

**OPTIMASI JENIS DAN KONSENTRASI KATION DIVALEN PADA  
PROSES AMPLIFIKASI SIKUEN 16S rDNA BAKTERI *Bacillus cereus***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**IMAM ABU HANIFAH**  
NIM. 12630025



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2019**

**OPTIMASI JENIS DAN KONSENTRASI KATION DIVALEN PADA  
PROSES AMPLIFIKASI SIKUEN 16S rDNA BAKTERI *Bacillus cereus***

SKRIPSI

Oleh:  
**IMAM ABU HANIFAH**  
NIM. 12630025

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal : 10 Januari 2019

Pembimbing I

Pembimbing II

Akyunul Jannah, M.Si  
NIP. 197504 10200501 2 009

Nur Aini, M.Si  
NIDT. 19840608 20160801 2 070



Mengetahui,  
Ketua Jurusan

Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19740620 200604 2 002

OPTIMASI JENIS DAN KONSENTRASI KATION DIVALEN PADA  
PROSES AMPLIFIKASI SIKUEN 16S rDNA BAKTERI *Bacillus cereus*

SKRIPSI

Oleh:  
IMAM ABU HANIFAH  
NIM. 12630025

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 10 Januari 2019

Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19821101 200901 2 007	(.....  .....)
Ketua Penguji	: Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19980711 20160801 2 067	(.....  .....)
Sekretaris Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si., M.P NIP. 19760611 200501 2 006	(.....  .....)
Anggota Penguji	: Nur Aini, M.S NIP. 19840608 20160801 2 070	(.....  .....)

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan

  
Etok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19740620 200604 2 002

**PERNYATAAN ORISINILITAS PENELITIAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Imam Abu Hanifah  
NIM : 12630025  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : "Optimasi Jenis dan Konsentrasi Kation Divalen Pada  
Proses Amplifikasi Sikuen 16S rDNA Bakteri *Bacillus cereus*"

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber kutipan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 10 Januari 2019  
Yang Membuat Pernyataan,



Imam Abu Hanifah  
NIM. 12630025

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat, Taufiq dan Hidayah-Nya tiada henti dan tiada batas kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian ini. Sholawat dan salam semoga senantiasa mengalir indah dan tulus terucap kepada Nabi Muhammad SAW, keluarganya, sahabatnya dan para umat serta pengikutnya.

Laporan hasil penelitian ini dibuat untuk memenuhi salah satu kriteria kelulusan yang ada di jurusan kimia. Laporan hasil penelitian ini dapat disusun karena dukungan, motivasi serta bimbingan dari berbagai pihak. Tiada kata yang patut terucap untuk menguntai sedikit makna kebahagiaan ini.

Oleh karena itu, izinkanlah penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dosen Pembimbing ibu Akyunul Jannah, M.Si, ibu Nur Aini, M.Si dan dosen konsultan ibu Dewi Yuliani, M.Si karena atas bimbingan, pengarahan, dan kesabarannya penulisan hasil penelitian ini dapat terselesaikan.
2. Keluarga terutama orang tua kami dan teman-teman selaku pendukung serta pemberi semangat.
3. Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Kami sadar bahwa dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini belum sempurna. Oleh karena itu, segala kritik dan saran akan kami terima dengan lapang hati dan mohon maaf kepada semua pihak apabila terdapat kesalahan selama penyusunan. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan menambah khasanah ilmu pengetahuan. Demikian laporan ini kami buat semoga dapat memberikan manfaat bagi semua pihak.

Malang, 10 Januari 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL.....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR ORISINALITAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>الملخص.....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Batasan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Masalah.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Bakteri <i>Bacillus sp.</i> .....	6
2.2 Identifikasi Sikuen 16S rDNA.....	7
2.3 Isolasi DNA Metode CTAB.....	9
2.4 Teknik PCR.....	10
2.5 Enzim DNA Polimerase.....	12
2.6 Kation Divalen pada Proses Replikasi DNA.....	13
2.6.1 Mg <sup>2+</sup> sebagai Kation Divalen .....	14
2.6.2 Kation Pengganti Mg <sup>2+</sup> .....	15
2.6.3 Elektroforesis Hasil Amplifikasi 16S rDNA.....	17
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Pelaksanaan Penelitian.....	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.2.1 Alat .....	19
3.2.2 Bahan .....	19
3.3 Tahapan Penelitian.....	20
3.4 Cara Kerja .....	21
3.4.1 Peremajaan Bakteri.....	21
3.4.2 Isolasi DNA Menggunakan Metode CTAB .....	21
3.4.3 Amplifikasi Sikuen 16S rRNA .....	22
3.4.4 Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA.....	23
3.4.5 Analisis Data.....	23

## **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Isolasi DNA Bakteri.....	25
4.2 Analisis Isolat DNA.....	27
4.3 Variasi Jenis dan Konsentrasi Kation Divalen pada Amplifikasi Sikuen 16S rDNA Bakteri.....	28
4.4 Penentuan Urutan DNA.....	32
4.5 Optimasi Amplifikasi DNA dalam Perspektif Islam.....	37

## **BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40

<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>41</b>
----------------------------	-----------

<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>48</b>
----------------------	-----------



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Panjang basa sikuen 16S rDNA galur spesies <i>B. cereus</i> .....	8
Tabel 2.2 Macam-macam primer universal genus <i>Bacillus</i> .....	11
Tabel 2.3 Perbandingan karakteristik kation divalen.....	16
Tabel 4.1 Hasil uji kuantitatif DNA .....	28
Tabel 4.2 Uji konsentrasi DNA hasil PCR .....	31
Tabel 4.3 Hasil analisis menggunakan BLAST-n sampel BcK.....	34
Tabel 4.4 Hasil analisis menggunakan BLAST-n sampel BcMg .....	34

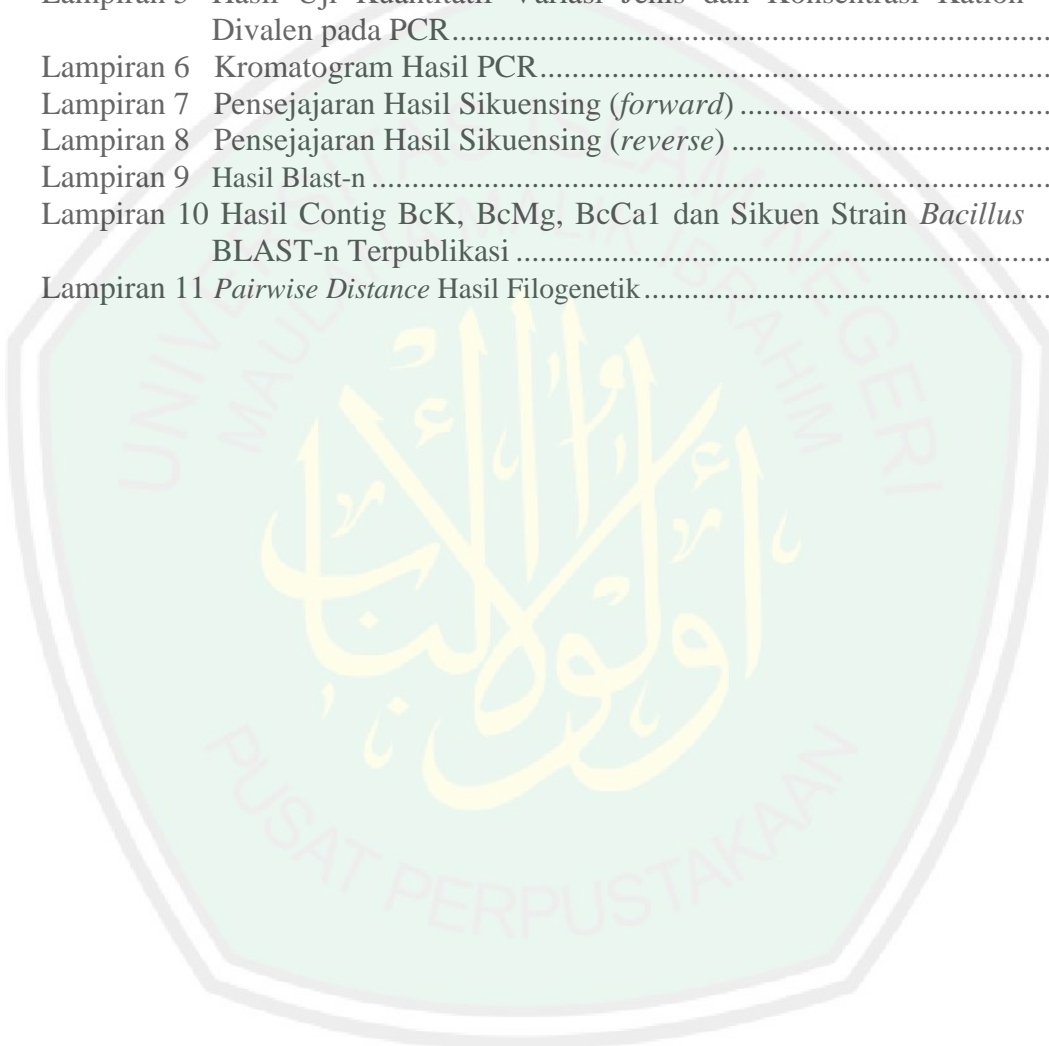


## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	6
Gambar 2.2	Daerah variabel pada struktur sekunder 16S rDNA bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	8
Gambar 2.3	Tiga tahapan dalam satu siklus PCR.....	10
Gambar 2.4	Struktur Taq DNA Polimerase.....	11
Gambar 2.5	Interaksi Mg <sup>2+</sup> dalam pembentukan ikatan phophodiester .....	12
Gambar 2.6	Elektroforesis hasil PCR sampel isolat (1) <i>Bacillus cereus</i> (2) <i>Bacillus subtilis</i> .....	17
Gambar 4.1	Penempelan SDS pada lapisan lipid protein membran plasma sel dan pembentukan micelle .....	26
Gambar 4.2	Pemurnian DNA menggunakan (a) kloroform dan isoamil alkohol (24:1) serta (b) fenol, kloroform dan isoamil alkohol (25:24:1).....	26
Gambar 4.3	Elektroferogram DNA hasil isolasi. Lajur 1 dan 2 isolat DNA <i>B.cereus</i> menggunakan metode CTAB 2%. M merupakan marker DNA 1 kb. ....	27
Gambar 4.4	Elektroferogram perbandingan hasil PCR dengan variasi kation divalen (KD) dan total konsentrasi kation divalen (TKKD).....	29
Gambar 4.5	Elektroferogram PCR hasil uji lanjutan di (a) Lab UIN Malang (b) Lab 1 <sup>st</sup> Gene. ....	30
Gambar 4.6	Sikuen hasil <i>contig</i> kontrol .....	33
Gambar 4.7	Pohon filogenetik dari sekuen gen 16S rRNA dari isolat BcK, BcMg, BcCa1 dan BcCa2.....	36

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan Penelitian .....	48
Lampiran 2	Diagram Alir .....	49
Lampiran 3	Perhitungan .....	53
Lampiran 4	Hasil Uji Kuantitatif Isolat DNA.....	56
Lampiran 5	Hasil Uji Kuantitatif Variasi Jenis dan Konsentrasi Kation Divalen pada PCR.....	57
Lampiran 6	Kromatogram Hasil PCR.....	58
Lampiran 7	Pensejajaran Hasil Sikuensing ( <i>forward</i> ) .....	64
Lampiran 8	Pensejajaran Hasil Sikuensing ( <i>reverse</i> ) .....	66
Lampiran 9	Hasil Blast-n .....	69
Lampiran 10	Hasil Contig BcK, BcMg, BcCa1 dan Sikuen Strain <i>Bacillus</i> BLAST-n Terpublikasi .....	73
Lampiran 11	<i>Pairwise Distance</i> Hasil Filogenetik.....	83



## ABSTRAK

Hanifah, I. A. 2018. **Optimasi Jenis dan Konsentrasi Kation Divalen pada Proses Amplifikasi Sikuen 16s rDNA Bakteri *Bacillus cereus***. Pembimbing I: Akyunul Jannah, M.P; Pembimbing II: Nur Aini, M.Si; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si

Kation divalen merupakan kofaktor logam yang dibutuhkan enzim DNA polimerase dalam melakukan aktivitas replikasi DNA. Jenis dan konsentrasi kation divalen dapat mempengaruhi pita elektroforesis produk PCR, panjang sikuen serta kedekatan spesies yang teridentifikasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh variasi jenis dan konsentrasi kation divalen pada proses amplifikasi sikuen gen 16S rDNA bakteri *Bacillus cereus*. Metode yang digunakan untuk isolasi DNA ialah CTAB 2%. Amplifikasi sikuen 16S rDNA menggunakan primer universal 27F dan 1492R dengan variasi jenis kation  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  serta konsentrasi total kation divalen 3; 3,5; 4 mM pada masing-masing variasi jenis kation. Isolat DNA yang diperoleh, memiliki rasio  $A_{260}/A_{280}$  isolat sampel sebesar 2,09 dan konsentrasi 2453,2 ng/ $\mu$ L. Data hasil sikuensing dianalisis menggunakan BLAST-n dan pohon filogenetik. Berdasarkan hasil analisis sikuen, kontrol positif BcK ( $Mg^{2+}$  2,5 mM) menghasilkan sikuen 1432 bp, sedangkan penambahan konsentrasi  $Mg^{2+}$  pada BcMg ( $Mg^{2+}$  3,0 mM) menghasilkan sikuen yang lebih pendek yaitu 1316 bp. Penambahan  $Ca^{2+}$  menghasilkan sikuen BcCa1 (*forward*) 530 dan BcCa2 (*reverse*) 757 basa yang tidak saling komplementer. Konstruksi filogenetik menunjukkan BcK ( $Mg^{2+}$  2,5 mM) sebagai *B. cereus* strain FORT 73 dan BcMg ( $Mg^{2+}$  3 mM) sebagai *B. cereus* strain DQ-8.

**Kata Kunci:** *Bacillus cereus*, kation divalen, sikuen 16S rDNA

## ABSTRACT

Hanifah, I. A. 2018. **Optimization Type and Divalent Cation Concentration in The 16s rDNA Bacterial Amplification Process of *Bacillus cereus*.** Supervisor I: Akyunul Jannah, M.Si; Supervisor II: Nur Aini, M.Si; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si.

Divalent cation is a metal cofactor that is needed for DNA polymerase enzymes in carrying out DNA replication activities. The type and concentration of divalent cations can affect the electrophoresis band of PCR products, the elbow length and the proximity of the species identified. The purpose of this study was to determine the effect of species variation and divalent cation concentration on the process of sequencing the *Bacillus cereus* 16S rDNA bacterial gene sequence. The method used for DNA isolation is 2% CTAB. The amplification of the 16S rDNA sequence uses a universal primer 27F and 1492R with a variety of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  cations and a total divalent cation concentration 3; 3.5; 4 mM in each variation of cation type. DNA isolates obtained, had a sample isolation ratio of  $A_{260} / A_{280}$  of 2.09 and a concentration of 2453.2 ng /  $\mu$ L. Sequencing data were analyzed using BLAST-n and phylogenetic trees. Based on the results of sequence analysis, the positive control of BcK ( $Mg^{2+}$  2.5 mM) produced a 1432 bp sequence, while the addition of  $Mg^{2+}$  concentration in BcMg ( $Mg^{2+}$  3.0 mM) produced a shorter sequence of 1316 bp. The addition of  $Ca^{2+}$  results in sequences of BcCa1 (forward) 530 and BcCa2 (reverse) 757 bases which are not mutually complementary. Phylogenetic construction showed BcK ( $Mg^{2+}$  2.5 mM) as *B. cereus* strain FORT 73 and BcMg ( $Mg^{2+}$  3 mM) as *B. cereus* strain DQ-8.

**Key Word:** *Bacillus cereus*, Divalent cation, 16S rDNA sequences

## الملخص

إمام أبو حنيفة. 2018. تعظيم الاستفادة من نوع وتركيز الكاتيونات ثنائي التكافؤ في 16S الحمض النووي المؤتلف عملية تسلسل التضخيم. البكتيريا *Bacillus* الشمعية. المستشار الأول: أكينل جنة؛ المستشار الثاني: نور عيني، ماجستير؛ المستشار: ديوي يولياني، ماجستير

الكاتيونات ثنائي التكافؤ المعادن المطلوب انزيم العامل المساعد DNA polymerase في النشاط تكرار الحمض النووي. نوع وتركيز الكاتيونات ثنائي التكافؤ قد يؤثر على الشريط الكهربائي من المنتجات PCR، طول تسلسل وقربه من الأنواع التي تم تحديدها. والغرض من هذه الدراسة تم تحديد حدة تأثير التغيرات في أنواع وتركيزات الكاتيونات ثنائي التكافؤ في 16S تضخيم الحمض النووي المؤتلف تسلسل الجينات باستخدام بادئات العالمية 27 F و 1492R مع وجود اختلافات في نوع من الأيونات الموجبة المغنيسيوم والكالسيوم والتركيز الكلي من الكاتيونات ثنائي التكافؤ 3؛ 3، 4 ملم في كل نوع من أنواع الكاتيونات DNA. العزلات التي تم الحصول عليها، فإن نسبة  $A_{260} / A_{280}$  عزل عينات من 2.09 وتركيز 2453.2. تم تحليل بيانات التسلسل باستخدام عمود BLAST-n و. filogenetik استناداً إلى نتائج تحليل التسلسل، أنتج التحكم الإيجابي لـ BcK (Mg) (2.5 mM) تتابع 1432 bp، في حين أن إضافة تركيز Mg في 3.0) BcMg مجم من (Mg أنتج سلسلة أقصر من 1316 bp إضافة Ca تنتج قاعدة) BcCa عكسي 757 (التي لا تكمل بعضها البعض. أظهر بناء التوالد البيولوجي BcK (Mg 2.5 mM) مثل BcMg و *Bacillus cereus* Strain FORT 73 و *Bacillus cereus* Strain DQ-8 (Mg 3mM) كسلسلة.

*Bacillus cereus* 16S rDNA تسلسل، الكاتيون ثنائي التكافؤ: الكلمات البحث

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Perkembangan ilmu pengetahuan bidang biologi molekuler, khususnya pengkajian karakter bahan genetik telah menghasilkan kemajuan pesat dalam penelaahan suatu organisme. Tahapan identifikasi organisme secara fenotip telah didukung dengan adanya upaya identifikasi genotip. Penemuan teknik identifikasi genotip seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing telah banyak dimanfaatkan khususnya dibidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekuler (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Berkembangnya metode identifikasi genotip melibatkan beberapa tahapan, yaitu isolasi *deoxyribose nucleic acid* (DNA), amplifikasi DNA target dan sekuensing (Suryanto, 2003). Hasil identifikasi terbaik dapat diperoleh dengan memaksimalkan setiap tahapan tersebut. Usaha untuk mendapatkan hasil yang terbaik sesuai dengan firman Allah dalam surah Al-Insyirah (94): 7.

﴿٧﴾ فَإِذَا فَرَغْتَ فَانصَبْ

*"Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain)."*

Hamka dalam Tafsir Al-Azhar (1973) menjelaskan bahwa pekerjaan yang telah dimulai dan pekerjaan sebelumnya tidaklah terlepas dari suatu kesulitan. Tantangan berat dalam setiap usaha yang dilakukan harus tetap dilakukan dengan sungguh-sungguh dengan tidak melupakan adanya sang pencipta dan pemilik segalanya. Dalam Kitab Al-Muwaththa Imam Malik juga disebutkan bahwa Allah

SWT telah menjanjikan kemudahan dalam setiap kesulitan bagi siapa yang terus menggunakan akalinya.

Salah satu tahapan penting yang perlu dioptimalkan adalah tahap amplifikasi. Proses amplifikasi melalui teknik PCR dilakukan dengan melipatgandakan fragmen spesifik dari DNA menggunakan primer tertentu (Joshi dan Deshpande, 2010). Menurut Ekman (2007), kondisi optimal reaksi pada PCR akan berpengaruh terhadap spesifitas, sensitivitas, dan efisiensi pada proses PCR. Salah satu substansi yang digunakan untuk mengoptimalkan kondisi reaksi PCR adalah konsentrasi kation divalen (Bauer, dkk., 2004).

Kation divalen seperti  $Mg^{2+}$  dibutuhkan untuk menstimulasi aktivitas DNA polimerase dalam proses sintesis atau pemanjangan untaian DNA baru (Prayoga, 2015). Menurut Viljoen (2005), besar kecilnya konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  akan mempengaruhi interaksi primer dan templat DNA, spesifitas produk, dan banyaknya produk yang dihasilkan (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Asy'ari dan Noer (2005) melakukan amplifikasi sampel mtDNA rongga mulut yang membuktikan bahwa konsentrasi  $MgCl_2$  berpengaruh terhadap jumlah produk PCR yang dihasilkan. Konsentrasi 1,5 mM  $MgCl_2$  pada buffer PCR standar menghasilkan fragmen kurang dari 2 kb, sedangkan konsentrasi 2,5 mM  $MgCl_2$  menghasilkan fragmen lebih dari 4,8. Menurut Viljoen (2005), variasi konsentrasi yang dapat digunakan untuk optimalisasi konsentrasi  $MgCl_2$  berada pada konsentrasi 1 – 5 mM.

Peran  $Mg^{2+}$  sebagai kofaktor yang umumnya digunakan untuk semua jenis enzim DNA polimerase, dapat digantikan oleh kation divalen lainnya. Kation divalen tersebut diantaranya adalah  $Mn^{2+}$  dan  $Co^{2+}$  pada *E. Coli* DNA polimerase I

(Sirover, 1979) serta  $\text{Cd}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$  pada DNA polimerase  $\beta$  (Pelletier, 1996). Selain itu, terdapat kation lain seperti  $\text{Ca}^{2+}$  pada Dpo4 DNA polimerase (Irimia, dkk., 2006),  $\text{Cr}^{2+}$  pada DNA polimerase  $\beta$  (Arndt, 2001);  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$  pada HIV-1 RT polimerase (Achutan dan Stefano, 2015).

Substitusi  $\text{Mg}^{2+}$  atau penambahan kation tertentu dapat berpengaruh terhadap proses amplifikasi yang ditunjukkan melalui pita elektroforesis dan panjang basa yang teramplifikasi. Dalam penelitian Ralec, dkk. (2017), variasi kation pengganti  $\text{Mg}^{2+}$  pada reaksi enzimatik enzim PabPolB DNA Polimerase menunjukkan hanya kation  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mn}^{2+}$  yang dapat mengamplifikasi templat 87-mer DNA. Penambahan  $\text{Ca}^{2+}$  dengan variasi konsentrasi 0,1-20 mM dan konsentrasi  $\text{Mg}^{2+}$  0,1-7,5 mM menunjukkan bahwa semakin banyak penambahan kation  $\text{Ca}^{2+}$  menyebabkan hilangnya *smear* pada pita hasil elektroforesis.

Optimasi jenis dan konsentrasi kation divalen dapat digunakan proses amplifikasi 16S rDNA (Santos, dkk., 2009). Keberhasilan optimasi ditandai dengan munculnya pita pada 1500-1550 bp (Clarridge, 2004). Produk amplifikasi yang menunjukkan pita *smear* dan tipis akan berpengaruh terhadap urutan DNA produk yang dihasilkan melalui tahap selanjutnya yaitu sekuensing DNA.

