

**PROFIL RAPD KULTUR STOK BAKTERI ENDOFIT
ANDALAS (*Morus macroura* Miq.) PENGHASIL
SENYAWA ANTIMIKROBA**



**NURUL PRATIWI
NIM. 19032146 /2019**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2023**

**PROFIL RAPD KULTUR STOK BAKTERI ENDOFIT
ANDALAS (*Morus macroura* Miq.) PENGHASIL
SENYAWA ANTIMIKROBA**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains*



**Oleh :
NURUL PRATIWI
NIM. 19032146 /2019**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2023**

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nurul Pratiwi
NIM/TM : 19032146/2019
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul “Profil RAPD Kultur Stok Bakteri Endofit Andalas (*Morus macroura* Miq.) Penghasil Senyawa Antimikroba” adalah benar merupakan karya sendiri, bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya yang ditulis dan diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 31 Maret 2023

Mengetahui,
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200642 001

Saya yang menyatakan



Nurul Pratiwi
NIM. 19032146

PERSETUJUAN SKRIPSI

PROFIL RAPD KULTUR STOK BAKTERI ENDOFIT ANDALAS (*Morus macroura* Miq.) PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA

Nama : Nurul Pratiwi
NIM/TM : 19032146/2019
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 29 Januari 2023

Mengetahui,
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200642 001

Disetujui Oleh:
Pembimbing



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200642 001

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Nurul Pratiwi
NIM/TM : 19032146/2019
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

PROFIL RAPD KULTUR STOK BAKTERI ENDOFIT ANDALAS (*Morus macroura* Miq.) PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA

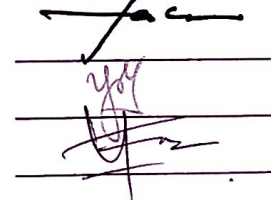
Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, 31 Maret 2023

Tim Penguji

	Nama
Ketua	: Dr. Dwi Hilda Putri, M. Biomed
Anggota	: Dr. Yuni Ahda, M. Si
Anggota	: Afifatul Achyar, M. Si

Tanda tangan



The image shows three horizontal lines representing signature lines. The top line has a signature that appears to be 'Dwi Hilda Putri'. The middle line has a signature that appears to be 'Yuni Ahda'. The bottom line has a signature that appears to be 'Afifatul Achyar'.

**Profil RAPD Kultur Stok Bakteri Endofit Andalas (*Morus macroura* Miq.)
Penghasil Senyawa Antimikroba**

Nurul Pratiwi

ABSTRAK

Bakteri endofit Andalas yang telah dieksplorasi, disimpan dalam bentuk kultur stok. Untuk mempertahankan viabilitas bakteri, perlu dilakukan peremajaan kultur stok bakteri melalui proses subkultur. Untuk mengatasi masalah kesalahan isolat pada kultur stok, maka perlu dilakukan autentikasi. Tujuan dari penelitian ini adalah 1) mengetahui kondisi optimum reaksi RAPD PCR; 2) mengetahui kemampuan primer pada reaksi RAPD PCR dalam menghasilkan profil genetik spesifik; dan 3) mengetahui stabilitas profil genetik kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba menggunakan RAPD PCR

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, yang dilaksanakan dari Agustus 2022 sampai Januari 2023 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi serta Laboratorium Penelitian, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Penentuan profil genetik spesifik dan analisis stabilitas profil genetik dilakukan menggunakan 10 primer berbeda.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi *template* optimum untuk reaksi RAPD PCR kultur stok bakteri endofit Andalas adalah 15 ng/ μ L. Primer yang digunakan dalam reaksi RAPD PCR, mampu menghasilkan profil genetik yang spesifik untuk masing – masing isolat penghasil senyawa antimikroba. Profil genetik kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba menggunakan stabil hingga *passage* ke-33.

