (2019) menggunakan gen 16S rRNA untuk menganalisis mikrobia pada level spesies dan strain. Selain itu, marka molekuler tersebut juga digunakan untuk identifikasi bakteri patogen dan menjadi salah satu parameter dalam penentuan spesies baru dalam bakteri (Srinivasan *et al.* 2015; Vetrovsky dan Baldrian 2013).

Penentuan spesies baru pada bakteri dapat ditentukan dengan pendekatan *polyphasic taxonomy* yang membandingkan data genotipik, fenotipik, dan kemitaksonomik. Beberapa kompleksitas data yang digunakan seperti uji fisiologis dan biokimia, analisis filogenetik dengan menggunakan marka molekuler gen 16S rRNA, komposisi kandungan G+C pada DNA genom, similaritas nukleotida dan asam amino, dan komposisi asam lemak dan jenis *respiratory quinone* (Han *et al.* 2016; Hyeon *et al.* 2017; Newstead *et al.* 2021). Penelitian Besaury *et al.* (2021) mengidentifikasi bahwa *Sphingobacterium prati* yang diisolasi dari tanah pertanian sebagai spesies novel dari genus *Sphingobacterium* yang memiliki nilai similaritas gen 16S rRNA sebesar 98.31% dengan *Sphingobacterium canadense*. Namun, pada penelitian Gutierrez-Patricio *et al.* (2021) menemukan *Paracoccus onubensis* sebagai spesies baru dengan nilai similaritas gen 16S rRNA sebesar 97.9% dengan *Paracoccus saliphilus*.

Isolat LB15 dan BK6 memiliki nilai similaritas $\geq 99\%$ dengan beberapa spesies bakteri. Pada dasarnya, nilai similaritas tersebut dapat menjadi dasar dalam mengidentifikasi isolat LB15 dan BK6 pada tahap spesies. Namun, hal itu tidak berlaku karena sekuen gen 16S rRNA kedua sampel tersebut memiliki similaritas yang tinggi terhadap beberapa jenis bakteri. Oleh karena itu, isolat LB15 dan BK6 masing-masing diidentifikasi sebagai *Burkholderia* sp. dan *Ralstonia* sp. Ada beberapa faktor yang dapat menyebabkan sekuen gen 16S rRNA sampel yang memiliki similaritas terhadap beberapa spesies bakteri, diantaranya penggunaan sekuen parsial gen 16S rRNA, similaritas gen 16S rRNA yang sangat tinggi diantara spesies bakteri pada genus tertentu, dan database NCBI yang tidak diperbaharui terhadap perubahan klasifikasi.

Analisis bioinformatika yang pertama dilakukan dalam mengidentifikasi spesies bakteri secara molekuler adalah dengan menganalisis similaritas gen 16S rRNA sampel yang dibandingkan dengan sekuen referensi yang terdapat di database *GenBank* (NCBI-National Center for Biotechnology Information). Hal ini juga menjadi salah satu dasar dalam penentuan hasil identifikasi spesies bakteri bersifat novel atau spesies yang sama. NCBI merupakan website yang menyediakan dan memfasilitasi penyimpanan sekuen nukleotida dan asam amino dari berbagai ilmuwan serta berbagai fitur-fitur bioinformatika lainnya.

Keakuratan nilai similaritas dapat dikonfirmasi dalam rekonstruksi pohon filogenetik. Penggunaan jarak genetik suatu sampel berperan penting dalam mengkonfirmasi kesesuaian hasil analisis similaritas

dan mendukung dalam konstruksi pohon filogenetik (Yan *et al.* 2019). Perubahan jarak genetik dapat berubah seiring dengan terjadinya laju mutasi dalam suatu evolusi (Aprilyanto dan Sembiring 2016).