Menurut Bavykin, dkk., (2004) sikuen 16S rDNA digunakan dalam identifikasi spesies bakteri sebagai penanda molekuler yang dimiliki oleh semua organisme prokariotik termasuk bakteri *Bacillus cereus*. Bakteri *Bacillus cereus* merupakan salah satu spesies *Bacillus sp.* yang dimanfaatkan sebagai penghasil enzim selulase (Nema, dkk., 2015) dan senyawa antimikroba (Yusra, 2014). Namun, beberapa galur bakteri ini juga diketahui bersifat patogen (Rasko, 2005).

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana hasil variasi jenis dan konsentrasi kation divalen pada amplifikasi sikuen gen 16S rDNA bakteri *Bacillus cereus*.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh variasi jenis dan konsentrasi kation divalen pada proses amplifikasi sikuen gen 16S rDNA bakteri *Bacillus cereus*.

## 1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah isolat bakteri *Bacillus cereus* hasil isolasi dari bekatul.
2. Variasi kation divalen yang digunakan adalah kation  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  dan  $Cr^{2+}$ .
3. Analisis data hasil PCR menggunakan elektroforesis,

## 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi tentang jenis kation divalen dan konsentrasi kation divalen  $MgCl_2$  dan suhu *annealing* terbaik untuk optimasi PCR pada proses amplifikasi sikuen gen 16S rDNA bakteri *Bacillus cereus*. Hasil optimasi yang dilakukan diharapkan dapat digunakan sebagai data acuan dalam penentuan metode untuk analisis genotip bakteri *Bacillus cereus*. Efisiensi proses identifikasi melalui optimasi kondisi PCR diharapkan dapat mempermudah

penelitian selanjutnya dalam melakukan rekayasa genetik galur-galur spesies *Bacillus cereus* sehingga dapat dimanfaatkan secara optimal.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bakteri *Bacillus sp.*

*Bacillus* merupakan jenis bakteri yang mampu mendegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa dan hidrokarbon (Nema, Alamir & Mohammad, 2015) dengan menghasilkan enzim ekstraseluler seperti selulase (Wongsa, & Werukhamkul, 2007) dan amilase (Ningsih, Rastuti, & Kamaludin, 2012). Hasil identifikasi yang dilakukan oleh *Public Health England* (2015) mengenai spesies *Bacillus* menunjukkan bahwa secara taksonomi genus *Bacillus* terbagi dalam 268 spesies dan 7 subspecies. Keanekaragaman spesies *Bacillus* dan manfaatnya merupakan wujud tanda-tanda kekuasaan Allah sebagaimana telah difirmankan dalam Surat An-Nahl (16): 13.

﴿۱۳﴾ وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ

"dan untukmu di bumi ini dengan berbagai jenis dan macam warnanya. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran." (QS. An-Nahl: Ayat 13)

Berdasarkan kitab Al-Maraghi (1989) ayat ini menjelaskan bahwa Allah Swt. menundukkan apa yang Dia ciptakan untuk manusia seperti tumbuhan dan hewan dengan bermacam-macam jenis, bentuk, manfaat dan ciri khas masing-masing. Bakteri juga termasuk ciptaan Allah yang memiliki perbedaan antara satu sama lain.



Gambar 2.1 *Bacillus cereus* (microbewiki.kenyon.edu)

*Bacillus cereus* merupakan salah satu kelompok besar spesies *Bacillus sp.* Bakteri ini termasuk golongan bakteri gram positif, aerob fakultatif, dan dapat membentuk spora (Gambar 2.1). Spora *B. cereus* lebih tahan pada panas kering daripada pada panas lembab dan dapat bertahan lama pada produk yang kering. Sifat-sifat dan karakteristik-karakteristik lainnya, termasuk sifat-sifat biokimia, digunakan untuk membedakan dan menentukan keberadaan *B. cereus* (Novitasari, 2014).

## 2.2 Identifikasi Sikuen 16S rDNA

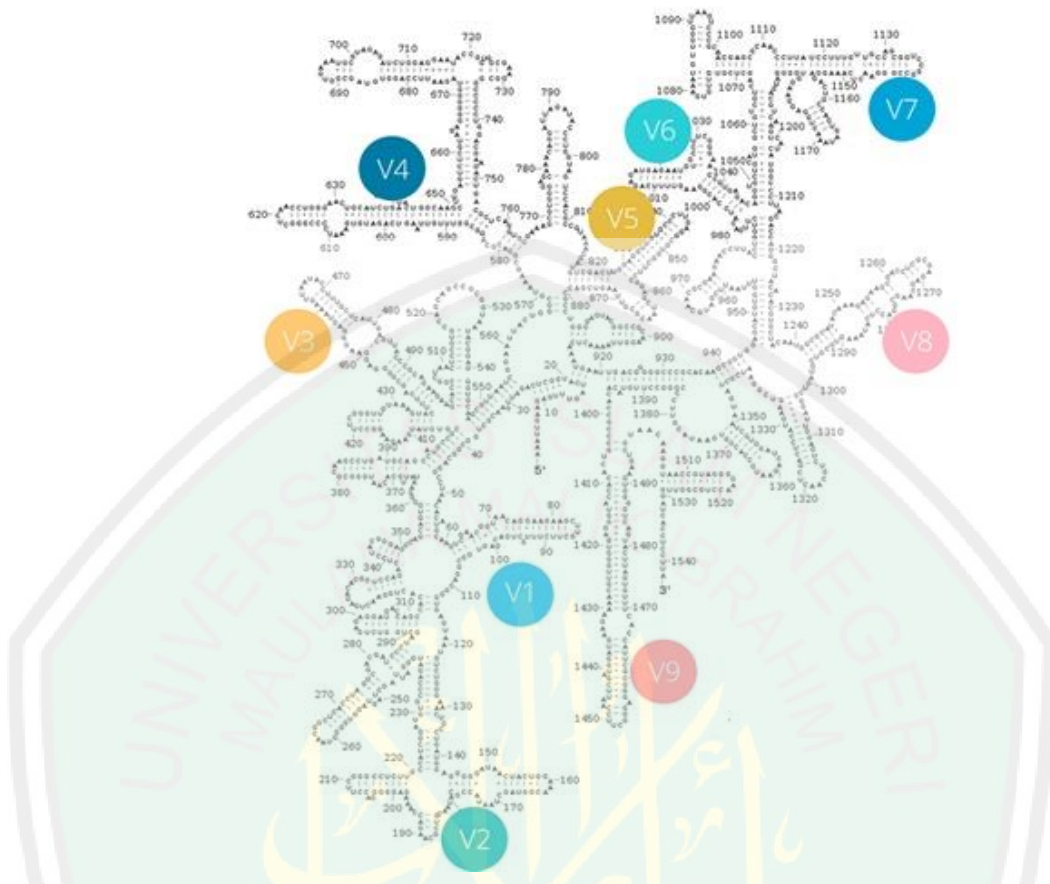
Penanda molekuler 16S rDNA adalah komponen subunit kecil ribosom sering digunakan dalam proses identifikasi. Pemilihan 16S rDNA dilakukan karena terdapat pada semua prokariotik dan memiliki sikuen konservatif serta sikuen lainnya yang sangat bervariasi pada setiap spesiesnya. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Pangastuti, 2006).

Tabel 2.1 Panjang basa sikuen 16S rDNA galur spesies *B. cereus*

<b>Bakteri</b>	<b>Panjang Basa (bp)</b>	<b>Referensi</b>
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	1512	Ivanova, 2003
<i>B. cereus</i> strain CCM 2010	1535	Sipos, 2007
<i>B. cereus</i> strain IAM 12605	1486	Suzuki, 2014

Metode identifikasi molekuler menggunakan sikuen 16S rDNA juga dapat diterapkan pada bakteri *B. cereus*. Pemanfaatan 16S rDNA dilakukan karena *B. cereus* memiliki kemiripan dengan beberapa bakteri lainnya seperti *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* dan *B. Medusa* (Bavykin, dkk., 2004). Penelitian Asmawati (2016), menunjukkan bahwa berdasarkan hasil *Basic Local Alignment and Search Tool for Nucleotida* (BLAST-n) *B. cereus* memiliki *identity* 99% dengan *B. thuringiensis* dan *B. subtilis*.

Pada sikuen 16S rDNA terdapat daerah konservatif yang dimanfaatkan sebagai tempat penempelan primer. Selain itu, terdapat daerah variatif yang membedakan antar organisme. Berdasarkan penelitian Yang, Wang dan Qian, (2016) terdapat daerah variatif 1 – 9. Pada sampel bakteri *Escherichia coli*, daerah variatif berada pada urutan nukleotida 8-96, 97-306, 307-487, 488-746, 747-885, 886-1029, 1030-1180, 1181-1372, 1373-1468 (Gambar 2.2). Primer yang digunakan dalam amplifikasi sikuen akan mengenali daerah konservatif dan mengamplifikasi basa nukleotida yang diapitnya. Dengan demikian akan diperoleh sikuen yang khas pada organisme tersebut.



Gambar 2.2 Daerah variabel pada struktur sekunder 16S rDNA bakteri *Escherichia coli*. (Yang, Wang, dan Qian, 2016)

### 2.3 Isolasi DNA Metode CTAB

Isolasi DNA merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memperoleh DNA murni organisme. Prinsip isolasi DNA adalah memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Membran sel dilisis dengan menambahkan detergen untuk membebaskan isinya termasuk ribosom dan asam nukleat pada kromosom (Gaffar, 2007).

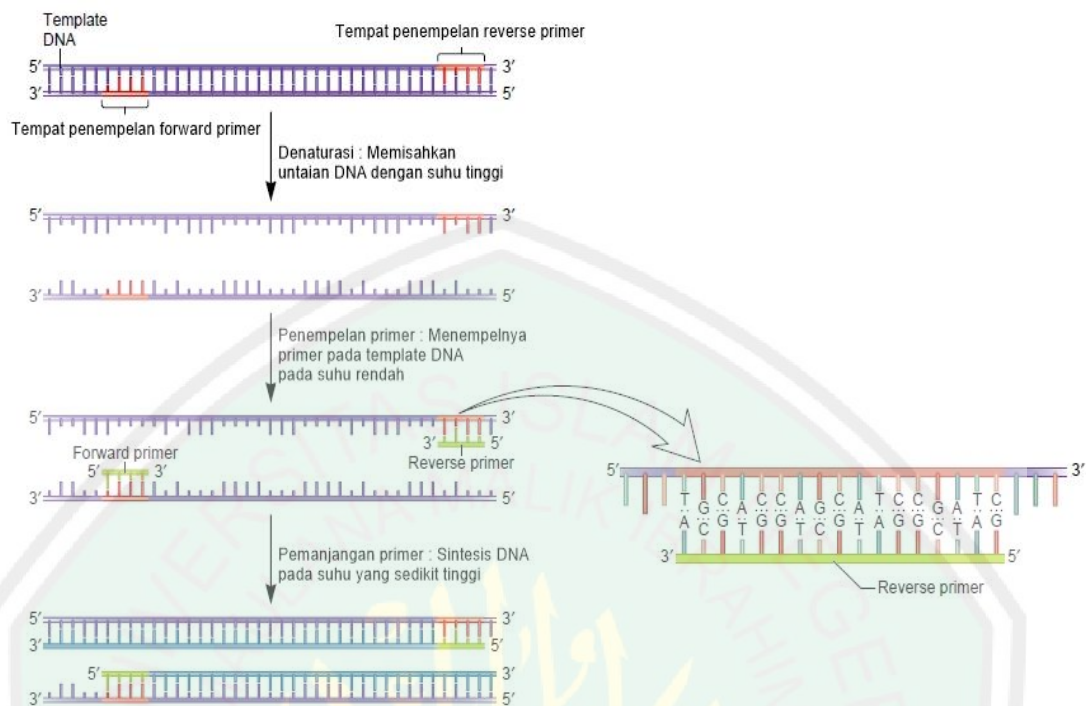
Senyawa kimia yang digunakan untuk proses lisis sel bermacam-macam. Pada metode CTAB, dilakukan penambahan CTAB atau *Cetyl trimethylammonium bromide* merupakan sejenis deterjen yang dapat mendegradasi dinding sel, denaturasi protein, memisahkan karbohidrat, merusak membran sel dan melarutkan

DNA. Proses pemisahan DNA dari molekul lain yang tidak diinginkan didasarkan pada kepolaran. DNA yang cenderung bersifat polar akan tertarik ke fasa air, sedangkan protein dan lipid dengan rantai alifatiknya yang cenderung nonpolar akan tertarik ke fasa organik (Buckingham dan Flaws, 2007). Selain berfungsi untuk melarutkan lipid dan protein, kloroform juga dapat melarutkan kembali DNA yang kemungkinan membentuk kompleks dengan CTAB (Dias, Miguel & Lindman, 2008). Pada tahap presipitasi juga digunakan etanol agar terjadi dehidrasi DNA sehingga terjadi pengendapan DNA.

#### 2.4 Teknik PCR

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah metode amplifikasi enzimatik *in vitro* untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida spesifik (Yuwono, 2006). Proses amplifikasi terdiri dari tiga tahap berulang dalam 30-40 siklus. Proses amplifikasi terdiri dari tiga tahap berulang dalam 30-40 siklus. Menurut Asmawati (2016), amplifikasi sekuens 16S rDNA *Bacillus cereus* pada setiap siklusnya terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 94°C, penempelan pada suhu 48°C, dan ekstensi pada suhu 72°C (Gambar 2.3). Hasil yang diperoleh kemudian divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

PCR memerlukan lima komponen utama yaitu (1) DNA cetakan, (2) primer, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTPs), (4) enzim DNA polimerase dan (5) buffer. Isolat DNA cetakan umumnya memiliki kemurnian nilai kemurnian sebesar 1,8-2,0 (Thermo scientific, 2011).



Gambar 2.3 Tiga tahapan dalam satu siklus PCR (Brooker, 2012)

Primer sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' untuk proses ekstensi DNA memiliki panjang sikuen 15-25 basa (Broker, 2012). Salah satu jenis primer yang sering digunakan untuk identifikasi molekuler spesies bakteri ialah sikuen primer universal.

Tabel 2.2 Macam-macam primer universal genus *Bacillus*

Jenis Primer	Urutan Basa	Referensi
27F-1529F	5'AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG 5'CAIAAACGACGTGATCC	Al Jassim, dkk.,2005; Osborn dan Smith, 2005
8R-1429F	5'AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG 5'GGTTACCTTGTTACGACTT	Habibie, dkk., 2014
63R-1378F	5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC 5'GGGCGGWGTGTACAAGGC	Marchesi, 1998
27F-1429F	5'AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG 5'CGGTTACCTTGTTACGACTT	Pradhap, dkk., 2011

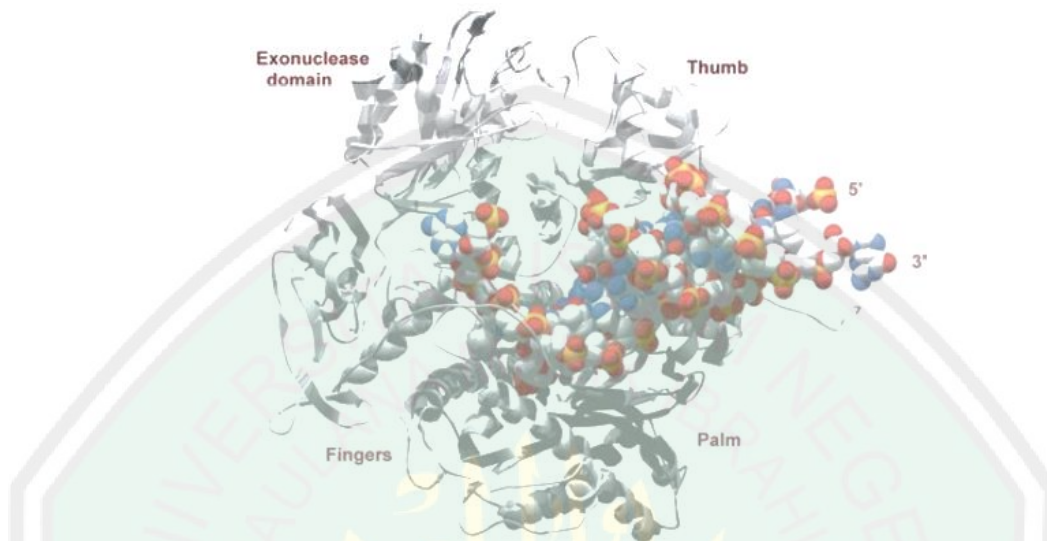
Komponen lain yang dibutuhkan yaitu dNTPs yang merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR, dNTPs bertindak sebagai penyedia basa DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. Selain itu, terdapat enzim DNA polimerase yang berperan sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA dalam tahap ekstensi DNA. Penggunaan jenis enzim DNA polimerase berkaitan erat dengan buffer PCR yang berfungsi menjaga pH medium. Buffer standar yang terdiri dari KCl, Tris-HCl dan MgCl<sub>2</sub> (Yuwono, 2006).

## 2.5 Enzim DNA Polimerase

DNA polimerase adalah enzim yang berfungsi untuk menggandakan DNA dengan menggunakan DNA templat, dNTP dan primer untuk proses ekstensi dari ujung 5' ke 3' hingga membentuk untai pasang basa baru yang tepat. DNA polimerase umumnya digunakan untuk PCR berasal mikroorganisme termofilik seperti *Thermus aquaticus* (Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Tli), dan dibagi pada beberapa famili yaitu polimerase A, B, C, X dan Y (Burgers, 2001).

Berdasarkan struktur primernya (Gambar 2.4), enzim DNA polimerase terbentuk dari lipatan protein yang menyerupai tangan kanan manusia, dan terbagi menjadi tiga daerah utama yaitu, *palm*, *finger* dan *thumb*. Pusat sisi aktif berada pada daerah *palm*, sedangkan *thumb* dan *finger* berperan membungkus DNA selama berlangsungnya proses katalitik melalui konformasi *open-closed* melalui mekanisme *induced-fit* (Palanivelu, 2013). Pada sisi aktif tersebut, enzim

berinteraksi dengan pasang basa DNA, berikatan dengan dengan templat DNA, primer dan dNTP hingga terbentuk rantai DNA baru (Kool, 2002).



Gambar 2.4 Struktur Taq DNA Polimerase (Franklin, Wang & Steitz, 2001)

Sisi aktif DNA polimerase tersusun atas beberapa asam amino yang dekat dengan gugus 3' hidroksil pada ujung primer dan diduga berikatan dengan kation divalen. Pada Taq DNA polimerase terdapat tiga asam amino penyusun sisi aktif, yaitu Asp 785[882], Glu 786[883], dan Asp 610[705]. Beberapa residu asam amino lainnya yang dekat dengan sisi aktif diantaranya Arg 573[668], Glu 655[710], Tyr 671[766], Asn 750[845], Gln 745[849], His 784[881], dan Asp 785[882]. Asam amino tersebut berjarak 2-3 Å dari kofaktor logam yang membentuk induksi ikatan dengan primer (Eom, Wang, & Steitz, 1996).

## 2.6 Kation Divalen pada Proses Replikasi DNA

Enzim DNA Polimerase membantu proses replikasi DNA melalui siklus reaksi transfer nukleotidyl. Siklus penggabungan nukleotida baru dimulai dengan

pembentukan kompleks biner enzim-DNA templat yang kemudian berubah menjadi kompleks tersier enzim-DNA-primer. Kemudian diikuti dNTP sehingga terbentuk kompleks enzim-DNA templat-primer-dNTP. Fase transisi ini kemudian diikuti oleh pembentukan ikatan phosphodiester, pelepasan pyrophosphat (PPi) dan kation divalen (Rothwell, dkk., 2013). Gugus 3' hidroksil pada ujung primer membentuk ikatan phosphodiester baru dengan 5' phosphat (Gambar 2.5). Setelah itu terjadi pelepasan grup phyrophosphat (Vashistha dan Konigsberg, 2016).

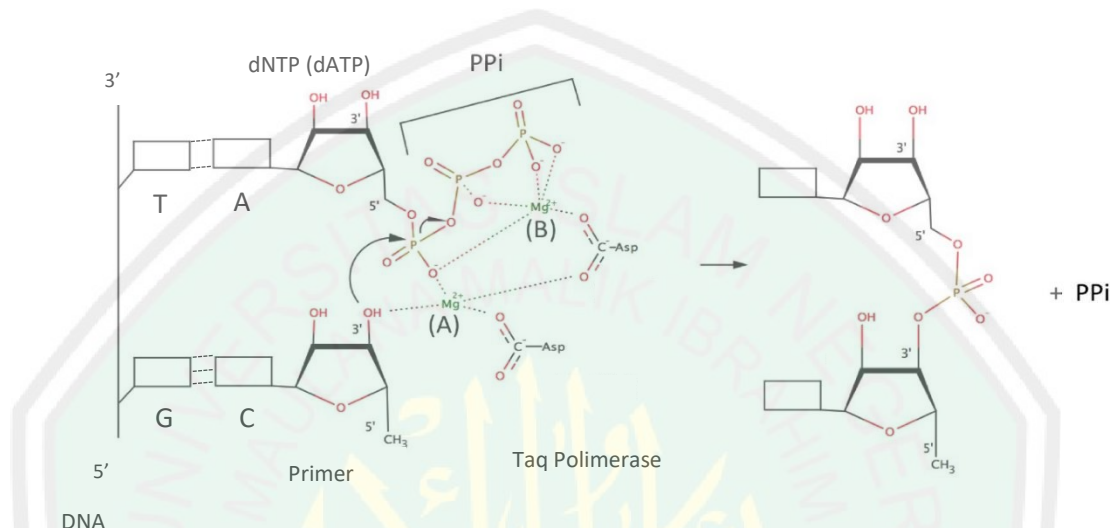
Proses replikasi DNA membutuhkan dua kation divalen dalam proses ekstensi primer. Kation pertama membantu menurunkan pKa dari ujung 3' gugus OH primer dan membentuk penta kovalen dengan oksigen pada  $\alpha$ -phosphat dari dNTP yang datang serta ujung 3'-OH dari primer. Kation ini memfasilitasi serangan nukleofilik pada  $\alpha$ -phosphat dari dNTP (Vashistha dan Konigsberg, 2016).

Kation kedua, berinteraksi dengan oksigen pada phosphat dNTP lainnya dan membantu menetralkan muatan negatif yang bertambah pada fase transisi reaksi transfer nukleotidyl dan melepaskan pyrophosphat. Variasi divalen kation dapat mempengaruhi selektivitas basa komplementer yang menempel saat ekstensi primer (Vashistha dan Konigsberg, 2016)

### 2.6.1 $Mg^{2+}$ sebagai Kation Divalen

Umumnya kation divalen yang digunakan adalah  $Mg^{2+}$ . Adanya ion  $Mg^{2+}$  yang umumnya berasal dari  $MgCl_2$ , akan meningkatkan interaksi primer dengan templat DNA yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Bufer PCR sudah mengandung senyawa  $MgCl_2$  yang diperlukan. Kondisi optimum

MgCl<sub>2</sub> dapat diketahui dengan cara memvariasi konsentrasi MgCl<sub>2</sub> dari larutan buffer standar.