Kata Kunci: Optimasi Konsentrasi, Profil Isolat, Stabilitas Isolat, Primer RAPD

RAPD Stock Culture Profile of Endophytic Bacteria Andalas (*Morus macroura* Miq.) Producing Antimicrobial Compounds

Nurul Pratiwi

ABSTRACT

Andalas endophytic bacteria that have been explored, stored in the form of stock culture. To maintain the viability of bacteria, it is necessary to rejuvenate the bacterial stock culture through the subculture process. To overcome the problem of isolate errors in stock culture, it is necessary to do authentication. The aims of this study were 1) to determine the optimum conditions for the RAPD PCR reaction; 2) determine the ability of the primers in the RAPD PCR reaction to produce a specific genetic profile; and 3) to determine the stability of the genetic profile of the stock culture of the Andalas endophytic bacteria producing antimicrobial compounds using RAPD PCR

This research is a descriptive research, which was conducted from August 2022 to January 2023 at the Genetics and Biotechnology Laboratory and Research Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padang State University. Determination of the specific genetic profile and analysis of the stability of the genetic profile was carried out using 10 different primers.

The results showed that the optimum template concentration for the RAPD PCR reaction for the stock culture of endophytic Andalas bacteria was 15 ng/ μ L. The primer used in the RAPD PCR reaction was able to produce a specific genetic profile for each isolate producing the antimicrobial compound. Genetic profile of the stock culture of Andalas endophytic bacteria producing antimicrobial compounds was stable until the 33-passage.

Keywords: Concentration Optimization, Isolate Profile, Isolate Stability, RAPD Primer

KATA PENGANTAR



Puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Profil RAPD Kultur Stok Bakteri Endofit Andalas (*Morus macroura* Miq.) Penghasil Senyawa Antimikroba)”. Shalawat beriring salam untuk arwah Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan umat seluruh alam.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S. Si., M. Biomed. sebagai kepala departemen biologi serta sebagai pembimbing, yang telah memberikan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Yusni Atifah, M. Si sebagai penasihat akademik.
3. Ibu Dr. Yuni Ahda, M.Si. dan Ibu Afifatul Achyar, S. Si., M. Si. sebagai tim penguji yang telah memberikan kritikan dan saran dalam penulisan skripsi ini.
4. Bapak/Ibu staf dosen departemen Biologi yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi ini.
5. Orang tua serta keluarga yang senantiasa memberikan doa serta dukungan.
6. Teman - teman penelitian udin *squad* (Mulia, Weni, Aura, Putri, Livia, Nanda, Yuni) yang telah bekerjasama selama penelitian berlangsung.
7. Sahabat (Silvi, Atiqah, Mulia, Milka, Elsa) yang telah memberikan dukungan dalam pembuatan skripsi ini.

8. Keluarga besar Biologi 2019 yang selalu memberikan dukungan serta doanya.

Semoga bantuan yang Bapak/Ibu serta rekan-rekan berikan bernilai ibadah dan mendapatkan pahala dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua orang yang membacanya.

Padang, Januari 2023

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian.....	6
D. Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
A. Bakteri Endofit Andalus Penghasil Senyawa Antimikroba.....	7
B. Kultur Stok Bakteri	10
C. Metode RAPD PCR.....	13
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	17
A. Jenis Penelitian	17
B. Waktu dan Tempat Penelitian	17
C. Alat dan Bahan	17
D. Prosedur Penelitian.....	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
A. Hasil Penelitian.....	27
B. Pembahasan	30
BAB V PENUTUP.....	34
A. Kesimpulan.....	34
B. Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Isolat Bakteri Endofit Andalas yang Memiliki Potensi Baik dalam Menghasilkan Senyawa Antimikroba	9
2. Primer RAPD yang digunakan untuk Amplifikasi DNA.....	18
3. Isolat Bakteri Endofit yang Digunakan pada Penelitian	19
4. Komposisi Campuran Reaksi PCR	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme Masuknya Bakteri Endofit ke Dalam Jaringan Inang.....	7
2. Bagan Pemeliharaan Kultur Stok.....	10
3. Stabilitas Senyawa Aktif Antibiotik Bakteri Endofit Andalas pada Subkultur <i>Passage-3</i> sampai <i>Passage-25</i>	11
4. Pewarnaan Gram Bakteri Kitinolitik.....	12
5. Morfologi Koloni Bakteri Endofit Andalas	13
6. Gradien Reaksi RAPD PCR.....	24
7. Hasil Visualisasi Elektroforesis Optimasi Reaksi RAPD PCR	27
8. Hasil Visualisasi Elektroforesis Profil Genetik RAPD Isolat Bakteri Endofit Andalas.....	28
9. Hasil Visualisasi Elektroforesis Stabilitas Profil Genetik RAPD Kultur Stok .	29