Hasil analisis pohon filogenetik dengan beberapa metode rekonstruksi seperti UPGMA, *neighbor-joining*, *minimum evolution*, dan *maximum likelihood* menunjukkan bahwa isolat BL6 berkerabat dekat dengan *Paraburkholderia kururiensis*, sedangkan isolat LB15 dan BK6 masing-masing berkerabat dengan *Burkholderia* sp. dan *Ralstonia* sp. Beberapa kelompok bakteri tersebut telah dilaporkan memiliki aktivitas lipolitik yang cukup tinggi dan telah diaplikasikan pada berbagai proses biotransformasi. Lipase yang dihasilkan oleh *Burkholderia cepacia* memiliki ketahanan terhadap suhu tinggi dan toleran terhadap berbagai pelarut organik yang berperan penting dalam proses transesterifikasi untuk produksi biodiesel dan sintesis obat (Li *et al.* 2017; Sanchez *et al.* 2018). Selain itu, Yoo *et al.* (2011) melaporkan bahwa lipase yang dihasilkan *Ralstonia* mampu mengkatalisis secara enzimatik dalam produksi biodiesel dari minyak sawit dan minyak kedelai.

Pemilihan metode rekonstruksi pohon filogenetik harus mempertimbangkan dalam hal keakurasian yang meliputi aspek efisiensi, kekuatan, konsistensi, ketegasan, dan falsifiabilitas. Permasalahan utama dalam pohon filogenetik timbul ketika adanya peningkatan data genetik secara eksponensial. Berdasarkan jenis data, metode pengklasteran dibagi menjadi dua kelompok, yaitu berdasarkan matriks jarak (UPGMA, *neighbor-joining*, *minimum evolution*, dan *least square*), dan berdasarkan status karakter (*maximum parsimony* dan *maximum likelihood*). Metode matriks jarak menggunakan perbedaan/jarak genetik dari setiap pasangan urutan yang mengindikasikan semakin besar nilai jarak antar pasangan urutan, maka kekerabatan pasangan tersebut semakin jauh. Hal ini berbeda dengan metode status karakter yang mengevaluasi probabilitas dan jumlah substitusi pada setiap situs karakter dalam suatu jajaran (Aprilyanto dan Sembiring 2016).

Kekuatan suatu metode rekonstruksi filogenetik dapat dilihat pada aspek jumlah data yang dibutuhkan untuk berkonvergensi dalam suatu pohon filogenetik. Secara sederhana, metode status karakter lebih kuat dibandingkan dengan metode rekonstruksi berdasarkan matriks jarak karena metode matriks jarak membutuhkan data yang cukup banyak untuk menyimpulkan suatu hubungan filogenetik. Metode *maximum likelihood* (ML) lebih akurat dibandingkan dengan *maximum parsimony* (MP) karena metode MP hanya menggunakan informasi dari situs-situs tertentu saja di dalam jajaran urutan nukleotida. Metode *maximum-likelihood* telah digunakan dalam merekonstruksi filogenetik gen 16S rRNA pada bakteri *Frischella japonica* dan *Mycolicibacterium nivoides* sebagai spesies baru (Wolter *et al.* 2021; Dahl *et al.* 2021).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis sangat berterima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc, dan Dr. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si atas bimbingan dan saran selama penelitian, dan kepada PT. Wilmar Benih Indonesia, Bekasi, Indonesia yang telah memfasilitasi dan membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adina SR, Suwanto A, Meryandini A, Puspitasari E. 2021. Expression of novel acidic lipase from *Micrococcus luteus* in *Pichia pastoris* and its application in transesterification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19:1-11. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00155-w>
- Aprilyanto V, Sembiring L. 2016. *Filogenetika Molekuler; Teori dan Aplikasi*. Yogyakarta: Innosain.
- Besaury L, Floret J, Remond C. 2021. *Sphingobacterium prati* sp. nov., isolated from agricultural soil and involved in lignocellulose deconstruction. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71:1-8. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004963>
- Cheriyana S, Abraham ET. 2010. Enzymatic bioremediation of cashew nut shell liquid contamination. *J Hazard Mater* 176:1097-1099. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.091>
- Chourasia VR, Gawas AS, Menon AS, Shinde PM. 2015. Production of biodiesel by enzymatic transesterification using immobilized lipase. *International Journal of Engineering Research and General Science* 3:1238-1246.
- Dahl JL, Gatlin W, Tran PM, Sheik CS. 2021. *Mycolicibacterium nivoides* sp. nov. isolated from a peat bog. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*. 71:1-6.
- Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D. 2008. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:331-337. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1448-8>
- Ghaly AE, Dave D, Brooks MS, Budge S. 2010. Production of biodiesel by enzymatic transesterification. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6:54-76. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2010.54.76>
- Guo Q, Wang F, He F, Ha Y, Li Q, Jin J, Deng Z. 2016. The impact of technical cashew nut shell liquid on thermally-induced trans isomers in edible oils. *J Food Sci Technol* 53:1487-1488. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2147-y>
- Gutierrez-Patricio S, Gonzalez-Pimentel JS, Miller AZ, Hermons B, Saiz-Jimenez C, Jurado V. 2021. *Paracoccus onubensis* sp. nov., a novel alphaproteobacterium isolated from the wall of a show cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71:1-10. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004942>
- Han L, Mo Y, Feng Q, Zhang R, Zhao X, Lv J, Xie B. 2016. *Tianweitalia sediminis* gen. nov., a member of the family Phyllobacteriaceae, isolated from subsurface sediment core. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66:719-724. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000785>
- Hyeon JW, Jeong SE, Baek K, Jeon CO. 2017. *Roseitalea porphyridii* gen. nov., isolated from a red alga, and reclassification of *Hoeflea suaedae* Chung *et al.* 2014 as *Pseudohoeflea suaedae* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67:362-368. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001633>

- Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong B, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson, BM, Agresta HO, Mark G, Sodergren E, Weinstock GM. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communication* 10:1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Li K, Fan Y, He Y, Zeng L, Han X, Yan Y. 2017. *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis. *Scientific Reports* 7:1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16626-5>
- Newstead LL, Harris J, Goodbrand S, Varjonen K, Nuttall T, Paterson GK. 2021. *Staphylococcus caledonicus* sp. nov. and *Staphylococcus canis* sp. nov. isolated from healthy domestic dogs. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 71:1-7. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004878>
- Prabha SS, Pramod SS, Potty VP. 2011. Isolation, identification and methanogenesis of CNSL degrading bacteria and immobilized bioremediation techniques of CNSL and its contaminated water from cashew industry. *Middle East J Sci Res* 10:329.
- Purkan P, Lestari IT, Arissirajudin R, Ningsih RRP, Apriyani W, Nurlaila H, Sumarsih S, Hadi S., Retnowati W, Kim SW. 2020. Isolation of lipolytic bacteria from domestic waste compost and its application to biodiesel production. *Rayasan Journal of Chemistry* 13:1-11. <https://doi.org/10.31788/RJC.2020.1345697>
- Rajeswari T, Padmapriya B, Teesha K, Kumari PK. 2011. Degradation of cashew nut shell liquid by *Pseudomonas* from soil. *Int J Microbiol Res* 2:174-175.
- Ramnath L, Sithole B, Govinden R. 2017. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus wood* species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports* 15:114-124. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.07.004>
- Sanchez DA, Tonetto GM, Ferreira ML. 2018. *Burkholderia cepacia* lipase: a versatile catalyst in synthesis reaction. *Biotechnol Bioeng* 115:6-24. <https://doi.org/10.1002/bit.26458>
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, Kichan JM, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodies EL, Lynch SV. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *Plos One* 10:1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Susilowati A, Sari SLA, Setyaningsih R, Muthmainna HN, Handarwati H, Pangastuti A, Purwoko T. 2018. Lipolytic bacteria isolated from Indonesia sticky rice cake wajik and jenang experiencing with rancidity. *Biodiversitas* 19:351-356.
- Vetrovsky T, Baldrian P. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *Plos One* 8:1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Wolter LA, Suenami S, Miyazaki R. 2021. *Frischella japonica* sp. nov., an anaerobic member of the Orbales in the Gammaproteobacteria, isolated from the gut of the eastern honey bee, *Apis cerana japonica* Fabricius. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1-6.
- Xie, Khosasih V, Suwanto A, Kim HK. 2011. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous Skin. *J Microbiol Biotechnol* 22:86. <https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07060>
- Yan L, She Y, Elzo MA, Zhang C, Fang X, Chen H. 2019. Exploring genetic diversity and phylogenetic relationships of Chinese cattle using gene mtDNA 16S rRNA. *Archives Animal Breeding* 62:325-333. <https://doi.org/10.5194/aab-62-325-2019>
- Yoo HY, Simkhada JR, Cho SS, Park DH, Kim SW, Seong CN, Yo JC. 2011. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresour Technol* 102:6104-6111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.046>