Gambar 2.5 Interaksi Mg<sup>2+</sup> dalam pembentukan ikatan phosphodiester (Sesmero dan Thorpe, 2015)

Variasi MgCl<sub>2</sub> dilakukan antara 0,5 – 5 mM, dengan selisih 0,5 atau 1 mM. Konsentrasi MgCl<sub>2</sub> yang terlalu rendah akan menurunkan perolehan PCR. Konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan akumulasi produk non-target yang disebabkan oleh terjadinya *mispriming* (McPherson dan Moller, 2006).

### 2.7.2 Kation Pengganti Mg<sup>2+</sup>

Mg<sup>2+</sup> memiliki peranan penting dalam proses katalitik yang dilakukan oleh semua enzim DNA polimerase. Peran Mg<sup>2+</sup> dapat digantikan oleh beberapa kation lain seperti Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> dan Cr<sup>2+</sup> (Vashistha dan Konigsberg, 2016). Beberapa kation lainnya yang juga telah digunakan adalah Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ti<sup>2+</sup> dan Cs<sup>2+</sup> (Ralec, 2017).

Kation seperti  $Mn^{2+}$  dapat membentuk geometri oktahedral menyerupai  $Mg^{2+}$  walaupun ketika terjadi interaksi dengan primer, ikatan koordinasi yang ada terdistorsi. Kesamaan geometri ini membuat  $Mn^{2+}$  dapat membantu mengurangi jarak 3'-OH  $P\alpha$  dan memfasilitasi terbentuknya ikatan kovalen. Beberapa jenis enzim DNA polimerase yang dapat menggunakan  $Mn^{2+}$  sebagai pengganti  $Mg^{2+}$  diantaranya adalah RB69Pol (Xia, dkk., 2011), T7 Polimerase (Hori, Mark, Richardson, 1979), Klenow Fragmen (Kutch, dkk., 1989), Dpo4 (Vaisman, dkk., 2005).

Pemilihan kation selain  $Mg^{2+}$  dalam replikasi DNA berpengaruh terhadap afinitas pada *ground state* penempelan dNTP pada kompleks DNA templat-enzim-primer (Lee, Wang, dan Kingsberg, 2009). Selain itu juga dapat menyebabkan kesalahan penempelan basa pada proses ekstensi (Vaisman, dkk., 2005) dan berpengaruh terhadap aktivitas eksonuklease (Villani, dkk., 2002).

Tabel 2.3 Perbandingan karakteristik kation divalen (Vashistha dan Konigsberg, 2016)

	Metal ion						
	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$	$Co^{2+}$	$Ni^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Cd^{2+}$	$Ca^{2+}$
<b>Jari-jari ionik (Å)</b>	0,86	0,81	0,89	0,83	0,88	0,95	1,1
<b>Ikatan Koordinasi</b>	Okt <sup>a</sup>	Okt	Okt	Okt	Okt	Okt	Okt
<b>Geometri</b>	Td <sup>b</sup>	Td	Td	Td	Td	Td	PBP <sup>c</sup>
	Sq <sup>d</sup>	Sq	Sq	TBP	TBP	HBP	
	TBP <sup>e</sup>	TBP					

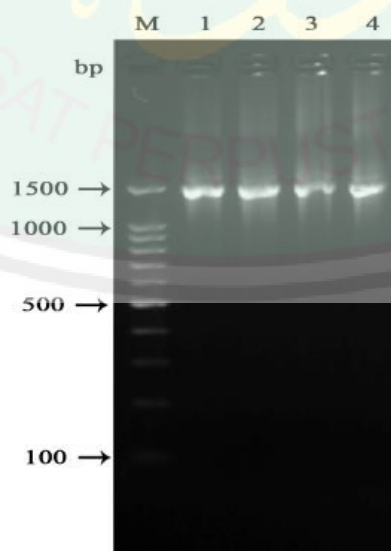
\*Keterangan: <sup>a</sup> Oktahedral, <sup>b</sup> Tetrahedral, <sup>c</sup> Pentagonal Bipiramida, <sup>d</sup> Segiempat Planar, <sup>e</sup> Trigonal Bipiramida

Pada enzim RB29 DNA polimerase, terdapat logam  $Mn^{2+}$  dan  $Co^{2+}$  yang dapat menggantikan  $Mg^{2+}$ . Efisiensi penempelan dNTP pada enzim, dengan  $Co^{2+}$  lebih tinggi dibandingkan  $Mg^{2+}$  dan  $Mn^{2+}$ . Namun,  $Co^{2+}$  dapat mengurangi spesifitas produk replikasi. Kesamaan geometri ikatan dan selisih jari-jari ionik

yang hampir sama dengan  $Mg^{2+}$  membuat  $Co^{2+}$  juga dapat menggantikan  $Mg^{2+}$  (Vashistha dan Konigsberg, 2016). Ion lain seperti  $Ca^{2+}$  dapat menggantikan  $Mg^{2+}$  dengan menggunakan enzim Dpo4 polimerase. Ralec (2017) telah membuktikan bahwa  $Ca^{2+}$  dapat menggantikan  $Mg^{2+}$  pada aktivitas enzim Taq polimerase walaupun efisiensi produk PCR hanya 50% dengan pita elektroforesis yang tidak setebal  $Mg^{2+}$ .

## 2.8 Elektroforesis Hasil Amplifikasi 16S rDNA

Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan makromolekul seperti asam nukleat atau protein berdasarkan ukuran, muatan listrik, dan sifat-sifat fisik lainnya. Prinsip kerja dari elektroforesis adalah pergerakan molekul bermuatan dalam medan listrik. Gugus-gugus fosfat yang dimiliki DNA akan membuat molekulnya menjadi bermuatan negatif sehingga pada pH netral molekul DNA tersebut akan bermigrasi ke arah elektroda positif di bawah pengaruh medan listrik.



Gambar 2.6 Elektroforesis hasil PCR sampel isolat (1) *Bacillus cereus* (2) *Bacillus subtilis* (3) *Bacillus cereus* (4) *Bacillus thuringiensis* (Patagundi, 2014)

Beberapa faktor yang mempengaruhi kecepatan molekul bergerak melewati gel, yaitu: ukuran molekul, bentuk molekul, densitas muatan, komposisi gel, dan kuat medan listrik. Identifikasi ukuran fragmen hasil elektroforesis dapat dilakukan menggunakan marka DNA, yang merupakan segmen DNA yang spesifik dan telah diketahui ukurannya. (Campbell, dkk. 2002). Genus *Bacillus* yang diamplifikasi menggunakan primer universal, menunjukkan pita pada ukuran DNA 1500 pasang basa (Gambar 2.6).



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Desember 2017 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, *laminar air flow*, bunsen, korek api, *autoclave*, *shaker*, *hot plate*, jarum ose, neraca analitik, tabung mikro, tabung reaksi PCR, mikro pipet (Bio-Rad), mikro tip, *centrifuge*, *vortex* (Maxi Mix II), seperangkat alat elektroforesis (Bio-Rad), UV transiluminator (Bio-Rad), spektrofotometer NanoDrop (Thermo Scientific) dan PCR (Bio-Rad).

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *B. cereus* yang diperoleh dari koleksi bakteri laboratorium Riset Biokimia dan Bioteknologi UIN Malang. Peremajaan bakteri yang telah ada membutuhkan *nutrient agar* (Merck), *nutrient broth* (Merck) dan pelarut akuades. Pada tahap isolasi DNA membutuhkan bahan antara lain CTAB (Merck),  $\text{NH}_4\text{COOH}$  5 M (Merck),  $\text{NaCl}$  5

M (Merck), SDS 10%, kloroform (Merck), isopropanol, Bufer TE (10 mM Tris, 10 mM EDTA) pH 8, isoamil alkohol, fenol, akuabides dan etanol 70%.

Pada tahap amplifikasi DNA bahan utama yang dibutuhkan adalah *master mix* (*Maxime PCR Premix Kit- i-Taq*) sebanyak 20  $\mu\text{L}$  yang mengandung 2,5 mM dNTPs, 2,5  $\mu\text{DNA Taq}$  Polimerase, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  dan *reaction buffer*. Selain itu terdapat penambahan bahan utama lainnya, yaitu 10 pmol/ $\mu\text{L}$  *primer forward* dan *reverse* (IDT), 500 ng/ $\mu\text{L}$  isolat DNA sampel serta akuabides.

Variasi kation divalen menggunakan  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_2$  (25 mM) sehingga diperoleh variasi konsentrasi kation dalam *master mix* 3 mM; 3,5 mM dan 4 mM. Penambahan dilakukan dengan mengurangi jumlah akuabides sehingga total volume akuabides dan kation divalen adalah 6  $\mu\text{L}$  (Lampiran 3). Pada tahap elektroforesis, bahan-bahan yang digunakan yaitu agarosa (Science Preneur), bufer TBE 1x, *marker* (Gane Ladder Fast 2), EtBr dan *loading dye buffer*.

### 3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan berikut:

1. peremajaan bakteri,
2. isolasi DNA menggunakan metode CTAB,
3. amplifikasi sikuen 16S rDNA bakteri dengan variasi jenis dan konsentrasi kation divalen
4. uji kualitatif DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa
5. uji kuantitatif DNA menggunakan nanodrop ND-1000, dan
6. analisis data.

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Peremajaan Bakteri

Media yang digunakan peremajaan bakteri *Bacillus cereus* dilakukan dengan membiakkan isolat bakteri pada media NA dan NB. Peremajaan bakteri *B. cereus* dilakukan dengan mengambil 1 ose steril dan ditanamkan pada media NA miring dengan cara gores, setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C. Sebelum proses isolasi DNA, bakteri perlu dikulturkan ke media NB. Koloni diambil dengan menggunakan jarum ose steril, divortex dan diinkubasi pada suhu ruang (Miksusanti, 2011).

#### 3.4.2 Isolasi DNA Menggunakan Metode CTAB

Kultur bakteri sebanyak 3 µL disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C dan diambil pelet. Pelet ditambahkan 567 µL bufer TE pH 8, 30 µL SDS 10% dan 3 µL NH<sub>4</sub>COOH 5 M kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya, ditambahkan dengan NaCl 5 M dan bufer CTAB 2% kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C (Wulansari, 2016).

Suspensi ditambahkan dengan kloroform : isoamil alkohol (24 : 1) sebanding dengan volume sampel (1 : 1). Kemudian hasil disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit diambil supernatan. Supernatan dipindahkan dalam tabung mikro baru dan ditambahkan phenol : kloroform : isoamil alkohol (25 : 24 : 1) dan disentrifugasi kembali. Pelet ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 0,6 kali volume sampel dan ditambahkan 50 µL etanol 70% dingin. Sampel disentrifugasi dan diresuspensi dengan 100 µL bufer TE, kemudian sampel disimpan pada suhu -20 °C. Hasil diuji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa dan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan panjang

gelombang 230 nm, 260 nm, dan 280 nm (Fitriya, dkk., 2015). DNA termasuk kategori murni bila rasio  $A_{260/280}$  bernilai 1,8-2,0, sedangkan rentang konsentrasi yang dibutuhkan untuk PCR adalah 1-500 ng (Bartlett dan Starling, 2003). Konsentrasi DNA yang tinggi memerlukan pengenceran terlebih dahulu hingga 500 ng/ $\mu$ L.

### 3.4.3 Amplifikasi Sikuen 16S rDNA

Proses amplifikasi sikuen 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan PCR. Total volume dalam PCR adalah sebesar 20  $\mu$ L, berisi PCR *reaction mixture* (DNA *polymerase*, dNTPs, *reaction buffer*, *gel loading buffer*), DNA templat 2  $\mu$ L, primer F (*forward*) dan R (*reverse*) masing-masing 1  $\mu$ L (10 pmol/ $\mu$ L), dan *distilled water* 16  $\mu$ L. Primer yang digunakan adalah 27F (5'-AGAGTTTGATCA TGGCTCAG-3') dan R 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTTACGA-3') (Asmawati, 2016).

Tahap amplifikasi dilakukan berulang sebanyak 35 siklus. Setiap siklus terdiri dari tahap denaturasi awal 94°C selama 4 menit, denaturasi 94°C selama 40 detik, penempelan 55°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 2 menit, dan *extension* akhir 72°C selama 10 menit. DNA yang teramplifikasi diharapkan memiliki panjang basa 1500 bp (Li, dkk., 2015).

Prosedur kerja optimasi konsentrasi  $MgCl_2$  dilakukan dengan melakukan variasi konsentrasi  $MgCl_2$  yang sebelumnya telah ada dalam bufer PCR. Penambahan  $MgCl_2$  dilakukan hingga mendapatkan variasi konsentrasi yang digunakan, yaitu 3,0; 3,5 dan 4,0 mM dengan selisih kenaikan konsentrasi sebesar 0,5 mM (Bartlett dan Stirling, 2003). Penambahan  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $CrCl_2$  dilakukan

sesuai dengan prosedur penambahan  $MgCl_2$  dengan konsentrasi larutan baku 25 mM.

#### 3.4.4 Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA

Pembuatan gel agarosa 1% dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,3 gr bubuk agarosa dan dilarutkan dalam 30 mL bufer TBE 1X. Agarosa kemudian dipanaskan hingga larut dan dituangkan dalam cetakan gel, agarosa hangat kemudian ditambahkan dengan 1 mL EtBr. Sisir untuk membuat sumuran dipasang dan dinginkan gel sampai mengeras (Fatchiyah, 2011).

Setelah menjadi gel, tuangkan bufer TAE 1X dalam *tank* sampai gel terendam. Sampel hasil isolasi dimasukkan dalam sumuran sebanyak 3  $\mu$ L dan *loading dye* sebanyak 1  $\mu$ L (3:1). Hubungkan elektroda dengan *power supply* dan atur voltase 65 Volt selama 70 menit. Setelah itu gel hasil elektroforesis pindahkan pada UV-transluminator kemudian amati hasilnya. Keberhasilan isolasi DNA ditandai dengan munculnya pita yang tebal pada gel elektroforesis (Fatchiyah, 2011).

Analisis secara kuantitatif dilakukan dengan uji konsentrasi DNA menggunakan NanoDrop Spektrofotometer dilakukan pada sampel hasil isolasi DNA dan hasil PCR. Sampel dipipet sebanyak 1  $\mu$ l melalui kabel fiber optik. Uji absorbansi sampel DNA maksimum dilakukan pada panjang gelombang 230, 260, dan 280 nm (Clark dan Christopher, 2001).

#### 3.4.5 Analisis Data

Elektroferogram isolat DNA bakteri dan produk PCR dengan variasi jenis dan konsentrasi kation divalen dianalisis secara kualitatif. Pita elektroforesis

dibandingkan dengan DNA ladder sebagai marker. Konsentrasi isolat diukur menggunakan spektrofotometer (Savira, 2012).

Hasil sekuensing berupa urutan basa dianalisis menggunakan beberapa program komputasi, yaitu *DNA Baser*, Bioedit, BLAST-n, Mega 6, *SequenceScanner*, dan *FinchTV* (Wulansari, 2016). Kemurnian dan intensitas masing-masing sekuen divisualisasikan menggunakan FinchTV. Sekuen *forward* dan *reverse* kemudian di*contig* terlebih dahulu menggunakan DNA Baser untuk mendapat sekuen yang memiliki intensitas tinggi dan saling berkomplemen. Konfirmasi urutan basa hasil *contig* dengan data Genbank menggunakan BLAST-n (*Basic Local Alignment and Search Tool for Nucleotida*) dengan mencermati *max score* dan *identity* berdasarkan urutan 16S rDNA. Pensejajaran sikuen menggunakan Bioedit kemudian dilanjutkan dengan konstruksi pohon filogenetik menggunakan Mega 6 yang dapat menunjukkan tingkat kekerabatan sampel dengan nenek moyang serta spesies lainnya.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

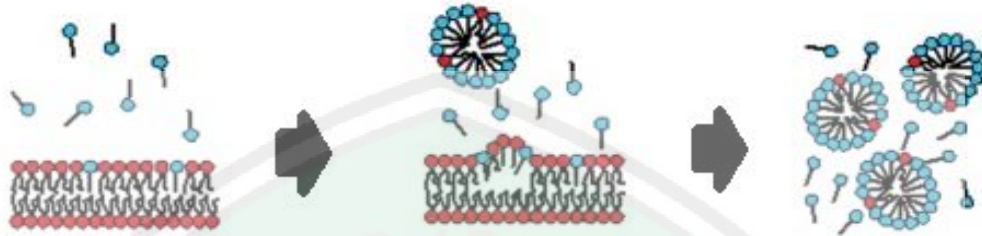
Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap amplifikasi DNA adalah keberadaan kation divalen (KD)  $Mg^{2+}$ . Pada penelitian sebelumnya, isolat DNA *Bacillus cereus* dapat diamplifikasi melalui PCR yang menggunakan *mastermix* kit dengan konsentrasi kation divalen  $Mg^{2+}$  sebesar 2,5 mM. Optimasi KD sebagai kofaktor enzim dapat dilakukan dengan penambahan ion logam lainnya seperti  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  dan  $Cr^{2+}$  dengan rentang konsentrasi 1-4 mM.

#### 4.1 Isolasi DNA Bakteri

Proses isolasi DNA melalui metode kimiawi dengan menggunakan surfaktan, dilakukan dalam 3 tahap, yaitu lisis sel, ekstraksi DNA dan pemurnian DNA yang diperoleh. Jenis surfaktan yang digunakan ialah CTAB (*Cetyl trimethyl ammonium bromide*) dan SDS (*Sodium dodecyl sulphate*). Pada tahap lisis sel, SDS sebagai surfaktan anionik akan menempel pada sisi hidrofobik dinding sel. SDS akan berikatan dengan protein dan lipoprotein sehingga terbentuk *micelle* berupa kompleks SDS-poli-peptida yang memisahkan diri dari dinding sel (Moore, dkk. 2004). Pembentukan *micelle* tersebut menyebabkan adanya lubang atau pori dan mengakibatkan dinding sel pecah (Gambar 4.1).

Proses lisis oleh SDS dalam kondisi pH 8-9 dibantu oleh buffer Tris-EDTA (TE). Stabilitas dinding sel bakteri juga diganggu oleh keberadaan Tris-EDTA sebagai bufer lisis yang juga berperan meningkatkan hidrofobisitas dinding sel

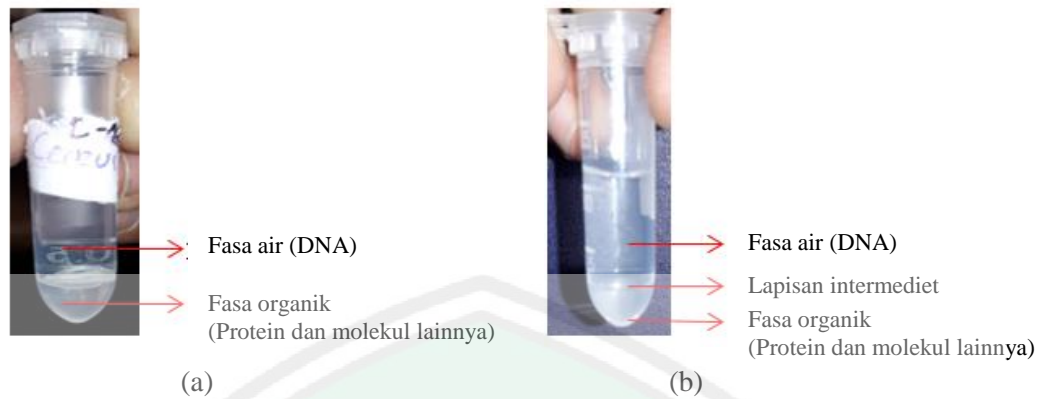
sehingga dapat mempermudah SDS melisis dinding sel bakteri (Alakomi, dkk., 2006).



**Gambar 4.1** Penempelan SDS pada lapisan lipid protein membran plasma sel dan pembentukan *micelle* (Lichtenberg, dkk., 2013)

Setelah terjadi lisis, DNA dipisahkan dengan kontaminan lainnya. Amonium asetat yang berperan mempresipitasi protein (Aidar, 2007), membantu CTAB sebagai surfaktan yang dapat mengikat protein, lipid dan lipopolisakarida melalui sisi hidrofobiknya dan membentuk *micelle* (Moore, dkk., 2004). Proses pemisahan juga menggunakan campuran kloroform (C) dan isoamil alkohol (I) dengan perbandingan 24:1. Penambahan C:I menyebabkan terbentuknya dua fasa yaitu fasa air yang bersifat polar di bagian atas dan organik yang bersifat nonpolar di bagian bawah (Gambar 4.2 (a)). Sisa protein, lipid, karbohidrat dan bagian sel yang tak diinginkan berada pada fasa organik, sedangkan DNA yang cenderung polar terpisah ke fasa air.

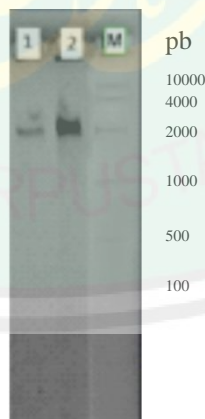
Pemisahan DNA dari molekul lainnya dilanjutkan dengan menggunakan campuran fenol, kloroform dan isoamil alkohol dengan perbandingan 25:24:1. Pencampuran tersebut menyebabkan terbentuknya dua fasa, yaitu fasa air dan organik (Gambar 4.2 (b)). Kedua fasa dipisahkan oleh sebuah lapisan intermediet yang terbentuk dari protein terpresipitasi.



Gambar 4.2 Pemurnian DNA menggunakan (a) kloroform dan isoamil alkohol (24:1) serta (b) fenol, kloroform dan isoamil alkohol (25:24:1)

#### 4.2 Analisis Isolat DNA

Keberhasilan hasil isolasi secara kualitatif dapat dilihat dari munculnya pita pada gel elektroforesis di bawah sinar ultraviolet. Elektroferogram isolat DNA menggunakan metode CTAB 2% pada Gambar 4.3 lajur 1 dan 2 menunjukkan hasil visualisasi pita tunggal dan tidak *smear*. Berdasarkan hasil analisis kualitatif dapat diketahui bahwa metode CTAB 2% tersebut berhasil digunakan untuk isolasi DNA.



Gambar 4.3 Elektroferogram DNA hasil isolasi. Lajur 1 dan 2 isolat DNA *B.cereus* menggunakan metode CTAB 2%. M merupakan marker DNA 1 kb.

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi dari DNA. Kemurnian dan konsentrasi DNA dapat diketahui pada panjang gelombang

260/280 nm dengan nilai kemurnian berada pada 1,8-2,0. Hasil uji kuantitatif (Lampiran 4) menunjukkan bahwa isolat DNA bakteri masih dalam kategori murni dengan rasio  $A_{260/280}$  sebesar 2,09 dengan konsentrasi 2453,2 ng/ $\mu$ L.