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Resistensi antimikroba merupakan salah satu dari 10 ancaman besar kesehatan masyarakat global. Menurut Murray *et al.* (2022), angka kematian global akibat resistensi antimikroba mencapai 4,95 juta jiwa/tahun. Asia Tenggara merupakan regional terbesar kedua (setelah Asia Selatan) yang mengalami kematian akibat resistensi antimikroba (1,02 juta jiwa/tahun).

Untuk mengatasi masalah resistensi mikroba, dibutuhkan suatu sumber zat antimikroba baru yang lebih efektif. Menurut Gurib-Fakim (2006), ekstrak tumbuhan berkhasiat obat merupakan salah satu sumber senyawa aktif antimikroba baru yang banyak dikembangkan. Tumbuhan biasanya mengandung produk metabolit sekunder yang bersifat antimikroba, berupa *alkaloid, polivenol, kumarin, saponin, tanin, antraguinone, triperpen*, dan *steroid* (Hemeg *et al.*, 2020). Salah satu tumbuhan yang memiliki senyawa aktif antimikroba ini adalah tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq).

Tumbuhan Andalas mengandung senyawa-senyawa turunan alkaloid jenis stilben seperti *oksiresveratrol, lunularin*, dan *andalasin A*. Disamping itu, tumbuhan ini juga mengandung *turunan 2-arilbenzofuran (morasin M), turunan kumarin (umbeliferon)*, dan β -resolsilaldehid (Soekamto *et al.*, 2003). Senyawa aktif yang dimiliki tumbuhan Andalas sudah dibuktikan kemampuannya sebagai agen antijamur, antikanker, antidiabet, antioksidan, dan antimikroba (Achmad *et al.*, 2006; Imran *et al.*, 2010; Susilowati *et al.*, 2018; Venkatesh & Seema, 2008).

Eksplorasi produksi senyawa aktif secara langsung dari tumbuhan membutuhkan biomassa sangat banyak, hal ini dikhawatirkan akan merusak sumber

daya hayati yang tersedia. Disamping itu, proses produksi senyawa aktif dari tanaman juga membutuhkan waktu yang lebih lama (Simarmata *et al.*, 2007). Penggunaan bakteri endofit dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif cara memperoleh senyawa aktif tanpa harus mengekstrak langsung dari tumbuhan.

Endofit merupakan mikroorganisme yang berada dalam jaringan tumbuhan hidup tanpa menimbulkan penyakit atau gangguan pada tumbuhan inangnya. Mikroorganisme endofit mampu memproduksi metabolit sekunder yang sama dengan tumbuhan inang (Radji, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Afifah *et al.* (2018); Putri *et al.* (2018); dan Yandila *et al.* (2018) berhasil mengisolasi bakteri endofit dari tumbuhan Andalas. Sembilan dari isolat bakteri yang diisolasi tersebut memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan mikroba uji.