#### 4.3 Variasi Jenis dan Konsentrasi Kation Divalen pada Amplifikasi Sikuen 16S rDNA Bakteri

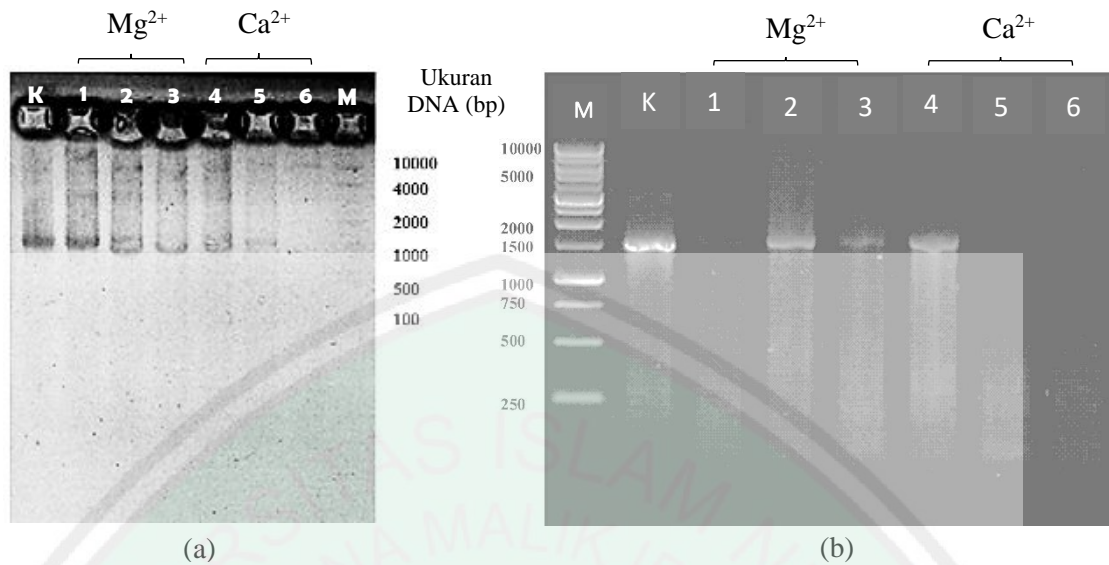
Amplifikasi sikuen 16S rDNA menggunakan teknik PCR bertujuan untuk melipatgandakan sikuen DNA sehingga dapat digunakan untuk identifikasi spesies *B. cereus*. Proses amplifikasi yang melibatkan tahap denaturasi, penempelan, dan ekstensi dioptimalisasi melalui variasi jenis dan konsentrasi kation divalen (KD). Keberadaan KD seperti  $Mg^{2+}$  dalam bufer PCR berperan sebagai logam kofaktor yang menstimulasi kerja enzim DNA polimerase pada proses ekstensi untai ganda DNA yang baru. Selain logam  $Mg^{2+}$ , beberapa logam lain juga dapat digunakan sebagai kofaktor enzim. Hasil amplifikasi yang optimal diketahui berdasarkan pita yang muncul pada proses elektroforesis, konsentrasi hasil PCR dan analisis hasil sekuensing.

Pemilihan logam didasarkan pada uji awal menggunakan KD yaitu  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ . Pada Gambar 4.4, lajur 2, 3, 4 ( $Mg^{2+}$ ) dan lajur 5, 6, 7 ( $Ca^{2+}$ ) memperlihatkan adanya *smear*. Munculnya *smear* menunjukkan adanya DNA non-target yang terbentuk (Wahyudi, 2007). Penambahan  $Co^{2+}$  pada lajur 8, 9, dan 10 tidak menunjukkan tanda adanya aktivitas amplifikasi. Pita pada lajur 11, 12 dan 13 memperlihatkan bahwa penambahan  $Cr^{2+}$  menghasilkan pita yang tidak konsisten. Pada lajur 11 tidak menunjukkan tanda adanya DNA yang teramplifikasi, sedangkan lajur 12 dan 13 muncul *smear*.



Gambar 4.4 Elektroferogram perbandingan hasil PCR dengan variasi kation divalen (KD) dan total konsentrasi kation divalen (TKKD). M merupakan marker. Lajur 1 PCR tanpa KD tambahan (TKKD 2,5 mM), Lajur 2 penambahan  $Mg^{2+}$  0,5 mM (TKKD 3 mM), Lajur 3 penambahan  $Mg^{2+}$  1 mM (TKKD 3,5 mM), Lajur 4 penambahan  $Mg^{2+}$  1,5 mM (TKKD 4 mM), Lajur 5 penambahan  $Ca^{2+}$  0,5 mM (TKKD 3 mM), Lajur 6 penambahan  $Ca^{2+}$  1 mM (TKKD 3,5 mM) Lajur 7 penambahan  $Ca^{2+}$  1,5 mM (TKKD 4 mM), Lajur 8 penambahan  $Co^{2+}$  0,5 mM (TKKD 3 mM), Lajur 9 penambahan  $Co^{2+}$  1 mM (TKKD 3,5 mM), Lajur 10 penambahan  $Co^{2+}$  1,5 mM (TKKD 4 mM), Lajur 11 penambahan  $Cr^{2+}$  0,5 mM (TKKD 3 mM), Lajur 12 penambahan  $Cr^{2+}$  1 mM (TKKD 3,5 mM) Lajur 13 penambahan  $Cr^{2+}$  1,5 mM (TKKD 4 mM)

Banyaknya *smear* yang muncul menunjukkan bahwa DNA yang teramplifikasi tidak spesifik pada panjang basa tertentu (Verkuil, dkk., 2008). Adanya pita tunggal menandakan DNA telah teramplifikasi spesifik. Berdasarkan hasil uji awal tersebut maka dalam penelitian ini menggunakan variasi kation divalen  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  dengan variasi jumlah kation yang berada dalam *master mix*. Total konsentrasi kation divalen (TKKD) menggunakan variasi konsentrasi 3,0 ; 3,5 dan 4 mM.



Gambar 4.5 Elektroferogram PCR hasil uji lanjutan di (a) Lab UIN Malang (b) Lab 1<sup>st</sup> Gene. M merupakan marker. K merupakan kontrol positif, PCR tanpa KD tambahan (TKKD 2,5 mM), Lajur 1 penambahan  $Mg^{2+}$  0,5 mM (TKKD 3 mM), Lajur 2 penambahan  $Mg^{2+}$  1 mM (TKKD 3,5 mM), Lajur 3 penambahan  $Mg^{2+}$  1,5 mM (TKKD 4 mM), Lajur 4 penambahan  $Ca^{2+}$  0,5 mM (TKKD 3 mM), Lajur 5 penambahan  $Ca^{2+}$  1 mM (TKKD 3,5 mM) Lajur 6 penambahan  $Ca^{2+}$  1,5 mM (TKKD 4 mM)

Uji lanjutan menggunakan  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  menunjukkan adanya pita tunggal di antara 2000 dan 1000 bp (Gambar 4.5 (a)). Pita terlihat semakin tipis seiring dengan bertambahnya total konsentrasi kation divalen. Lajur 1-3 menunjukkan pengaruh penambahan  $Mg^{2+}$  terhadap banyaknya sampel yang teramplifikasi. Pada lajur 4-6 terlihat bahwa penambahan  $Ca^{2+}$  justru menghasilkan pita yang lebih tipis dibandingkan penambahan  $Mg^{2+}$ .

Hasil uji lanjutan yang dikonfirmasi kembali sebelum sekuensing menunjukkan bahwa hanya pada lajur K, 2, 4 yang menunjukkan adanya pita tunggal yang tebal. Pada Gambar 4.5 (b) juga terlihat adanya pita tunggal yang tipis pada lajur 3, sedangkan lajur 1, 5 dan 6 hanya memperlihatkan *smear*. Berdasarkan

hasil tersebut sampel pada lajur K (BcK), 2 (BcMg) dan 4 (BcCa) dipilih untuk proses sekuensing DNA.

Tabel 4.2 Uji konsentrasi DNA hasil PCR

Kation Divalen (KD)	Sampel		Rerata Konsentrasi DNA (ng/ $\mu$ L)
	Total Konsentrasi Divalen (mM)	Kation Divalen (mM)	
Kontrol (Mg <sup>2+</sup> )	2,5		702,46 $\pm$ 32,21
	3,0		734,18 $\pm$ 19,05
	3,5		790,89 $\pm$ 52,04
	4,0		777,27 $\pm$ 55,73
Mg <sup>2+</sup>	3,0		804,58 $\pm$ 19,25
	3,5		849,98 $\pm$ 18,16
	4,0		944,06 $\pm$ 47,68
Ca <sup>2+</sup>	3,0		804,58 $\pm$ 19,25
	3,5		849,98 $\pm$ 18,16
	4,0		944,06 $\pm$ 47,68

Pengaruh variasi dan penambahan kation divalen juga diketahui berdasarkan konsentrasi DNA hasil PCR. Pada Tabel 4.2 memperlihatkan terjadinya peningkatan konsentrasi dengan adanya penambahan KD. Konsentrasi terbaik penambahan KD Mg<sup>2+</sup> pada TKKD 3,5 mM yakni 790,89 ng/ $\mu$ L, sedangkan pada penambahan KD Ca<sup>2+</sup> TKKD 4,0 mM memperoleh konsentrasi 944,06 ng/ $\mu$ L.

Konsentrasi DNA hasil PCR yang meningkat seiring bertambahnya konsentrasi kation divalen berbanding terbalik dengan makin tipisnya pita hasil elektroforesis pada Gambar 4.5 (a). Penambahan kation Ca<sup>2+</sup> yang meningkatkan konsentrasi DNA hingga 800-900 ng/ $\mu$ L tidak sesuai dengan hasil elektroforesis dimana pita yang muncul lebih tipis daripada pita Mg<sup>2+</sup>. Konsentrasi produk penambahan Mg<sup>2+</sup> hanya pada rentang 700-790 ng/ $\mu$ L. Perbedaan tersebut dimungkinkan karena besarnya konsentrasi yang dihitung ialah konsentrasi DNA keseluruhan, termasuk *smear* yang muncul pada pita. Oleh karena itu, penentuan

urutan DNA pada tahap sekuensing menggunakan hasil uji elektroforesis acuan pemilihan sampel.

#### 4.4 Penentuan Urutan DNA

Sekuensing DNA merupakan proses penentuan urutan hasil amplifikasi secara terminasi dengan metode sanger. Hasil PCR digunakan sebagai templat dengan amplifikasi yang dilakukan secara searah, menggunakan masing-masing primer *forward* dan *reverse* secara terpisah. Hasil berupa *partial sequence* kemudian di-*contig* untuk mendapatkan urutan DNA yang *continuous* menggunakan aplikasi DNA Baser V.5.8.0 (Gambar 4.6).

##### >BcK (1432 basa)

```
TGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGAT
AACTCCGGAAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCC
GGCTGCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCG
GGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGAACGGTACCTAAACCAGAAAGGCCACAGGCTAACT
ACGGTGCCAGCAGCCGACGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCACCGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATATGGAGAACACCAGTGGCGAAGGGGACTTCTGGTCTGTAACGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGCTTGCATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTCCGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTGGCATCATTAAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAA
GACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCCTGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACC
TTTTGGAGCCAGCCGCTAAGG
```

##### >BcMg (1316 basa)

```
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAATCCGGGAAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTGAA
CCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTACCAAGG
CAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCATTTCCGGTCTGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGT
TGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC
GGAATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACCGCTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAACTGGGAGA
CTTGAAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTC
TGTAACGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGTA
GGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGCTTGCATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTT
CTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA
TCTTAGTGTCCATCATTAAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTACAAACCGGAGGAAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGACCTGGGTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAACCGTCTCAGTTCGGAT
TGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGTACCTTGTACACACC
```

**>BcCa1 (530 basa)**

GGATCGCAGCTATAATGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC  
ATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATGAAAGCGGCTTCGGGTGTCAC  
TATGGATGGACCCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTGTACGGGAGCAACGGCCGCTGAGTG  
ATGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCA  
CGGCTAACTACGTGTACGACGGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGGACTG

**>BcCa2 (757 basa)**

GACTTCTGTCACTTAGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTACGGGCGGTGTGTACAAAGG  
CCGGGAACGTATTACCGCGGATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGCGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTACGAA  
CGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGCAGCTCTTGTACCGTCCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCAGGTGATAAGGGGCGATGATG  
ATTTGACGTATCCCACTTCTCGGTTTGTACCGGAGTCACTTAGAGTGCCTAACTAATGATGGCACTAAGATCAAGGGTTGCGCT  
CGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTA  
GGTTTTTCAGAGGATGCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGTCAATTC  
CTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCAAGCGGAGTGTAAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGCGGAAACCCCTTAACACTTAGCA  
CTCATCGTTTACAGCGTGGACTACCAAGTTATCTAATCCTGTTTTGCTCCCAAGCGTTTTTCGCGCCGTCAGTGGTCACTTAGATAAACCAGAATA  
GTCGC

Gambar 4.6 Sikuen hasil *contig* kontrol (BcK, TKKD 2,5 mM), Mg<sup>2+</sup> (BcMg, TKKD 3,5 mM), sikuen *forward* dan *reverse* Ca<sup>2+</sup> (BcCa1 dan BcCa2, TKKD 3 mM).

Variasi kation divalen dan total konsentrasi yang berbeda menyebabkan panjang basa sikuen *forward* dan *reverse* hasil sikuensing juga berbeda (Lampiran 4). Peningkatan konsentrasi Mg<sup>2+</sup> pada sampel BcMg menghasilkan sikuen yang lebih pendek dari sampel BcK yang memiliki konsentrasi Mg<sup>2+</sup> lebih rendah. Penambahan Ca juga menghasilkan sikuen *forward* (BcCa1) dan *reverse* (BcCa2) yang lebih pendek dan tidak saling berkomplementer sehingga tidak dapat dilakukan *contig*. Dalam penelitian Ralec (2017), penggunaan Mg<sup>2+</sup> menghasilkan panjang sikuen yang lebih panjang daripada Ca<sup>2+</sup>.

Perubahan konsentrasi Mg<sup>2+</sup> yang berpengaruh terhadap panjang sikuen, dipengaruhi oleh ketidakcocokan penempelan nukleotida komplementer saat amplifikasi DNA. Jumlah kation yang hadir, dapat mempengaruhi panjang ikatan yang terbentuk antara kation divalen, sisi aktif enzim DNA polimerase dan ujung basa cetakan DNA. Jarak ikatan maksimal yang terbentuk antara kation Mg<sup>2+</sup> ialah sekitar 2 Å. Namun dalam kondisi kekurangan Mg<sup>2+</sup> dan hanya ada satu Mg<sup>2+</sup> maka

jarak ikatan menjadi 3-3,5 Å, sehingga menyebabkan bergesernya primer dari sisi aktif enzim DNA polimerase. Selain banyaknya kation divalen yang ada, afinitas dari dNTP juga mempengaruhi kecocokan basa yang terikat dimana ketidakcocokan terjadi karena afinitas nukleotida tersebut lebih rendah dari afinitas nukleotida yang seharusnya (Beard, dkk., 2004).

#### 4.5 Analisis Sikuen 16S rDNA

Sikuen gen 16S rRNA dari kedua sampel bakteri dianalisis dengan program BLASTn. Perbandingan urutan DNA diperlukan untuk melihat kemiripan di antara sikuen DNA bakteri yang diperoleh dengan sikuen bakteri lain yang tersimpan dalam *genbank*. Berdasarkan nilai *Max Score* dan *Identity* tertinggi dari beberapa spesies, diketahui kemungkinan terbesar identitas sampel produk PCR variasi KD dan TKKD.

Tabel 4.3 Hasil analisis menggunakan BLASTn sampel BcK

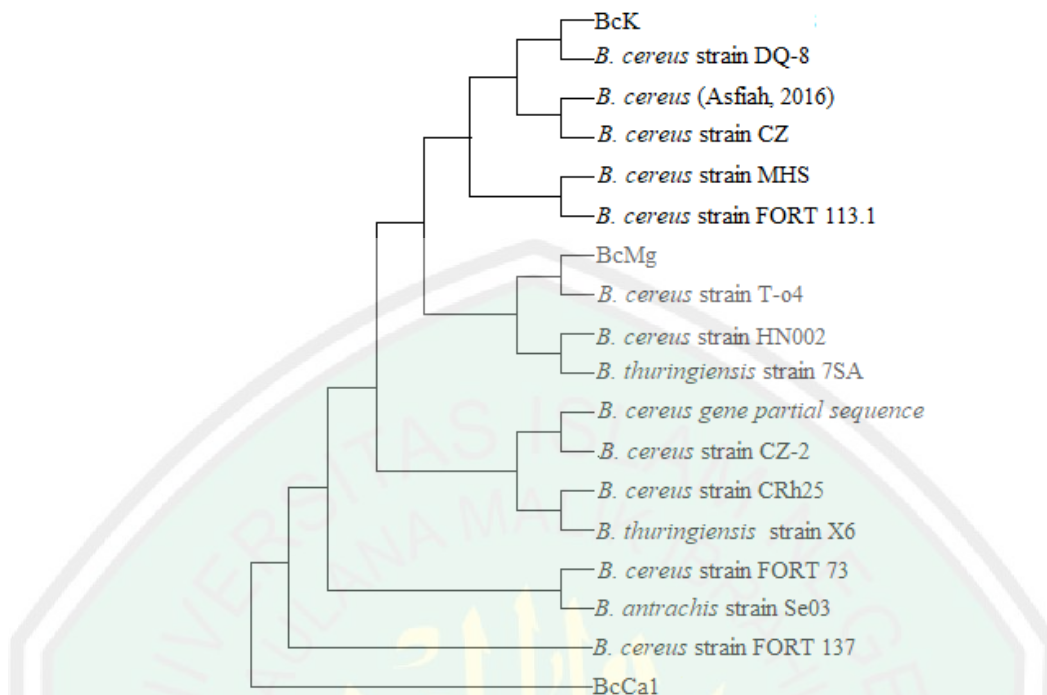
Identity	Max Score	Jumlah Similaritas Jenis spesies				Total
		B.cereus	B. thuringiensis	B. antrachis	Bacillus sp. (lainnya)	
99%	2599	9	-	1	5	15
99%	2597	1	-	-	2	3
99%	2595	37	19	-	23	79
99%	2591	1	1	-	1	3
Total Jumlah Similaritas Spesies		48	20	1	31	100

Tabel 4.4 Hasil analisis menggunakan BLASTn sampel BcMg

Identity	Max Score	Jumlah Similaritas Jenis spesies				Total
		B.cereus	B. thuringiensis	B. antrachis	Bacillus sp. (lainnya)	
99%	2407	2	-	-	-	2
99%	2405	63	10	-	19	92
99%	2401	2	1	-	2	5
99%	2398	-	-	-	1	1
Total Jumlah Similaritas Spesies		67	11	-	22	100

Variasi kation divalen pada proses PCR pada sampel DNA yang sama memperlihatkan perbedaan analisis BLASTn. Sampel BcK, BcMg, BcCa1 dan BcCa2 memiliki *identity* yang sama yaitu 99%. Sampel BcK dengan nilai *max score* 2599-2591 lebih tinggi daripada BcMg yang memiliki *max score* 2407-2398. Hasil BLAST-n BcCa1 dan BcCa2 (Lampiran 8) memiliki *max score* yang lebih rendah lagi, yaitu masing-masing pada rentang 945-942 dan 1327-1310. Pengelompokan berdasarkan strain spesies yang muncul pada BLAST-n, menunjukkan kemiripan sampel BcK dan BcMg didominasi oleh *B. cereus*, *B. thuringiensis* dan spesies *Bacillus* lainnya. Pada sampel BcCa1 dan BcCa2, semuanya merupakan strain spesies *B. cereus*.

Urutan basa sampel tersebut kemudian disejajarkan dengan 16 strain yang memiliki *max score* dan *identity* paling baik serta terpublikasi. Urutan basa sampel BcK dan BcMg terlihat memiliki kesamaan urutan basa sama dengan strain hasil BLAST-n (Lampiran 10). Pada sampel BcK yang lebih panjang dan BcCa1 dapat menunjukkan teramplifikasinya daerah variabel 1 (V1) dengan urutan basa TTAAGAGCTTGCTCTTAT yang pada sampel BcMg tidak teramplifikasi. Menurut (Giffel, dkk., 1996), keberadaan V1 merupakan salah satu indikator yang dapat digunakan untuk membedakan *B. cereus* dengan spesies lainnya. Pada *B. thuringiensis* yang merupakan spesies terdekat dengan *B. cereus* memiliki urutan basa V1 TTAAGAGCTTGCTCTCAA dimana tiga basa diakhir urutan berbeda dengan *B. cereus*.



Gambar 4.7 Pohon filogenetik dari sekuen gen 16S rRNA dari isolat BcK, BcMg, BcCa1. Metode yang digunakan adalah *Neighbor-Joining* dengan 1000 *bootstrap replicates*.

Selain menggunakan BLAST-n, pendekatan komputasi melalui pohon filogenetik juga dapat digunakan untuk mengetahui kekerabatan suatu mikroorganisme. Konstruksi pohon filogenetik diperoleh dari hasil BLAST-n dan sikuen parsial *strain Bacillus sp.* terpublikasi di NCBI yang dibandingkan dengan hasil *contig* BcK, BcMg. Pada sampel BcCa, dipilih sikuen BcCa1 yang merupakan sikuen *forward* karena dianggap representatif daripada sikuen *reverse* yang harus melalui proses *reverse complement* terlebih dahulu. Pohon filogenetik pada Gambar 4.7 menunjukkan sampel BcK memiliki kedekatan dengan *B. cereus* strain DQ-8. Sampel BcMg yang dekat dengan *B. cereus* strain T-o4. Sampel BcK memiliki kedekatan dengan hasil penelitian Asfiah (2016) karena terletak dalam percabangan yang sama, dibandingkan dengan sampel BcMg pada cabang berbeda. Sampel

BcCa1 terletak pada cabang berbeda. Hal ini karena pendeknya urutan basa sikuen BcCa1 sehingga kedekatan spesiesnya belum bisa ditentukan. Hasil identifikasi genotip yang berbeda dengan penelitian ini memperlihatkan adanya pengaruh panjang urutan basa hasil sekuensing terhadap penentuan spesies bakteri *B.cereus*.

#### 4.6 Optimasi Amplifikasi DNA dalam Perspektif Islam

Keanekaragaman hayati merupakan salah satu bukti kebesaran Allah Swt. Setiap jenis makhluk hidup baik yang berukuran besar hingga yang hanya dapat dilihat dengan bantuan alat memiliki ciri khas masing-masing. Allah Swt tidak hanya menciptakan makhluknya dengan beragam bentuk namun ukuran dan fungsi sehingga menghasilkan keselarasan alam semesta. Allah SWT berfirman dalam surah Al-Furqon (25): 2.

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ وَّمِمَّ يَتَّخِذُ وِلَدًا وَّمِمَّ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِى الْمُلْكِ وَاَخْلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَعَدَّرَهُ تَقْدِيْرًا ﴿٢﴾

*“Yang memiliki kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan Dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat” (QS. Al-Furqon: Ayat 2)*

Firman Allah tersebut menegaskan bahwa Dialah pemilik kerajaan langit dan bumi, dan tidak mempunyai anak serta tidak ada sekutu bagi-Nya. Shihab (2002) menjelaskan dalam Tafsir Al-Misbah, bahwa seluruh ciptaan Allah tersebut telah diciptakan dengan ukuran dan aturan yang sangat cermat. Masing-masing ciptaan-Nya terdapat rahasia-rahasia yang menjamin keberlangsungan alam semesta secara teratur. Menurut Sani (2015), keteraturan alam semesta dapat ditemukan pada ukuran yang besar maupun kecil. Adanya tata surya dengan ukuran

matahari, bumi dan planet lainya yang memiliki garis edar mengelilingi matahari dengan gravitasi masing-masing sehingga tidak jatuh ke bumi. Struktur, susunan dan fungsi hewan juga diciptakan dengan sangat sesuai. Semut berukuran kecil dan bentuknya yang efisien sehingga membantu membersihkan sisa remah makanan dan bangkai. Sedangkan burung juga memiliki ukuran ideal sehingga dapat menyebarkan biji dari buah-buahan yang dimakannya. Setiap makhluk hidup memiliki ukuran dan bentuk yang sesuai dengan fungsinya, bahkan unsur dan atom sebagai penyusun materi.

Begitu pula bakteri yang memiliki keberagaman jenis dan manfaat yang tersimpan dalam asam deoksiribonukleat (DNA) tiap makhluk hidup. Perbedaan anatomi dan fisiologis antara satu makhluk hidup dengan makhluk hidup lainnya didasarkan atas perbedaan susunan basa-basa nitrogen pada nukleotida penyusun DNA. Keteraturan alam semesta juga terlihat dari untai basa penyusun DNA yang berpasang-pasangan. Allah SWT berfirman dalam surah Yasin (36): 36 sebagai berikut:

سُبْحٰنَ الَّذِيْ خَلَقَ الْاَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْبِتُ الْاَرْضُ وَمِنْ اَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُوْنَ  
﴿٣٦﴾

*“Maha Suci (Allah) yang telah menciptakan pasangan-pasangan semuanya baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka maupun dari apa yang tidak mereka ketahui” (QS. Yasin: ayat 36).*

Hamka dalam Tafsir Al Azhar (1973) menyebutkan bahwa selalu ada awal ada akhir dan banyak lagi yang diciptakan oleh Allah SWT dalam bentuk berpasang-pasangan. Segala sesuatu yang diciptakan berpasangan tidak hanya yang terlihat secara fisik oleh mata, namun juga yang tak kasat mata seperti

mahluk ghaib. Bakteri termasuk dalam ciptaan-Nya yang sulit dilihat tanpa menggunakan alat bantu. Terdapat bakteri gram positif dan negatif. Begitu pula susunan DNA yang selalu memiliki susunan basa Adenin (A) dengan basa Timin (T) dan basa C (Sitosin) berpasangan dengan basa G (Guanin). Adanya pasangan basa menyebabkan DNA stabil dengan strukturnya yaitu *double helix*. Pada akhir ayat (QS. Yasin: 36) disebutkan bahwa “Dan dari apa yang mereka sendiri tidak tahu”. Hal ini ditafsirkan Hamka bahwa banyak hal yang dirahasiakan oleh Allah dan Dia akan membukakan rahasia tersebut kepada manusia yang terbuka pikiran dan akalnya.

Pada proses penggandaan DNA juga memiliki keteraturan tersendiri. Salah satunya ialah jenis dan jumlah kation divalen yang dibutuhkan enzim DNA polimerase dalam proses ekstensi untai DNA baru melalui metode PCR. Beragam jenis kation seperti  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  dan kation lainnya memiliki potensi tersendiri untuk membantu pemilihan dan penempelan basa nitrogen yang tepat dalam proses aktivasi enzim DNA polimerase. Dalam penelitian ini, adanya penambahan jenis kation lain dalam larutan reaksi PCR yang telah mengandung  $Mg^{2+}$  dengan variasi konsentrasi berbeda menghasilkan panjang basa sikuen yang berbeda. Penambahan kation yang juga mempengaruhi tebalnya pita elektroforesis dan intensitas pita kromatogram tersebut selaras dengan firman Allah pada surat Al-Furqon (25): 2 bahwa keteraturan alam semesta telah diciptakan hingga pada ukuran terkecil termasuk banyak dan jenis kation dalam sebuah reaksi PCR.

## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kation divalen yang efektif dalam amplifikasi sikuen 16S rDNA *Bacillus cereus* adalah  $Mg^{2+}$  2,5 mM yang menghasilkan sikuen 1432 bp. Konsentrasi  $Mg^{2+}$  3,0 mM menghasilkan sikuen yang lebih pendek yaitu 1316 bp. Variasi penambahan jenis kation lain dapat dilakukan dengan penambahan  $Ca^{2+}$  yang menghasilkan sikuen (*forward*) 530 dan (*reverse*) 757 basa. Hasil identifikasi molekuler dengan variasi jenis dan konsentrasi kation berdasarkan sikuen gen 16S rRNA yang dianalisis menggunakan BLAST-n dan pohon filogenetik mengindikasikan BcK ( $Mg^{2+}$  2,5 mM) sebagai *B. cereus* strain DQ-8 dan BcMg ( $Mg^{2+}$  3 mM) sebagai *B. cereus* strain T-o4. Sampel BcCa yang diwakili oleh BcCa1 (sikuen *forward*) berada pada cabang pohon filogenetik yang berbeda meskipun hasil BLAST-n menunjukkan kedekatan dengan strain *B. cereus*.

### 5.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya dapat menggunakan metode pemodelan kimia komputasi sehingga dapat mengetahui interaksi kation divalen pada proses amplifikasi DNA
2. Melakukan analisis variable region lainnya (V2-V9) untuk mengetahui pengaruh kation divalen terhadap spesifitas hasil identifikasi molekuler.

Melakukan penelitian komprehensif mengenai kation terbaik yang digunakan pada masing-masing jenis enzim DNA Polimerase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achuthan V. dan De Stefano J. J. 2015. Alternative Divalent Cations ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , and  $Mn^{2+}$ ) are not Mutagenic at Conditions Optimal for HIV-1 Reverse Transcriptase Activity. *BMC Biochem*, Vol. 16(1):12.
- Aidar, M., Line, S. R. P. 2007. A Simple and Cost-Effective Protocol for DNA Isolation from Buccal Epithelial Cells. *Braz Dent*, Vol. 18(2): 148-152
- Al Jassim, R. A. M., Scoot, P. T., Trebbin, A. L., Trott, D., dan . Pollitt, C. C. 2005. The Genetic Diversity of Lactic Acid Bacteria in The Equine Gastrointestinal Tract. *FEMS Microbiology Letters*.
- Al-Maraghi, A. M. (1989). *Terjemah tafsir Al-Maraghi*. Semarang: CV. Toha Putra.
- Asmawati, A. 2016. Identifikasi Genotip *Bacillus* Sp. Hasil Isolasi Dari Bekatul Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Asy'ari, M., dan Noer, A. S. 2005. Optimasi Konsentrasi  $MgCl_2$  dan Suhu *Annealing* pada Proses Amplifikasi *Multifragmens* mtDNA dengan Metoda PCR. *JKSA*, Vol. 8(1): 24-29
- Arndt, J. W., Gong W., Zhong, X., Showalter, A. K., Liu J., Dunlap, C. A., Lin, Z., Paxson, C., Tsai, M. D., dan Chan, M. K. 2001. Insight into the catalytic mechanism of DNA polymerase  $\beta$ : Structures of intermediate complexes. *Biochemistry*, Vol. 40: 5368–5375.
- Bartlett, J. M. S. dan Stirling, D. 2003. *PCR Protocol: Second Edition*. Humana Press
- Bauer, R. J. Begley, M. T., dan Trakselis, M. A. 2012. Fidelity of Polymerization by DNA Polymerase III from *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry National of Health Intitutes*, Vol 51(9):1996-2007
- Bavykin, G. S., Yuri, P.L., Vladimir, Z., John, J.K., Joany, J., David, A.S. dan Alexey C. 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* Gene Sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of *Bacillus cereus* Group Microorganisms. *American Society for Microbiology*, Vol 42 (8): 3711-3730
- Beard, W.A., Shock, D.D., dan Wilson, S.H. 2004. Influence of DNA Structure on DNA Polymerase  $\beta$  Active Site Function: Extension of Mutagenic DNA Intermediates. *J. Biol. Chem*, Vol. 279: 31921–31929.

- Brooker, R. J. 2012. *Genetics: analysis and principles* (Fourth). New York: McGraw-Hill.
- Buckingham, L. dan Flaws, M. L. 2007. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications*. Philadelphia: F. A. Davis Company
- Burgers, P. M., dkk. 2001. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *Journal Biological Chemistry*, Vol. 276(47): 43487-43490
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Mitchel., dan Lawrence, G. 2002. *Biologi Edisi Kelima Jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Case, J. R. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Enviromental Microbiology*, Vol 73(1) : 278-288
- Clark, W. dan Christopher, K. 2001. An introduction to DNA: Spectrofotometry, degradation, and the 'Frankengel; experiment. *Tested Studies for Laboratory Teaching*, Vol. 22: 81-99
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Review*, Vol. 17(4): 840-862
- Dias, R. S., Miguel, M. G., dan Lindman, B. *DNA interactions with Polymers and Surfactans*. John Wiley & Sons. Inc
- Ekman, S. 2007. PCR Optimization and Troubleshooting, with Special Reference to the Amplification of Ribosomal DNA in Licchenized Fungsi. *Lichenologist*, Vol 31(5): 517-531
- Eom, S. H., Wang, J., Steitz, T. A. 1996. Structure of *Taq Polymerase* with DNA At The Polymerase Active Site. *Nature*, Vol 382: 278-281
- Fatchiyah. 2011. *Biologi Molekuler*. Jakarta : Erlangga
- Fitriya, R. T., Ibrahim, M., dan Lisdiana, L. 2015. Keefektifan Metode Isolasi DNA Kit dan CTAB/NaCl yang Dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysentriae*. *LenteraBio*, Vol. 4 (1).
- Franklin, M. C., Wang, J., dan Steitz, T. A. 2001. Structure of the Replicating Complex of a Pol  $\alpha$  Family DNA Polymerase. *Cell*, Vol. 105, 657–667
- Gaffar, S. 2007. *Bioteknologi Molekul*. Bandung: Kimia FMIPA universitas Padjadjaran. [Http: pustaka.unpad.ac.id/wp-content/uploads/2009/06/diktat\\_biotekmol.pdf](http://pustaka.unpad.ac.id/wp-content/uploads/2009/06/diktat_biotekmol.pdf)

- Habibie, F. M., Wardani, A. K., dan Nurcholis, M. 2014. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Mikroorganisme Termofilik Penghasil Xilanase dari Lumpur Panas Lapindo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol. 2 (4).
- Hamka. 1979. *Tafsir Al-Azhar*. Surabaya: Yayasan Latimojong
- Handoyo, D. dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction. *Unitas*, Vol 9(1): 17-29
- Hori, K., Mark, D. F., dan Richardson, C. C. 1979. Deoxyribonucleic acid polymerase of bacteriophage T7. Characterization of the exonuclease activities of the gene 5 protein and the reconstituted polymerase. *J Biol Chem*. Vol. 254: 11598-11604
- [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus\\_cereus](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_cereus). Diakses tanggal 17 Oktober 2018
- Irimia, A., Zang, H., Loukachevitch, L. V., Eoff, R. L. Guengerich, P., dan Egli, M. 2006. Calcium Is a Cofactor of Polymerization but Inhibits Pyrophosphorolysis by the *Sulfolobus solfataricus* DNA Polymerase Dpo4. *Biochemistry*, Vol. 45: 5949-5956
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, Y. Pusch, G., Haselkon, R., Fonstein, M., Ehrlich, S. D. Overbeek, R., dan Kyrpides, N. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and Comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, Vol. 423 (6935): 87-91
- Jawetz, E., Adelberg, E. A. dan Melnick, J. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi ke-20. Jakarta: EGC
- Joshi, M. dan Deshpande. 2010. Polymerase Chain Reaction, Principle and Application. *International Journal of Biomedical Research*, Vol. 5 : 81-97
- Kool, Eric T. 2002. Active site tightness and substrate fit in DNA Replication. *Annual Rev. Biochemistry*, Vol 71: 191-219
- Kramer, F. M. dan Coen M. D. 2001. Enzymatic Amplification of DNA by PCR Standard Procedures and Optimization. *Current Protocol in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.
- Kuchta, R. D., Mizrahi, V., Benkovic, P. A., Johnson, K. A., dan Benkovic, S. J. 1987. Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow). *Biochemistry*, Vol. 26: 8410-8417

- Lee, H. R., Wang, M., dan Konigsberg, W. 2009. The Reopening Rate of The Fingers Domain is a Determinant of Base Selectivity for RB69 DNA Polymerase. *Biochemistry*, Vol. 48: 2087-2098
- Li, G.N., Xia, J. X., Zhao, H. H., Sendegeya, P., dan Zhu, Y. 2015. Identification and characterization of *Bacillus cereus* SW7-1 in *Bombyx mori*. Li, G. N., Xia, X. J., Zhao, H. H., Sendegaya, P., dan Zhu, Y. 2015. Identification and Characterization of *Bacillus cereus* SW7-1 in *Bombyx mori*, *Journal of Insect Science*, Vol. 15 (1)
- Lichtenberg, D., Ahyayauch, H., Goni, F. M. 2013. Mechanism of Detergent Solubilization of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, Vol. 105: 289-299
- Marantina, S. S. 2008. Deteksi Fragmen Gen NA Pengkode Neuraminidase Virus Avian Influenza A Subtipe H5N1 dengan Teknik Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Skripsi*. Depok: FMIPA UI
- 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 16SrRNA. *American Society for Microbiology*, Vol. 64 (2).
- McPherson, J. M. dan Moller, G. S. 2006. *PCR*. UK: Taylor and Francis Group
- Mikusanti., Fitriya., Marfinda, N. 2011. Aktivitas Campuran Ekstrak Kulit Manggis dan Kayu Secang terhadap *Bacillus cereus*. *Jurnal Penelitian Sains*, Vol. 12(3): 14309-14316
- Moore, E., Arnscheidt, A., Kruger, A., Strompl, C., Mau, M. 2004. Simplified Protocols for The Preparation of Genomic DNA from Bacterial Cultures. Belanda: Kluwer Academic Publisher
- Naryaningsih, A. 2005. Keefektifan *Bacillus cereus* ATCC 11778 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Sebagai Bioakumulator Kadmium. *Tesis*. Semarang, Pascasarjana Universitas Diponegoro
- Nema, N., Alamir, L., dan Mohammad, M. 2015. Production of cellulase from *Bacillus cereus* by submerged fermentation using corn husks as substrates. *International Food Research Journal*, 22 (5) : 1831-1836
- Ningsih, D. R., Rastuti, I., Kamaludin, R. 2012. Karakterisasi Enzim Amilase Dari Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan II. Universitas Jenderal Soedirman
- Novitasari, Vetty. 2014. Uji Ekstrak Minyak Atsiri Lada Putih (*Piper nigrum* Linn) Sebagai Antibakteri. *Skripsi*. Universitas Bengkulu

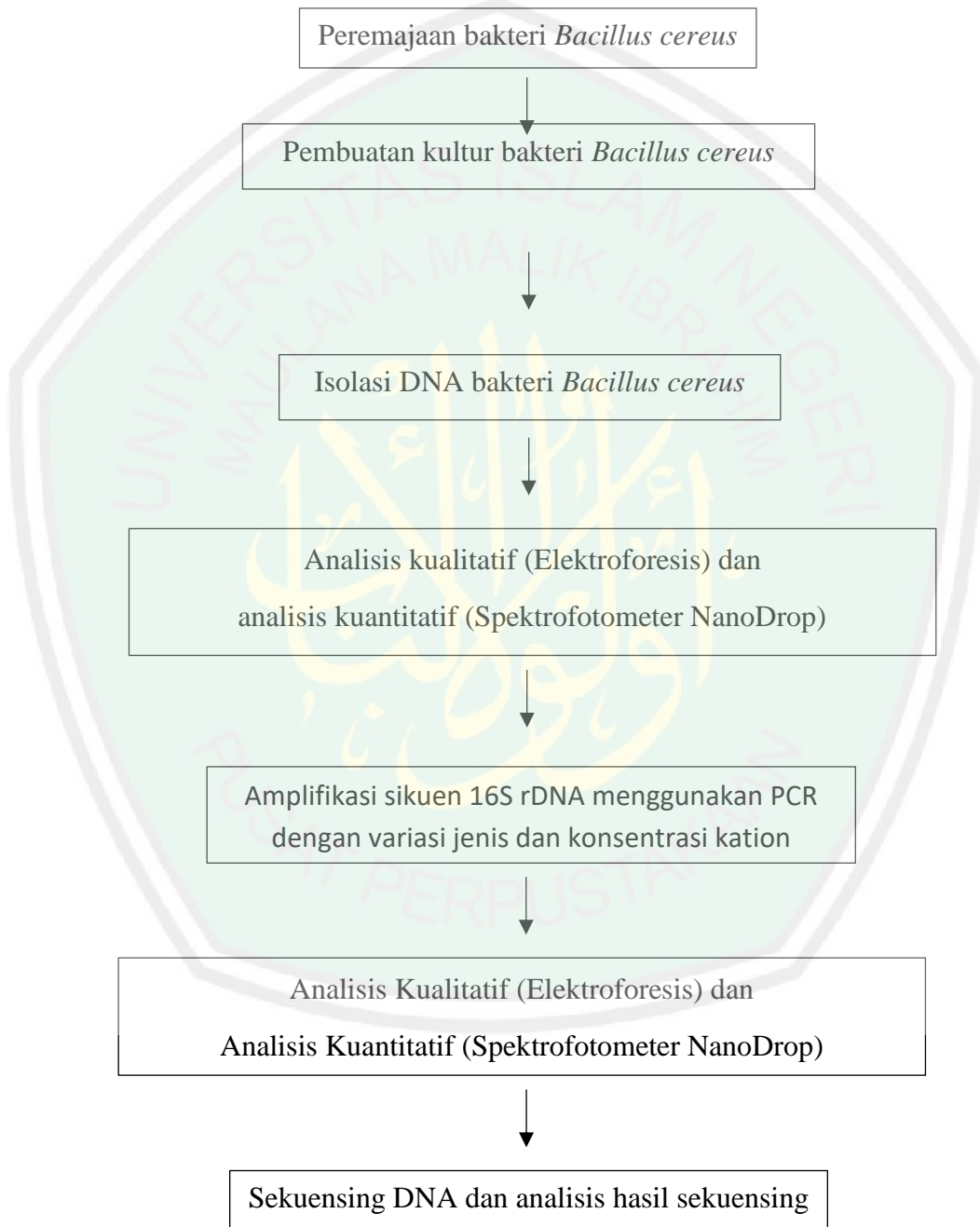
- Osborn, A. M dan Smith, C. J.. 2005. *Molecular Microbial Ecology*. UK : Taylor and Francis Group
- Palanivelu, P. 2013. DNA Polymerases: AnInsight into Their Active Sites and Catalytic Mechanism. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, Vol. 3(3):206-247
- Pangastuti, A. (2006). Review: Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*, Vol. 7(3): 292-296.
- Patagundi, B. I., Shivasharan, C. T. Dan Kaliwal, B. B. 2014. Isolation and Characterization of Cellulose Producing Bacteria From Soil. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, Vol. 3 (5): 59 - 69
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Wolfle, W. Wilson, S. H., dan Kraut, J. 1996. A Structural Basis for Metal Ion Mutagenicity and Nucleotide Selectivity in Human DNA Polymerase. *Bicochemistry*, Vol. 35: 12762-12777
- Pradhap, M., Selvisabhanayakam., Mathvianan, V., Parthasarathy., Ayyapan, J. V. A. A., dan Kumar, S. S. 2011. *Study on 16S rRNA based PCR method for spesific detection of Salmonella entrica typhi from gut of infected silkworm Bombyx mori(Linn.)*. *Journal Science Ind Research*, Vol. 70: 909-911
- Prayoga, W. dan Wardani, A. K. 2015. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Salmonella sp.* : A Review. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol. 3(2): 483-488
- Public Health England. 2015. *UK Standarts for Microbiology Investigations; Identification Of Bacillus Spesies*. London : Standart Unit Microbiology Service
- Ralec, C., Henry, E., Lemor, M., Killelea, T., dan Henneke, G. 2017. Calcium-Driven DNA Synthesis by a High-Fidelity DNA Polymerase. *Nucleic Acids Research*, Vol. 45(21): 12425-12440
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., dan Ravel, J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Micobiology Review*, Vol. 29: 303-329
- Rothwell, P. J., Allen, W. J., Slsamakls, E., Kallnin, S., Felekyan, S., Widengren, J., Waksman., G. 2013. dNTP-dependent Conformational Transitions in the Fingers Subdomain of Klentaq1 DNA Polymerase. *Journal Biological Chemistry*, Vol. 288(19): 13575-13591
- Sani, R. A. dan Nusroh, N. L. 2015. *Sains Berbasis Al-Quran*. Jakarta: Bumi Aksara

- Santos, A. P., dkk. 2009. Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' 16S rDNA in domestic cats from Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, Vol. 38(4): 443-452
- Savira, M. 2012. Analisis Variasi D-Loop DNA Mitokondria Pada Populasi Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Taman Nasional Way Kambas. *Skripsi*. Depok, FMIPA UI
- Sesmero, E. dan Thorpe, I. F. 2015. Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. *Viruses*, Vol 7(7): 3974-3994
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah*. Jakarta: Lentera Hati
- Sipos, R., Szekely, A. J., Palantintzky, M., Revesz, S., Marialigeti, K., dan Nikolauzs, M. 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol*, 60(2): 341-350
- Sirover, M.A. dan Loeb, L. A. 1976. Infidelity of DNA Synthesis *in vitro*: Screening for Potential Metal Mutagens or Carcinogens. *Science*, Vol. 194: 1434-1436
- Suryanto, Dwi. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Univeristas Sumatera Utara: FMIPA, Biologi
- Suzuki, T. dan Yamasato, K. 1994. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol*, Vol. 115(1): 13-18
- Thermo Scientific. (2011). *Assesment of nucleic acid purity*. T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers.
- Vaisman, A., Ling, H., Woodgate, R., dan Yang, W. 2005. Fidelity of Dpo4: Effect of Metal Ions, Nucleotide Selection and Pyrophosphorolysis. *EMBO J*, Vol. 24: 2957-2967
- Vashishtha, A. K. Wang, J., dan Konigsberg, W. H. 2016. Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases. *Journal Biology Chemistry*: Yale University

- Verkuil, E. V. P., Belkum, A. V., Hays, J. P. 2008. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Belanda: Springer
- Viljoen, J. G., Nel, L. H., dan Crowther, J. R. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Belanda: Springer
- Villani, G., Tanguy Le Gac, N., Wasungu, L., Burnouf, D., Fuchs, R. P., dan Boehmer, P. E. 2002. Effect of Manganese on In Vitro Replication of Damaged DNA Catalyzed by the Herpes Simplex Virus Type-1 DNA Polymerase. *Nucleic Acids Res*, Vol. 30: 3323-3332
- Wahyudi, T. H. 2007. Pengaruh Suhu Annealing dan Jumlah Siklus PCR yang Berbeda pada Program PCR Terhadap Keberhasilan Isolasi dan Amplifikasi mtDNA Ikan Patin (*Pangasius hypothalamus*). *Skripsi*. Institut Teknologi Bandung.
- Wulansari, S. 2016. Identifikasi Molekuler Bakteri Isolat Bekatul Berdasarkan Sikuen Gen 16S rRNA. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Wongsa, P., & Werukhamkul, P. (2007). *Product development and technical service, biosolution international*. Thailand : Bangkadi Industrial Park.
- Xia, S., Wang, M., Blaha, G., Konigsberg, W. H., dan Wang, J. 2011 Structural Insights Into Complete Metal Ion Coordination from Ternary Complexes of B Family RB69 DNA Polymerase. *Biochemistry*, Vol. 50: 9114-9124
- Yang, B., Wang, Y., dan Qian, P. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, Vol. 17(135): 1-8.
- Yusra., Azima, F., Novelina., Periadnadi. 2013. Characterization of Antimicrobial Bacteriocin Produced by SS28 Isolates from Budu, a Traditionally Fermented Fish Product of West Sumatera. *Microbiology*, Vol. 8(1): 24-32
- Yusuf, Z. K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Saintek*. Vol. 5 (6). Universitas Negeri Gorontalo
- Yuwono, T. (2006). *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.

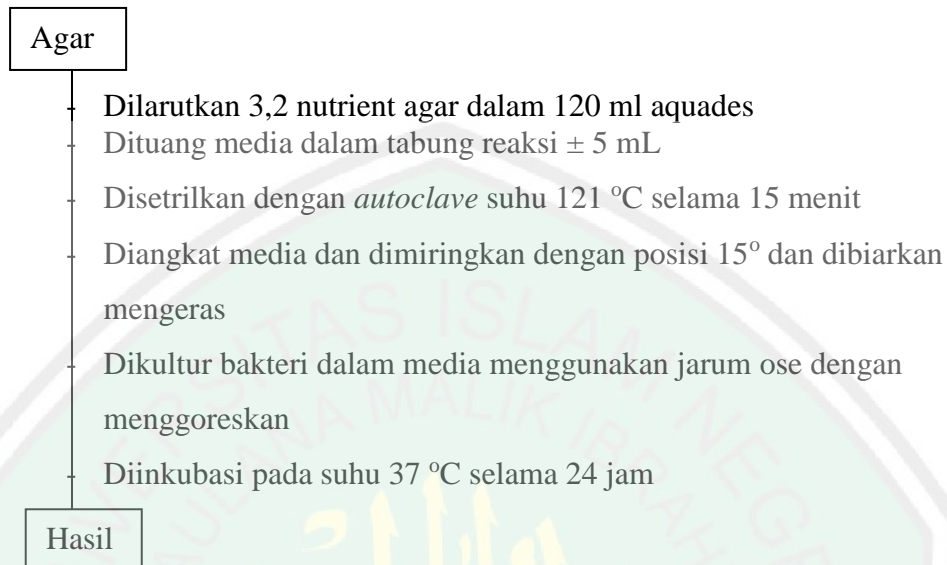
## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Rancangan Penelitian

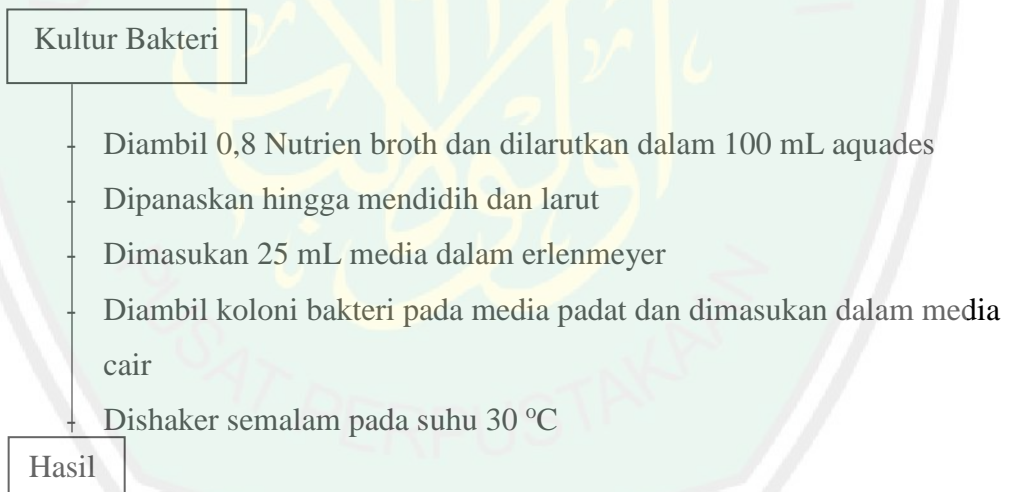


## Lampiran 2. Diagram Alir

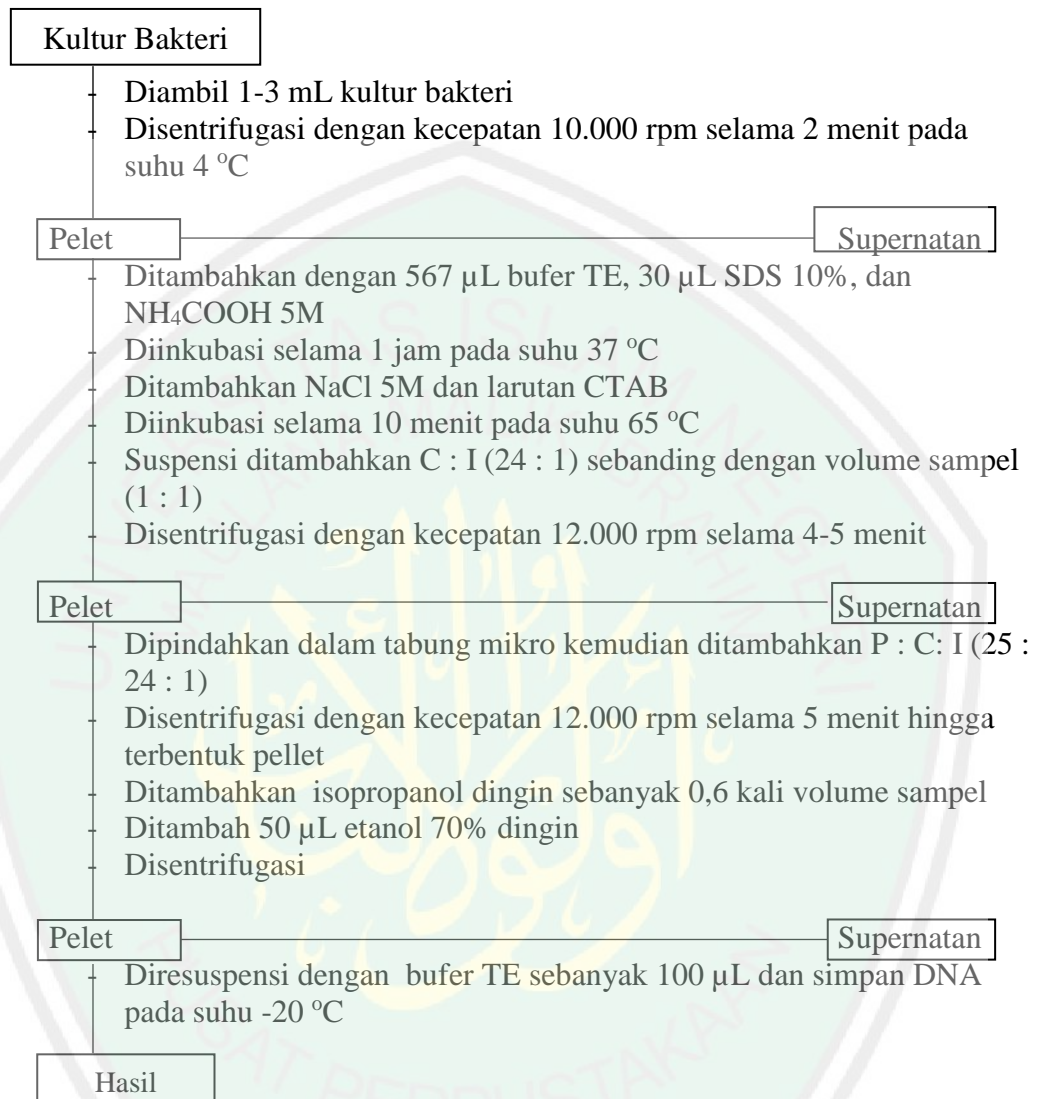
### a. Peremajaan Bakteri



### b. Pembuatan Kultur Bakteri



**c. Isolai DNA Menggunakan Metode CTAB (Fitriya, 2015)**



#### d. Elektroforesis gel agarosa

##### Gel Agarosa

- Disiapkan Gel agarosa 1% dengan memanaskan bubuk agarosa sebanyak 0,3 gr dalam 30 mL TBE hingga mendidih
- Didinginkan gel hingga setengah hangat dan ditambahkan EtBr sebanyak 1 mL
- Dituangkan agarosa+editium bromida pada cetakan yang telah dipasangi sisir pembuat sumuran sampel tunggu sampai mengeras
- Dimasukkan gel yang sudah mengeras dalam chamber dan tuangkan buffer TBE sampai gel terendam
- Dimasukkan 3  $\mu\text{L}$  DNA dan 1  $\mu\text{L}$  *loading dye* (3:1) pada masing-masing sumur
- Dihubungkan elektroda dengan *power supply* dan nyalakan hingga 1-2 jam
- Dipindahkan gel ke UV-transluminator dan diamati

Hasil

#### e. Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA

##### Sampel DNA

- Diambil sampel DNA sebanyak 1-2  $\mu\text{L}$  dilarutkan dengan ddH<sub>2</sub>O steril hingga volume 1 mL.
- Diukur absorbansi dengan spektrofotometer Nanodrop DN-1000 pada panjang gelombang  $\lambda$  230, 260 dan 280 nm

Hasil

**f. Amplifikasi Sikuen 16S rDNA****Master Mix**

Diambil master mix PCR sebanyak 10  $\mu$ L  
Ditambahkan primer F (*forward*) dan R (*reverse*) masing-masing 1  $\mu$ L, DNA templat 2  $\mu$ L, aquabides 4,8 – 5,6  $\mu$ L dengan penambahan kation divalen (0,4; 0,8; 1,2  $\mu$ L)  
Diatur alat PCR dengan denaturasi (94°C, 1 menit), annealing (50°C), dan elongasi (72°C, 2 menit)  
Dimasukan ke dalam alat PCR  
Diatur suhu pada setiap tahapan  
*Running*

**Hasil**

### Lampiran 3. Perhitungan

#### 1. Pembuatan media padat NA (Nutrien Agar)

3,2 gr Nutrien Agar dalam 120 mL

#### 2. Pembuatan media cair (Nutrien Broth)

0,8 gr Nutrien Broth dalam 100 mL

#### 3. Pembuatan Bufer TE (Tris-EDTA)

- 10 mM Tris-Cl pH 7,5
- 1 mM EDTA

Dibuat dari larutan stok Tris-Cl 1 M (pH 7,5) dan larutan stok EDTA 500 mM (pH 8,0) dalam 1 L ddH<sub>2</sub>O.

10 mL 1 M Tris-Cl pH 7,5

2 mL 0,5 EDTA pH 8,0

1 M Tris (crystallized free base)

(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

60,57 g dalam 500 mL ddH<sub>2</sub>O

pH 7,5 (dengan penambahan HCl)

0,5 M EDTA

(Diaminoethane tetraacetic acid)

18,6 g dalam 100 mL ddH<sub>2</sub>O

pH 8,0 (dengan penambahan NaOH)

#### 4. Pembuatan NaCl (Natrium Chlorida) 5 M

NaCl dibuat dalam 100 ml aquabides

$$\text{Konsentrasi (M)} = \frac{\text{Massa (gr)}}{\text{Mr (gr/mol)}} \times \frac{1000}{\text{Volume larutan (ml)}}$$

$$5 \text{ M} = \frac{\text{Massa NaCl (gr)}}{58,48 \text{ (gr/mol)}} \times \frac{1000}{100 \text{ ml}}$$

$$\text{Massa NaCl (gr)} = \frac{5 \text{ (mol/ml)} \times 58,48 \text{ (gr/mol)}}{10 \text{ ml}}$$

$$\text{Massa NaCl (gr)} = 29,24 \text{ gr}$$

### 5. Pembuatan $\text{NH}_4\text{COOH}$ (Ammonium Asetat) 5 M

$\text{NH}_4\text{COOH}$  dilarutkan dalam 1 ml aquabides

$$\text{Konsentrasi (M)} = \frac{\text{Massa (gr)}}{\text{Mr (gr/mol)}} \times \frac{1000}{\text{Volume larutan (ml)}}$$

$$5 \text{ M} = \frac{\text{Massa } \text{NH}_4\text{COOH (gr)}}{63 \text{ (gr/mol)}} \times \frac{1000}{1 \text{ ml}}$$

$$\text{Massa } \text{NH}_4\text{COOH (gr)} = \frac{5 \text{ (mol/ml)} \times 63 \text{ (gr/mol)}}{1000 \text{ ml}}$$

$$\text{Massa } \text{NH}_4\text{COOH (gr)} = 0,315 \text{ gr}$$

### 6. Pembuatan Bufer CTAB 2%

Bufer CTAB dilarutkan dalam 5 ml aquabides

$$\text{Reagen (\%)} = \frac{\text{massa zat terlarut (gr)}}{\text{volume larutan (ml)}} \times 100\%$$

$$\text{CTAB 2\%} = \frac{\text{massa CTAB (gr)}}{5 \text{ (ml)}} \times 100\%$$

$$\text{Massa CTAB} = 0,1 \text{ gr}$$

### 7. Pembuatan Gel Agarosa 1 %

Agarosa dilarutkan dalam 30 mL bufer TBE

$$\text{Reagen (\%)} = \frac{\text{massa zat terlarut (gr)}}{\text{volume larutan (ml)}} \times 100\%$$

$$\text{Gel Agarosa 1\%} = \frac{\text{massa Agarosa (gr)}}{30 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$\text{Massa Agarosa} = 0,3 \text{ gr}$$

### 8. Pembuatan SDS 10%

SDS dilarutkan dalam 5 ml aquabides

$$\text{Reagen (\%)} = \frac{\text{massa zat terlarut (gr)}}{\text{volume larutan (ml)}} \times 100\%$$

$$\text{SDS 10\%} = \frac{\text{massa SDS (gr)}}{5 \text{ ml}} \times 100\%$$

Massa Agarosa = 0,5 gr

### 9. Penambahan larutan MgCl<sub>2</sub> pada PCR mix

Larutan stok MgCl<sub>2</sub> 25 mM

$$\text{Volume MgCl}_2 \text{ yang ditambahkan (V)} = \frac{\text{konsentrasi MgCl}_2 \text{ yang diinginkan} - \text{konsentrasi MgCl}_2 \text{ pada bufer PCR}}{\text{Konsentrasi larutan stok MgCl}_2 \text{ (M3)}} \times \text{volume total PCR mix (V}_{\text{tot}})$$

(Marantina, 2008)

MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM

$$V = \frac{3,0 \text{ mM} - 2,5 \text{ mM}}{25 \text{ mM}} \times 20 \mu\text{L}$$

$$V = 0,4 \mu\text{L}$$

MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM

$$V = \frac{3,5 \text{ mM} - 2,5 \text{ mM}}{25 \text{ mM}} \times 20 \mu\text{l}$$

$$V = 0,8 \mu\text{l}$$

MgCl<sub>2</sub> 4,0 mM

$$V = \frac{4,0 \text{ mM} - 2,5 \text{ mM}}{25 \text{ mM}} \times 20 \mu\text{l}$$

$$V = 1,2 \mu\text{l}$$

#### Lampiran 4. Hasil Uji Kuantitatif Isolat DNA

Isolasi DNA bakteri *B. cereus* pada penelitian ini menggunakan dua tabung mikro. Isolat dari kedua tabung yang sampelnya berasal inokulum yang sama tersebut kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer nanodrop untuk mengetahui absorbansi pada 260 dan 280 nm.  $A_{260}$  merupakan panjang gelombang DNA,  $A_{280}$  panjang gelombang protein. Kemurnian isolat diketahui berdasarkan rasio  $A_{260/280}$ .

1. Tabung (a)

Menghasilkan  $A_{260} = 49,06$  dan  $A_{280} = 23,53$ , maka kemurniaanya

$$\text{kemurnian Isolat} = \frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{49,06}{23,53} = 2,09$$

2. Tabung (b)

Menghasilkan  $A_{260} = 34,65$  dan  $A_{280} = 16,29$ , maka kemurniaanya

$$\text{kemurnian Isolat} = \frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{34,65}{16,29} = 2,13$$

**Lampiran 5. Hasil Uji Kuantitatif Variasi Jenis dan Konsentrasi Kation  
Divalen pada PCR**

1. Ulangan 1

No.	Sampel	Abs 230	Abs 260	Abs 280	260/230	260/280	Konsentrasi (ng/ul)
1.	Kontrol	7,44	13,69	7,96	1,84	1,72	684,56
2.	Mg 3 mM	7,84	14,33	8,70	1,83	1,65	716,53
3.	Mg 3,5 mM	7,87	14,66	8,71	1,86	1,68	733,02
4.	Mg 4 mM	7,42	14,29	7,94	1,93	1,80	714,36
5.	Ca 3 mM	9,02	16,29	10,91	1,81	1,36	814,73
6.	Ca 3,5 mM	9,52	17,41	11,96	1,83	1,46	870,55
7.	Ca 4 mM	9,82	17,61	12,97	1,79	1,49	880,38

2. Ulangan 2

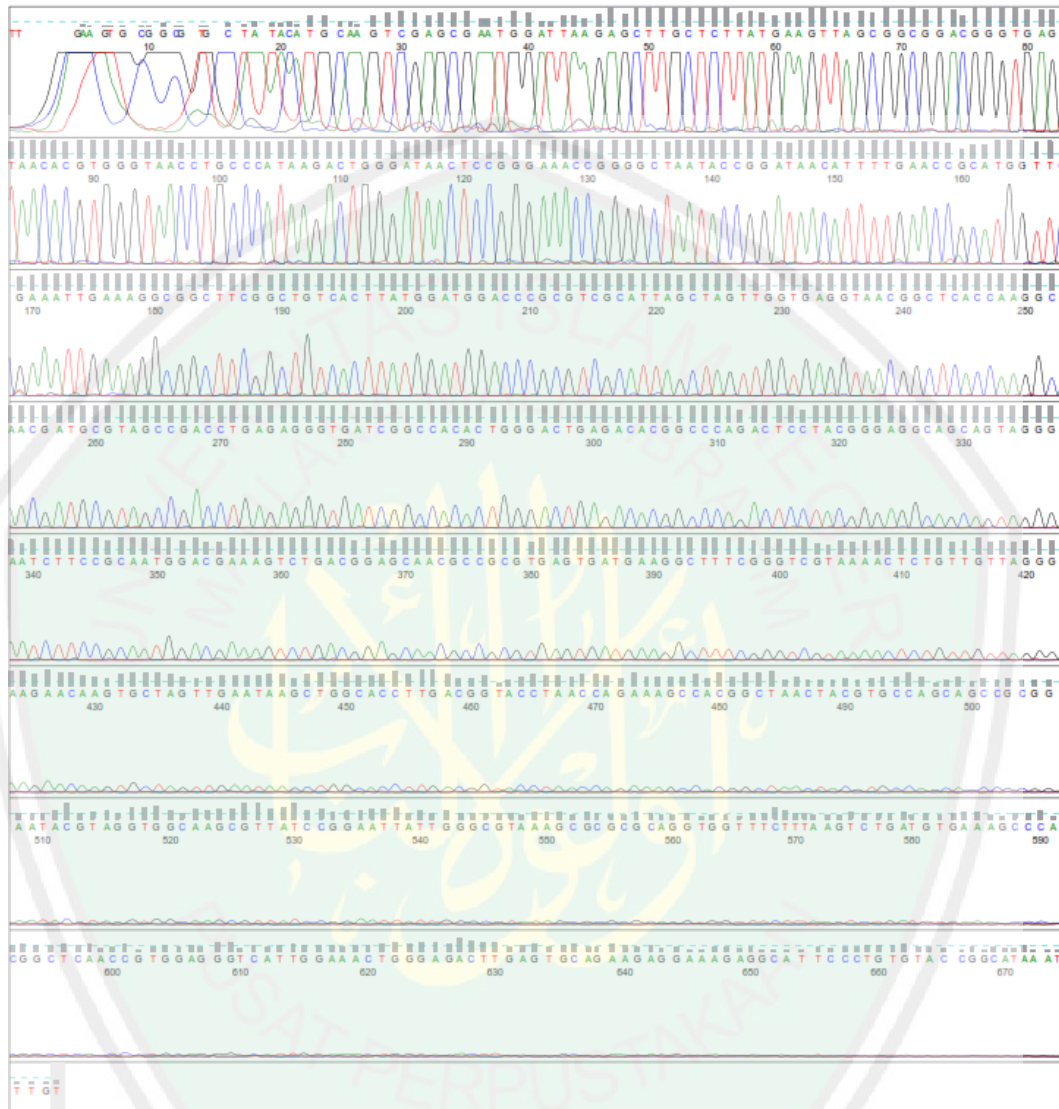
No.	Sampel	Abs 230	Abs 260	Abs 280	260/230	260/280	Konsentrasi (ng/ul)
1.	Kontrol	8,09	14,79	9,28	1,83	1,59	739,64
2.	Mg 3 mM	8,28	15,09	9,48	1,82	1,59	754,38
3.	Mg 3,5 mM	8,96	16,31	10,67	1,82	1,53	815,27
4.	Mg 4 mM	8,88	16,41	10,48	1,85	1,57	820,44
5.	Ca 3 mM	8,45	8,45	10,25	1,85	1,53	782,38
6.	Ca 3,5 mM	9,17	9,17	11,82	1,83	1,42	836,76
7.	Ca 4 mM	10,55	10,55	14,06	1,78	1,42	937,50

3. Ulangan 3

No.	Sampel	Abs 230	Abs 260	Abs 280	260/230	260/280	Konsentrasi (ng/ul)
1.	Kontrol	7,04	13,66	7,78	1,94	1,76	683,18
2.	Mg 3 mM	7,83	14,63	8,57	1,87	1,71	731,63
3.	Mg 3,5 mM	8,83	16,49	10,58	1,87	1,56	824,39
4.	Mg 4 mM	8,64	15,94	10,23	1,85	1,56	797,00
5.	Ca 3 mM	8,93	16,33	10,98	1,83	1,49	816,64
6.	Ca 3,5 mM	9,31	16,85	11,94	1,81	1,41	842,64
7.	Ca 4 mM	11,43	20,29	15,74	1,79	1,29	1014,3

## Lampiran 6. Kromatogram Hasil Sekuensing

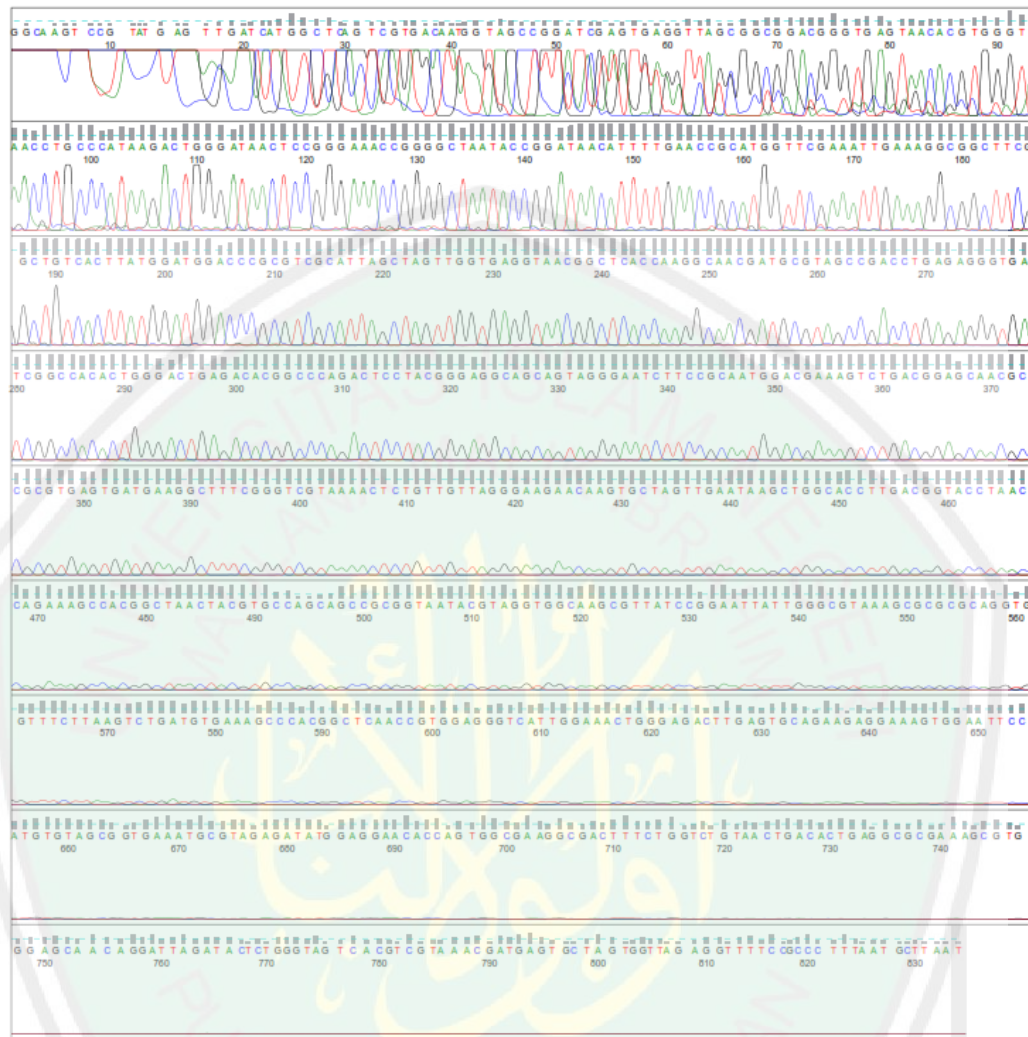
### 1. BcK *Forward* (679 basa)



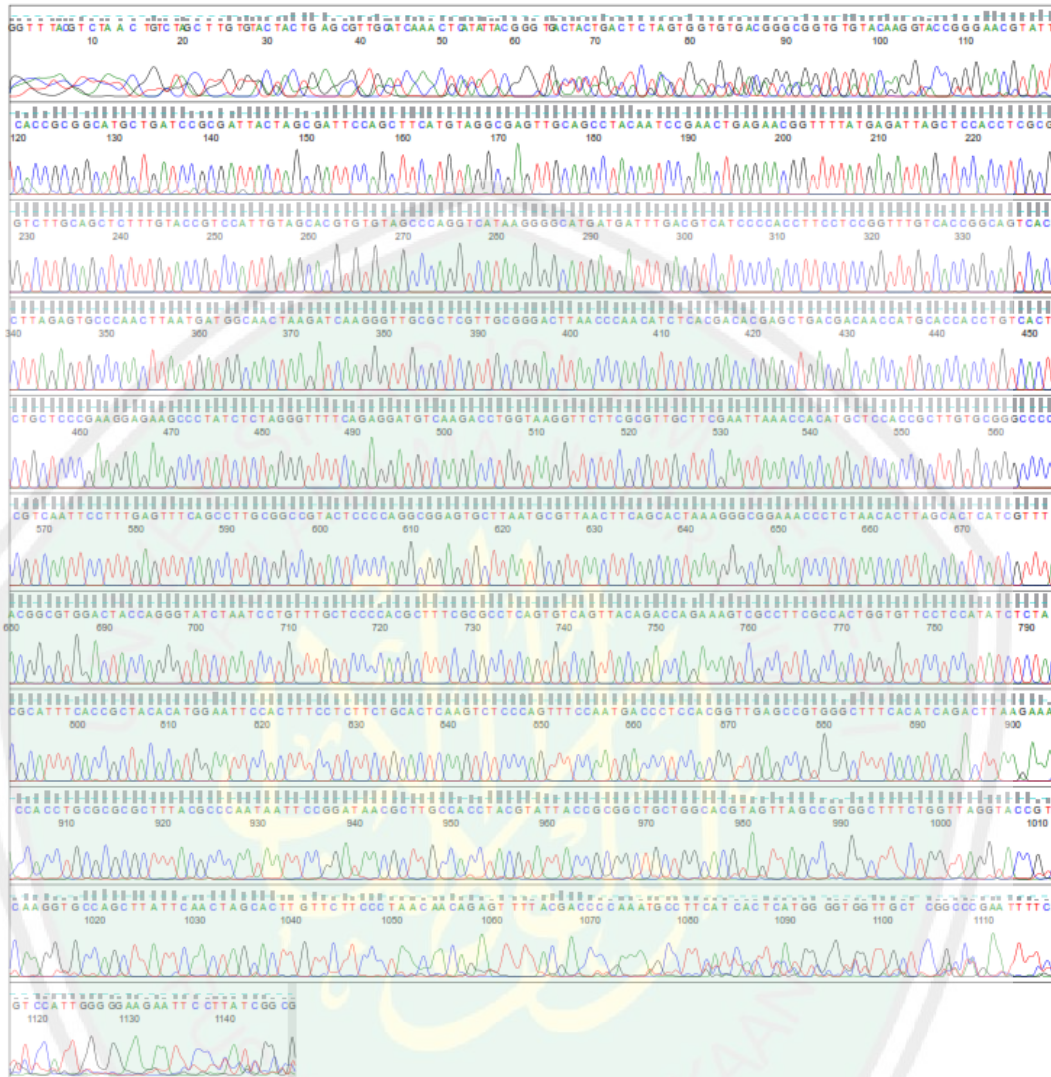
## 2. BcK reverse (1085 basa)



### 3. BcMg *forward* (834 basa)



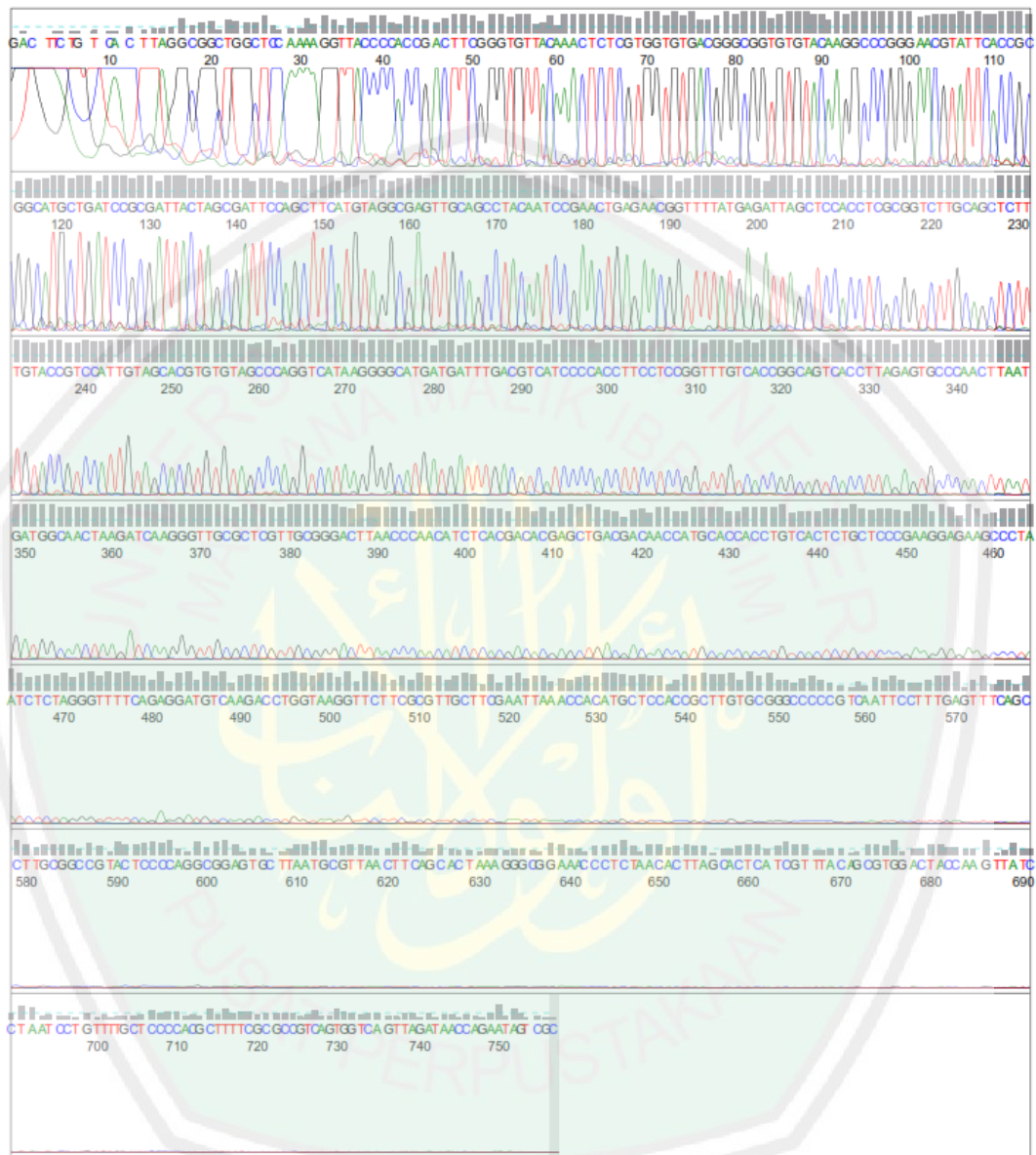
#### 4. BcMg reverse (1147 basa)



### 5. BcCa1 *forward* (530 basa)



## 6. BcCa2 reverse (757 basa)



Lampiran 7. Pensejajaran Hasil Sikuensing (*forward*)

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
Bcereus_K_ TTGAAGTGCG GCGTGCTATA CATGCAAGTC GAGCGAATGG ATTAAGAGCT
Bcereus_Mg -GGCAAGTCC GTATGAGTTG -ATCATGGCT CAGTCGTGAC AATGGTAGCC
Bcereus_Ca -----GGATC GCA-GCTATA -ATGCA-GTC GAGCGA-TGG ATTAAGAGCT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
Bcereus_K_ TGCTCTTATG AAGTTAGCGG CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG
Bcereus_Mg GGATCGAGTG AGTTAGCGG CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG
Bcereus_Ca TGCTCTTATG AAGTTAGCGG CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGTAACCTG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150
Bcereus_K_ CCCATAAGAC TGGGATAACT CCGGAAACC GGGGCTAATA CCGGATAACA
Bcereus_Mg CCCATAAGAC TGGGATAACT CCGGAAACC GGGGCTAATA CCGGATAACA
Bcereus_Ca CCCATAAGAC TGGGATAACT CCGGAAACC GGGGCTAATA CCGGATAACA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160     170     180     190     200
Bcereus_K_ TTTTGAACCG CATGGTTCGA AATTGAAAGG CGGCTTCGGC TGCTACTTAT
Bcereus_Mg TTTTGAACCG CATGGTTCGA AATTGAAAGG CGGCTTCGGC TGCTACTTAT
Bcereus_Ca TTTTGAACCG CATGGTTCGA AATTGAAAGG CGGCTTCGGC TGCTACTTAT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250
Bcereus_K_ GGATGGACCC GCGTCGCATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG
Bcereus_Mg GGATGGACCC GCGTCGCATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG
Bcereus_Ca GGATGGACCC GCGTCGCATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG GCTCACCAAG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260     270     280     290     300
Bcereus_K_ GCAACGATGC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCGGCCACA CTGGGACTGA
Bcereus_Mg GCAACGATGC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCGGCCACA CTGGGACTGA
Bcereus_Ca GCAACGATGC GTAGCCGACC TGAGAGGGTG ATCGGCCACA CTGGGACTGA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350
Bcereus_K_ GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCGCAAT
Bcereus_Mg GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCGCAAT
Bcereus_Ca GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCGCAAT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360     370     380     390     400
Bcereus_K_ GGACGAAAGT CTGACGGAGC AACGCCGCGT GAGTGATGAA GGCTTTCGGG
Bcereus_Mg GGACGAAAGT CTGACGGAGC AACGCCGCGT GAGTGATGAA GGCTTTCGGG
Bcereus_Ca GGACGAAAGT CTGACGGAGC AACGCCGCGT GAGTGATGAA GGCTTTCGGG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450
Bcereus_K_ TCGTAAAAC TGTGTTAG GGAAGAACA GTGCTAGTTG AATAAGCTGG
Bcereus_Mg TCGTAAAAC TGTGTTAG GGAAGAACA GTGCTAGTTG AATAAGCTGG
Bcereus_Ca TCGTAAAAC TGTGTTAG GGAAGAACA GTGCTAGTTG AATAAGCTGG

```

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	460          470          480          490          500
<i>Bcereus_K</i>	CACCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG
<i>Bcereus_Mg</i>	CACCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG
<i>Bcereus_Ca</i>	CACCTTGACG GTACCTAACC AGAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGTCAGCAG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	510          520          530          540          550
<i>Bcereus_K</i>	CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA
<i>Bcereus_Mg</i>	CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA
<i>Bcereus_Ca</i>	CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT CCGGACTG- -----
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	560          570          580          590          600
<i>Bcereus_K</i>	GCGCGCGCAG GTGGTTTCTT TAAGTCTGAT GTGAAAGCCC ACGGCTCAAC
<i>Bcereus_Mg</i>	GCGCGCGCAG GTGGTTTCTT -AAGTCTGAT GTGAAAGCCC ACGGCTCAAC
<i>Bcereus_Ca</i>	-----
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	610          620          630          640          650
<i>Bcereus_K</i>	CGTGGAGGGT CATTGGA AAC TGGGAGACTT GAGTGCAGAA GAGGAAAGAG
<i>Bcereus_Mg</i>	CGTGGAGGGT CATTGGA AAC TGGGAGACTT GAGTGCAGAA GAGGAAAGTG
<i>Bcereus_Ca</i>	-----
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	660          670          680          690          700
<i>Bcereus_K</i>	GCATTCCTG TGTACCGGCA TAAATTTGT- -----
<i>Bcereus_Mg</i>	GAATTCATG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG AGATATGGAG GAACACCAGT
<i>Bcereus_Ca</i>	-----
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	710          720          730          740          750
<i>Bcereus_K</i>	-----
<i>Bcereus_Mg</i>	GGCGAAGGCG ACTTCTGGT CTGTA ACTGA CACTGAGGCG CGAAAGCGTG
<i>Bcereus_Ca</i>	-----
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	760          770          780          790          800
<i>Bcereus_K</i>	-----
<i>Bcereus_Mg</i>	GGAGCAACAG GATTAGATAC TCTGGGTAGT CACGTCGTAA ACGATGAGTG
<i>Bcereus_Ca</i>	-----
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	810          820          830
<i>Bcereus_K</i>	-----
<i>Bcereus_Mg</i>	CTAGTGGTTA GAGGTTTCC GCCCTTAAAT GCTTAAT
<i>Bcereus_Ca</i>	-----

Keterangan:

■ : urutan basa ketiga sampel berbeda

■ : urutan basa ketiga sampel sama

■ : hanya urutan basa sampel BcK dan BcMg yang sama

### Lampiran 8. Pensejajaran hasil sikuensing (*reverse*)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
Bcereus_K_  TTGCCCTCC TGTTCACT- --TAGGCGGC TGGCTCCAAA AGGTTACCCC
Bcereus_Mg  ----GGTTTA CGTCTAACTG TCTAGCTTGT G TACTACTGA GCGTTGCATC
2897531_4_  ----GACTTC TGTC--ACT- --TAGGCGGC TGGCTCCAAA AGGTTACCCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90          100
Bcereus_K_  A----CCGAC TTCGGGTG-T TACAAACTCT CGTGGTGTGA CGGGCGGTGT
Bcereus_Mg  AACTCATAT TACGGGTGAC TACTGACTCT AGTGGTGTGA CGGGCGGTGT
2897531_4_  A----CCGAC TTCGGGTG-T TACAAACTCT CGTGGTGTGA CGGGCGGTGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
Bcereus_K_  GTACAAGGC- CCGGAACGT ATTCACCGCG GCATGCTGAT CCGCGATTAC
Bcereus_Mg  GTACAAGGTA CCGGAACGT ATTCACCGCG GCATGCTGAT CCGCGATTAC
Bcereus_Ca  GTACAAGGC- CCGGAACGT ATTCACCGCG GCATGCTGAT CCGCGATTAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
Bcereus_K_  TAGCGATTCC AGCTTCATGT AGGCGAGTTG CAGCCTACAA TCCGAAGTGA
Bcereus_Mg  TAGCGATTCC AGCTTCATGT AGGCGAGTTG CAGCCTACAA TCCGAAGTGA
Bcereus_Ca  TAGCGATTCC AGCTTCATGT AGGCGAGTTG CAGCCTACAA TCCGAAGTGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
Bcereus_K_  GAACGGTTTT ATGAGATTAG CTCCACCTCG CGGTCTTGCA GCTCTTTGTA
Bcereus_Mg  GAACGGTTTT ATGAGATTAG CTCCACCTCG CGGTCTTGCA GCTCTTTGTA
Bcereus_Ca  GAACGGTTTT ATGAGATTAG CTCCACCTCG CGGTCTTGCA GCTCTTTGTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
Bcereus_K_  CCGTCCATTG TAGCACGTGT GTAGCCCAGG TCATAAGGGG CATGATGATT
Bcereus_Mg  CCGTCCATTG TAGCACGTGT GTAGCCCAGG TCATAAGGGG CATGATGATT
Bcereus_Ca  CCGTCCATTG TAGCACGTGT GTAGCCCAGG TCATAAGGGG CATGATGATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
Bcereus_K_  TGACGTCATC CCCACCTTCC TCCGGTTTGT CACCGGCAGT CACCTTAGAG
Bcereus_Mg  TGACGTCATC CCCACCTTCC TCCGGTTTGT CACCGGCAGT CACCTTAGAG
Bcereus_Ca  TGACGTCATC CCCACCTTCC TCCGGTTTGT CACCGGCAGT CACCTTAGAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360         370         380         390         400
Bcereus_K_  TGCCCAACTT AATGATGGCA ACTAAGATCA AGGTTGCGC TCGTTGCGGG
Bcereus_Mg  TGCCCAACTT AATGATGGCA ACTAAGATCA AGGTTGCGC TCGTTGCGGG
Bcereus_Ca  TGCCCAACTT AATGATGGCA ACTAAGATCA AGGTTGCGC TCGTTGCGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410         420         430         440         450
Bcereus_K_  ACTTAACCCA ACATCTCACG ACACGAGCTG ACGACAACCA TGCACCACCT
Bcereus_Mg  ACTTAACCCA ACATCTCACG ACACGAGCTG ACGACAACCA TGCACCACCT
Bcereus_Ca  ACTTAACCCA ACATCTCACG ACACGAGCTG ACGACAACCA TGCACCACCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460         470         480         490         500
Bcereus_K_  G TCACTCTGC TCCCGAAGGA GAAGCCCTAT CTCTAGGGTT TTCAGAGGAT
Bcereus_Mg  G TCACTCTGC TCCCGAAGGA GAAGCCCTAT CTCTAGGGTT TTCAGAGGAT
Bcereus_Ca  G TCACTCTGC TCCCGAAGGA GAAGCCCTAT CTCTAGGGTT TTCAGAGGAT

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510      520      530      540      550
Bcereus_K_  GTCAAGACCT GGTAAGGTTT TTCGCGTTGC TTCGAATTAA ACCACATGCT
Bcereus_Mg  GTCAAGACCT GGTAAGGTTT TTCGCGTTGC TTCGAATTAA ACCACATGCT
Bcereus_Ca  GTCAAGACCT GGTAAGGTTT TTCGCGTTGC TTCGAATTAA ACCACATGCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          560      570      580      590      600
Bcereus_K_  CCACCGCTTG TCGGGGCCCC CGTCAATTCC TTTGAGTTTC AGCCTTGCGG
Bcereus_Mg  CCACCGCTTG TCGGGGCCCC CGTCAATTCC TTTGAGTTTC AGCCTTGCGG
Bcereus_Ca  CCACCGCTTG TCGGGGCCCC CGTCAATTCC TTTGAGTTTC AGCCTTGCGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          610      620      630      640      650
Bcereus_K_  CCGTACTCCC CAGGCGGAGT GCTTAATGCG TTAAC TTCAG CACTAAAGGG
Bcereus_Mg  CCGTACTCCC CAGGCGGAGT GCTTAATGCG TTAAC TTCAG CACTAAAGGG
Bcereus_Ca  CCGTACTCCC CAGGCGGAGT GCTTAATGCG TTAAC TTCAG CACTAAAGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          660      670      680      690      700
Bcereus_K_  CGGAAACCCT CTAACACTTA GCACTCATCG TTTACGGCGT GGA CTACCAG
Bcereus_Mg  CGGAAACCCT CTAACACTTA GCACTCATCG TTTACGGCGT GGA CTACCAG
Bcereus_Ca  CGGAAACCCT CTAACACTTA GCACTCATCG TTTACAGCGT GGA CTACCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          710      720      730      740      750
Bcereus_K_  GGTATCTAAT CCTGTTT-GC TCCCACGCT TT-CGCGCC- TCAGTG-TCA
Bcereus_Mg  GGTATCTAAT CCTGTTT-GC TCCCACGCT TT-CGCGCC- TCAGTG-TCA
Bcereus_Ca  GTTATCTAAT CCTGTTTGC TCCCACGCT TTTGCGCGG TCAGTGGTCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          760      770      780      790      800
Bcereus_K_  GTTACA-GAC CAGAA-AGTC GCCTTCGCCA CTGGTGTTCC TCCATATCTC
Bcereus_Mg  GTTACA-GAC CAGAA-AGTC GCCTTCGCCA CTGGTGTTCC TCCATATCTC
Bcereus_Ca  GTTAGATAAC CAGAATAGTC GC-----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          810      820      830      840      850
Bcereus_K_  TACGCATTTC ACCGCTACAC ATGGAATTCC ACTTTCCTCT TCTGCACTCA
Bcereus_Mg  TACGCATTTC ACCGCTACAC ATGGAATTCC ACTTTCCTCT TCTGCACTCA
Bcereus_Ca  -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          860      870      880      890      900
Bcereus_K_  AGTCTCCCAG TTTCCAATGA CCCTCCACGG TTGAGCCGTG GGCTTTCACA
Bcereus_Mg  AGTCTCCCAG TTTCCAATGA CCCTCCACGG TTGAGCCGTG GGCTTTCACA
Bcereus_Ca  -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          910      920      930      940      950
Bcereus_K_  TCAGACTTAA GAAACCACCT GCGCGCGCTT TACGCCAAT AATTCCGGAT
Bcereus_Mg  TCAGACTTAA GAAACCACCT GCGCGCGCTT TACGCCAAT AATTCCGGAT
Bcereus_Ca  -----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          960      970      980      990      1000
Bcereus_K_  AACGCTTGCC ACCTACGTAT TACCGTCGTC TGCTGGTACC GTATTTAGCC
Bcereus_Mg  AACGCTTGCC ACCTACGTAT TACCG-CGGC TGCTGGCAC- GTAGTTAGCC
Bcereus_Ca  -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1010      1020      1030      1040      1050
Bcereus_K   TGGGCCTTTC TGGTTTAGGT ACCGTTCAAG GTGCCAGCT TAATTCAACT
Bcereus_Mg  GTGGCCTTCT GG--TTAGGT ACCGT-CAAG GTGCC-AGCT TATC--AAC
Bcereus_Ca  -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1060      1070      1080      1090      1100
Bcereus_K   TATCACTTGT TCTTCCCTA ACTACCAAAT TTTACTAAC CCGAAAAGCC
Bcereus_Mg  TAGCACTTGT TCTTCCCTAA --CAACAGAG TTTACGACC CCAAATGCCT
Bcereus_Ca  -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1110      1120      1130      1140      1150
Bcereus_K   -----
Bcereus_Mg  TCATCACTCA TGGGGTGGTT GCTCGGCCCG AATTTTCGTC CATTGGGGGA
Bcereus_Ca  -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1160
Bcereus_K   -----
Bcereus_Mg  AGAATTCCTT ATCGGCG
Bcereus_Ca  -----

```

Keterangan:

 : urutan basa ketiga sampel berbeda

 : urutan basa ketiga sampel sama

 : hanya urutan basa sampel BcK dan BcMg yang sama

## Lampiran 9. Hasil BLAST-n

### 1. Sampel BcK

Strain Bacillus	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity
Bacillus cereus strain FORT 137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain FORT 113.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain FORT 73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus sp. strain EPG3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain MHS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: Iso10-14	2599	2599	100%	0.0	99%
Uncultured Bacillus sp. clone C6A08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus sp. M418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain KMR-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain CZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus sp. S43 partial 16S rRNA gene, strain S43	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus anthracis strain Se03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GTC 02826	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus sp. WPCB070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus sp. enrichment culture clone ZSTB102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain FORT 137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain FORT 113.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain FORT 73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%
Bacillus sp. strain EPG3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2599	2599	100%	0.0	99%

## 2. Sampel BcMg

<b>Strain Bacillus</b>	<b>Max score</b>	<b>Total score</b>	<b>Query cover</b>	<b>E value</b>	<b>Identity</b>
Bacillus cereus partial 16S rRNA gene, strain B15	2407	2407	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain JN105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2407	2407	100%	0.0	99%
Bacillus thuringiensis strain 7SA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain Z015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain Z005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus thuringiensis partial 16S rRNA gene, isolate VrL10	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain SP1-AB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW132 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW098 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW090 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW081 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW080 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW076 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RW009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2405	2405	100%	0.0	99%

### 3. BcCa1 (forward)

Strain Bacillus	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity
Bacillus cereus strain SS105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain DQ-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	98%	0.0	99%
Bacillus cereus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 4PLGES	952	952	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain 2k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain RSA21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain K1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain JSYM28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain MuaraRH12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	950	950	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain DGT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	950	950	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain XH05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	950	950	98%	0.0	99%
Bacillus cereus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SBMWP1	950	950	98%	0.0	99%
Bacillus cereus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: SBABrB5	950	950	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain 10604 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	950	950	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain EGU59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	950	950	97%	0.0	99%
Bacillus cereus strain DQ-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	97%	0.0	99%
Bacillus cereus strain ZLynn1000-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	97%	0.0	99%
Bacillus cereus strain PU3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain GX S-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	98%	0.0	99%
Bacillus cereus strain PS5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain AR 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	948	948	99%	0.0	99%

#### 4. BcCa2 (reverse)

Strain Bacillus	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity
Bacillus cereus strain HG10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1327	1327	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1325	1325	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain XKS56.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1323	1323	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain BS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1321	1321	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain S45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1321	1321	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain NA5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1321	1321	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain WZ003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain WJB94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain VRKPK25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain S5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain LB61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain PM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain K11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain P2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	99%
Bacillus cereus strain N419 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain 45-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain XG2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain Y3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain ATCC 21281 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%
Bacillus cereus strain B33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	99%	0.0	98%

## Lampiran 10. Hasil Contig BcK, BcMg, BcCa1 dan Sikuen Strain *Bacillus* BLAST-n Terpublikasi

	..... ..... ..... ..... ..... .....				
		10	20	30	40
	..... ..... ..... ..... ..... .....				
<b>BcK</b>	-----				
<b>BcMg</b>	-----				
<b>BcCa_Forward</b>	-----				
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	-----				-----GGAT CGCAGCTATA
<b>B.c strain Crh25</b>	-----				
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	-----				
<b>B.c strain DQ-8</b>	-----				
<b>B.c strain FORT 73</b>	-----				
<b>B.c strain FORT 137</b>	-----				
<b>B.c strain HN002</b>	-----				
<b>B.c strain MHS</b>	-----				
<b>B.t strain 7SA</b>	-----				
<b>B.t strain X6</b>	-----				
<b>B.a strain Se03</b>	-----				
<b>B.c strain CZ</b>	-----				
<b>B.c strain FORT 113.</b>	-----				
<b>B.c strain T-o4</b>	-----				
<b>B.c partial sequence</b>	-----				
	..... ..... ..... ..... ..... .....				
		60	70	80	90
	..... ..... ..... ..... ..... .....				
<b>BcK</b>	TG-CA-AGTC	GAG-CGAATG	GATTAAGAGC	TTGCTCTTA-	TGAAGTTAGC
<b>BcMg</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>BcCa_Forward</b>	ATGCA--GTC	GAG-CGA-TG	GATTAAGAGC	TTGCTCTTA-	TGAAGTTAGC
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain Crh25</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain DQ-8</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain FORT 73</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain FORT 137</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain HN002</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain MHS</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.t strain 7SA</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.t strain X6</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.a strain Se03</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain CZ</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain FORT 113.</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c strain T-o4</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
<b>B.c partial sequence</b>	-----	-----	-----	-----	-----TTAGC
	..... ..... ..... ..... ..... .....				
		110	120	130	140
	..... ..... ..... ..... ..... .....				
<b>BcK</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>BcMg</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>BcCa_Forward</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain Crh25</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain DQ-8</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain FORT 73</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain FORT 137</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain HN002</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain MHS</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.t strain 7SA</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.t strain X6</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.a strain Se03</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain CZ</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain FORT 113.</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c strain T-o4</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA
<b>B.c partial sequence</b>	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160          170          180          190          200
BcK      CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGGATAA CATTTTGAAC CGCATGGTTC
BcMg     CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGGATAA CATTTTGAAC CGCATGGTTC
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016)
B.c strain CRh25
B.c strain CZ-2 16S
B.c strain DQ-8
B.c strain FORT 73
B.c strain FORT 137
B.c strain HN002
B.c strain MHS
B.t strain 7SA
B.t strain X6
B.a strain Se03
B.c strain CZ
B.c strain FORT 113.
B.c strain T-o4
B.c partial sequence

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210          220          230          240          250
BcK      GAAATTGAAA GGCGGCTTCG GCTGTCACCT ATGGATGGAC CCGCGTCGCA
BcMg     GAAATTGAAA GGCGGCTTCG GCTGTCACCT ATGGATGGAC CCGCGTCGCA
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016)
B.c strain CRh25
B.c strain CZ-2 16S
B.c strain DQ-8
B.c strain FORT 73
B.c strain FORT 137
B.c strain HN002
B.c strain MHS
B.t strain 7SA
B.t strain X6
B.a strain Se03
B.c strain CZ
B.c strain FORT 113.
B.c strain T-o4
B.c partial sequence

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260          270          280          290          300
BcK      TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTCACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA
BcMg     TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTCACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016)
B.c strain CRh25
B.c strain CZ-2 16S
B.c strain DQ-8
B.c strain FORT 73
B.c strain FORT 137
B.c strain HN002
B.c strain MHS
B.t strain 7SA
B.t strain X6
B.a strain Se03
B.c strain CZ
B.c strain FORT 113.
B.c strain T-o4
B.c partial sequence

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310          320          330          340          350
BcK      CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT
BcMg     CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016)
B.c strain CRh25
B.c strain CZ-2 16S

```

<b>B.c strain DQ-8</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c strain FORT 73</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c strain FORT 137</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c strain HN002</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c strain MHS</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.t strain 7SA</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.t strain X6</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.a strain Se03</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c strain CZ</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c strain FORT 113.</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c strain T-o4</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT
<b>B.c partial sequence</b>	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		360	370	380	390	400
<b>BcK</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>BcMg</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>BcCa_Forward</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain CRh25</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain DQ-8</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain FORT 73</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain FORT 137</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain HN002</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain MHS</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.t strain 7SA</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.t strain X6</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.a strain Se03</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain CZ</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain FORT 113.</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c strain T-o4</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	
<b>B.c partial sequence</b>	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		410	420	430	440	450
<b>BcK</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>BcMg</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>BcCa_Forward</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain CRh25</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain DQ-8</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain FORT 73</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain FORT 137</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain HN002</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain MHS</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.t strain 7SA</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.t strain X6</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.a strain Se03</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain CZ</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain FORT 113.</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c strain T-o4</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	
<b>B.c partial sequence</b>	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG	AAGGCTTTCG	GGTCGTAAAA	CTCTGTTGTT	

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		460	470	480	490	500
<b>BcK</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>BcMg</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>BcCa_Forward</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c strain CRh25</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c strain DQ-8</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c strain FORT 73</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c strain FORT 137</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c strain HN002</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.c strain MHS</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.t strain 7SA</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.t strain X6</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	
<b>B.a strain Se03</b>	AGGGAAGAAC	AAGTGCTAGT	TGAATAAGCT	GGCACCTTGA	CGGTACCTAA	

```

B.c strain CZ          AGGGAAGAAC AAGTGCTAGT TGAATAAGCT GGCACCTTGA CGGTACCTAA
B.c strain FORT 113.  AGGGAAGAAC AAGTGCTAGT TGAATAAGCT GGCACCTTGA CGGTACCTAA
B.c strain T-o4       AGGGAAGAAC AAGTGCTAGT TGAATAAGCT GGCACCTTGA CGGTACCTAA
B.c partial sequence  AGGGAAGAAC AAGTGCTAGT TGAATAAGCT GGCACCTTGA CGGTACCTAA

```

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      510      520      530      540      550
BcK      CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
BcMg     CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016) CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain Crh25    CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain CZ-2 16S CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain DQ-8     CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain FORT 73  CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain FORT 137 CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain HN002    CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain MHS      CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.t strain 7SA      CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.t strain X6       CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.a strain Se03     CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain CZ       CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain FORT 113. CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c strain T-o4     CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT
B.c partial sequence CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT

```

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      560      570      580      590      600
BcK      GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
BcMg     GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016) GGCAAGCGTT ATCCGGGACT G-----
B.c strain Crh25    GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain CZ-2 16S GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain DQ-8     GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain FORT 73  GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain FORT 137 GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain HN002    GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain MHS      GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.t strain 7SA      GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.t strain X6       GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.a strain Se03     GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain CZ       GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain FORT 113. GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c strain T-o4     GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC
B.c partial sequence GGCAAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGCGCGCCG AGGTGGTTTC

```

```

      ....|....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      610      620      630      640      650
BcK      TTAAAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
BcMg     TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016) TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain Crh25    TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain CZ-2 16S TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain DQ-8     TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain FORT 73  TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain FORT 137 TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain HN002    TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain MHS      TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.t strain 7SA      TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.t strain X6       TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.a strain Se03     TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain CZ       TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain FORT 113. TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c strain T-o4     TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
B.c partial sequence TT-AAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTCA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
BcK      ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
BcMg     ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
BcCa_Forward
-----
B.c (Asfiah, 2016) ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain CRh25   ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain CZ-2 16S ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain DQ-8    ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain FORT 73 ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain FORT 137 ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain HN002   ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGANGAAAG TGGAAATCCA TGGTGTAGCG
B.c strain MHS     ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.t strain 7SA    ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.t strain X6     ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.a strain Se03   ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain CZ     ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain FORT 113. ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c strain T-04   ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG
B.c partial sequence ACTGGGAGAC TTGAGTGCAG AAGAGGAAAG TGGAAATCCA TG-TGTAGCG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
BcK      GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
BcMg     GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
BcCa_Forward
-----
B.c (Asfiah, 2016) GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain CRh25   GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain CZ-2 16S GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain DQ-8    GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain FORT 73 GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain FORT 137 GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain HN002   GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAN GCGACTTTCT
B.c strain MHS     GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.t strain 7SA    GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.t strain X6     GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.a strain Se03   GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain CZ     GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain FORT 113. GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c strain T-04   GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT
B.c partial sequence GTGAAATGCG TAGAGATATG GAGGAACACC AGTGGCGAAG GCGACTTTCT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770          780          790          800
BcK      GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
BcMg     GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
BcCa_Forward
-----
B.c (Asfiah, 2016) GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain CRh25   GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain CZ-2 16S GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain DQ-8    GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain FORT 73 GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain FORT 137 GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain HN002   GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain MHS     GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.t strain 7SA    GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.t strain X6     GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.a strain Se03   GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain CZ     GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain FORT 113. GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA
B.c strain T-04   GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGG-AGCA AACAGGATTA
B.c partial sequence GGTCTGTAAC TGACACTGAG CCGCGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810          820          830          840          850
BcK      GATACCCTGG -TAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGAGG
BcMg     GATACCCTGG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGAGG
BcCa_Forward
-----
B.c (Asfiah, 2016) GATACCCTGG -TAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGAGG
B.c strain CRh25   GATACCCTGG -TAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGAGG

```

<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain DQ-8</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain FORT 73</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain FORT 137</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain HN002</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain MHS</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.t strain 7SA</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.t strain X6</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.a strain Se03</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain CZ</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain FORT 113.</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c strain T-o4</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG
<b>B.c partial sequence</b>	GATACCCTGG	-TAGTCCACG	CCGTAAACGA	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		860	870	880	890	900
<b>BcK</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>BcMg</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>BcCa_Foward</b>	-----	-----	-----	-----	-----	
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain CRh25</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain DQ-8</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain FORT 73</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain FORT 137</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain HN002</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain MHS</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.t strain 7SA</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.t strain X6</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.a strain Se03</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain CZ</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain FORT 113.</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c strain T-o4</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	
<b>B.c partial sequence</b>	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		910	920	930	940	950
<b>BcK</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>BcMg</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>BcCa_Foward</b>	-----	-----	-----	-----	-----	
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	GGCCCGCACA	
<b>B.c strain CRh25</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain DQ-8</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain FORT 73</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain FORT 137</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain HN002</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain MHS</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.t strain 7SA</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.t strain X6</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.a strain Se03</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain CZ</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain FORT 113.</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c strain T-o4</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	
<b>B.c partial sequence</b>	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	G-CCCGCACA	

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
		960	970	980	990	1000
<b>BcK</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>BcMg</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>BcCa_Foward</b>	-----	-----	-----	-----	-----	
<b>B.c (Asfiah, 2016)</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAAAG	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.c strain CRh25</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.c strain CZ-2 16S</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.c strain DQ-8</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	-ACCTTACCA	
<b>B.c strain FORT 73</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.c strain FORT 137</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.c strain HN002</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.c strain MHS</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.t strain 7SA</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	
<b>B.t strain X6</b>	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAA-G	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	

```

B.a strain Se03      AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAA-G CAACGCGAAG AACCTTACCA
B.c strain CZ       AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAA-G CAACGCGAAG AACCTTACCA
B.c strain FORT 113. AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAA-G CAACGCGAAG AACCTTACCA
B.c strain T-o4     AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAA-G CAACGCGAAG AACCTTACCA
B.c partial sequence AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAA-G CAACGCGAAG AACCTTACCA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1010      1020      1030      1040      1050
BcK      GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
BcMg     GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
BcCa_Foward -----
B.c (Asfiah, 2016) GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain CRh25   GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain CZ-2 16S GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain DQ-8   GGTCTTGACA TCCTCTGACA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTTTCGGGA
B.c strain FORT 73 GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain FORT 137 GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain HN002  GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain MHS    GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.t strain 7SA   GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.t strain X6    GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.a strain Se03  GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain CZ    GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain FORT 113. GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c strain T-o4  GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA
B.c partial sequence GGTCTTGACA TCCTCTGAAA ACCCTAGAGA TAGGGCTTCT CCTT-CGGGA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1060      1070      1080      1090      1100
BcK      GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
BcMg     GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
BcCa_Foward -----
B.c (Asfiah, 2016) GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain CRh25   GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain CZ-2 16S GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain DQ-8   GCAAAGTGAC CAGGTGGTTG CATTG-----
B.c strain FORT 73 GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain FORT 137 GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain HN002  GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain MHS    GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.t strain 7SA   GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.t strain X6    GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.a strain Se03  GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain CZ    GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain FORT 113. GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c strain T-o4  GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT
B.c partial sequence GCAGAGTGAC -AGGTGGT-G CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1110      1120      1130      1140      1150
BcK      GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
BcMg     GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
BcCa_Foward -----
B.c (Asfiah, 2016) GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain CRh25   GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain CZ-2 16S GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain DQ-8   -----
B.c strain FORT 73 GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain FORT 137 GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain HN002  GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain MHS    GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.t strain 7SA   GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.t strain X6    GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.a strain Se03  GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain CZ    GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain FORT 113. GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c strain T-o4  GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA
B.c partial sequence GTTGGGTTAA GTCCCACAAC GAGCGCAACC CTTGATCTTA GTTGCCATCA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1160      1170      1180      1190      1200
BcK      TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
BcMg     TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016) TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain CRh25   TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain CZ-2 16S TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain DQ-8    -----
B.c strain FORT 73 TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain FORT 137 TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain HN002   TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain MHS     TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.t strain 7SA    TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.t strain X6     TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.a strain Se03   TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain CZ     TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain FORT 113. TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c strain T-o4   TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG
B.c partial sequence TTAAGTTGGG CACTCTAAGG TGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210      1220      1230      1240      1250
BcK      GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
BcMg     GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016) GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain CRh25   GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain CZ-2 16S GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain DQ-8    -----
B.c strain FORT 73 GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain FORT 137 GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain HN002   GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain MHS     GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.t strain 7SA    GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.t strain X6     GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.a strain Se03   GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain CZ     GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain FORT 113. GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c strain T-o4   GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC
B.c partial sequence GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT ACACACGTGC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1260      1270      1280      1290      1300
BcK      TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
BcMg     TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016) TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain CRh25   TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain CZ-2 16S TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain DQ-8    -----
B.c strain FORT 73 TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain FORT 137 TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain HN002   TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain MHS     TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.t strain 7SA    TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.t strain X6     TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.a strain Se03   TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain CZ     TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain FORT 113. TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c strain T-o4   TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC
B.c partial sequence TACAATGGAC GGTACAAAGA GCTGCAAGAC CGCGAGGTGG AGCTAATCTC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1310      1320      1330      1340      1350
BcK      ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
BcMg     ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
BcCa_Forward
B.c (Asfiah, 2016) ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain CRh25   ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG

```

```

B.c strain CZ-2 16S      ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain DQ-8         -----
B.c strain FORT 73      ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain FORT 137     ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain HN002        ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain MHS          ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.t strain 7SA          ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.t strain X6           ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.a strain Se03         ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain CZ           ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain FORT 113.    ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c strain T-o4         ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG
B.c partial sequence    ATAAAACCGT TCTCAGTTCG GATTGTAGGC TGCAACTCGC CTACATGAAG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                      1360      1370      1380      1390      1400
BcK                  CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
BcMg                 CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
BcCa_Forward         -----
B.c (Asfiah, 2016)   CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain CRh25     CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain CZ-2 16S  CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain DQ-8      -----
B.c strain FORT 73   CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain FORT 137  CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain HN002     CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain MHS       CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.t strain 7SA       CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.t strain X6        CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.a strain Se03      CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain CZ        CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain FORT 113. CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c strain T-o4      CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC
B.c partial sequence CTGGAATCGC TAGTAATCGC GGATCAGCAT GCCGCGGTGA ATACGTTCCC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                      1410      1420      1430      1440      1450
BcK                  GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
BcMg                 GGTACCTTGT ACACACC--- -----
BcCa_Forward         -----
B.c (Asfiah, 2016)   GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAG---- -----
B.c strain CRh25     GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain CZ-2 16S  GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain DQ-8      -----
B.c strain FORT 73   GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain FORT 137  GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain HN002     GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain MHS       GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.t strain 7SA       GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.t strain X6        GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.a strain Se03      GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain CZ        GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain FORT 113. GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c strain T-o4      GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA
B.c partial sequence GG-GCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA CGAGAGTTTG TAACACCCGA

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                      1460      1470      1480      1490      1500
BcK                  AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG -----
BcMg                 -----
BcCa_Forward         -----
B.c (Asfiah, 2016)   -----
B.c strain CRh25     AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGAACCCAGA
B.c strain CZ-2 16S  AGT-CGGTGG GGTAACCTTT TTGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGGGACAGAT
B.c strain DQ-8      -----
B.c strain FORT 73   AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGG-ACAGAT
B.c strain FORT 137  AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGG-ACAGAT
B.c strain HN002     AGTTCGGTGG GGTAACCTTT TTGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGGNCAAGAT
B.c strain MHS       AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG GGGACCAGAT
B.t strain 7SA       AGT-CGGTGG GGTAACCTTT TTGGAGCCAG CCGCCTAA-- -----
B.t strain X6        AGT-CGGTGG GGTAACCTTT TTGGAGCCAG CCGCCTAAG- TGACAGAAGT

```

```

B.a strain Se03      AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG TTG-AC----
B.c strain CZ       AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGAAAGATTG
B.c strain FORT 113. AGT-CGGTGG GGTAACCTTT -TGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGG-ACAGAT
B.c strain T-o4     AGT-CGGTGG GGTAACCTTT TTGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGG-ACAGAT
B.c partial sequence AGT-CGGTGG GGTAACCTTT ATGGAGCCAG CCGCCTAAGG TGGGACAGAT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....
                1510      1520      1530
BcK -----
BcMg -----
BcCa_Foward -----
B.c (Asfiah, 2016) -----
B.c strain CRh25      GT-----
B.c strain CZ-2 16S   GATTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTA-----
B.c strain DQ-8 -----
B.c strain FORT 73    GATGGGGG-- AAGTCGTACC AAGGGGCCCC -----
B.c strain FORT 137   GATGGGGG-- AAGTCGAACA AAGATGCC--
B.c strain HN002      GATTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG TA--
B.c strain MHS        GGT-----
B.t strain 7SA -----
B.t strain X6 -----
B.a strain Se03 -----
B.c strain CZ -----
B.c strain FORT 113.  GATGGGGG-- AAGTCGAACA AAGAGGGC--
B.c strain T-o4       GACTT-----
B.c partial sequence GATTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAACC-----

```