Pengembangan senyawa aktif antimikroba dari bakteri membutuhkan proses yang panjang agar dapat diproduksi dalam skala industri. Kondisi optimum produksi membutuhkan proses optimasi yang luas dan waktu yang lama. Selama proses optimasi dan produksi, bakteri harus disimpan dalam bentuk kultur stok. Untuk mempertahankan viabilitas bakteri, perlu dilakukan peremajaan kultur stok bakteri melalui proses subkultur. Hasil penelitian (Rochmad, 2009), menunjukkan bahwa viabilitas isolat *Lactobacillus* sp. hanya dapat bertahan selama 2 minggu. Peremajaan isolat perlu dilakukan sebelum masa viabilitas berkurang. Proses peremajaan disebut juga dengan subkultur. Subkultur merupakan proses pemindahan mikroba dari satu medium pertumbuhan ke medium baru untuk memungkinkan mikroba tumbuh dengan baik. Frekuensi subkultur yang dilakukan sering juga disebut sebagai serial *passage* (Hammond *et al.*, 1984).

Subkultur juga dapat menyebabkan kemungkinan terjadi perubahan genetik melalui seleksi varian. Hasil penelitian Molina-Torres *et al.* (2010), semakin banyak frekuensi subkultur pada *Mycobacterium tuberculosis*, semakin meningkatkan mutasi genetik, yang selanjutnya akan menyebabkan perubahan virulensi bakteri. Penelitian lain oleh Haq (2019), menunjukkan bahwa proses subkultur menyebabkan terjadi penurunan aktivitas antimikroba bakteri endofit Andalas. Selanjutnya, menurut Machmud (2001), peremajaan bakteri melalui subkultur secara berkala juga memperbesar kemungkinan kesalahan oleh manusia (*human error*), berupa kontaminasi dan kekeliruan pemberian label. Semua kendala dalam proses subkultur akan memungkinkan untuk terjadinya kesalahan dalam pekerjaan dengan bakteri stok kultur dan bahkan bisa kehilangan isolat yang diinginkan.

Untuk mengatasi masalah kesalahan isolat pada kultur stok, maka perlu dilakukan autentikasi. Autentikasi kultur stok merupakan salah satu upaya untuk memastikan bahwa isolat yang disimpan merupakan isolat murni yang belum terkontaminasi dan sesuai dengan kondisi awal. Autentikasi sederhana dapat dilakukan melalui pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi koloni bakteri, meliputi bentuk koloni, ukuran koloni, warna koloni, dan bentuk tepian koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan melalui pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel bakteri (Fitri & Yasmin, 2011).

Autentikasi melalui pengamatan makroskopis dan mikroskopis cenderung kurang akurat. Beberapa koloni bakteri memiliki kesamaan ciri-ciri, padahal berasal dari isolat yang berbeda. Hasil pengamatan Yandila (2018) menunjukkan

bahwa bakteri endofit Andalas isolat ATB A10⁻⁴, ATB B10⁻⁴, JAT A4 dan JAT C4 memiliki ciri-ciri yang sama yaitu: warna koloni putih, tepian licin, bentuk timbul, bulat, dan berukuran sedang. Proses autentikasi kultur stok yang lebih valid perlu dilakukan dengan menggunakan pendekatan molekuler.

Pendekatan molekuler untuk autentikasi kultur stok, bisa menggunakan metode-metode yang biasa digunakan untuk karakterisasi molekuler bakteri. Metode yang biasa digunakan seperti RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat, Microsatellite*), dan RAPD (*Random-Amplified Polymorphic DNA*) (Garcia *et al.*, 2004). Masing-masing metode memiliki keunggulan dan kelemahan dalam mengkarakterisasi bakteri.

Metode RAPD merupakan metode berbasis PCR yang didasarkan pada penggunaan *random primer oligonukleotida*. Metode ini umum digunakan untuk mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme DNA pada genom dengan cepat dan efisien. Kemampuan identifikasi ini membuat metode RAPD cocok untuk studi keanekaragaman genetik, hubungan kekerabatan, serta peta genetik (Anggereini, 2008).

Analisis menggunakan metode RAPD telah dimanfaatkan dalam mengidentifikasi polimorfisme pada berbagai mikroorganisme. Berdasarkan hasil penelitian Puspitasari *et al.* (2017), metode RAPD mampu menunjukkan adanya 8 klaster bakteri pada susu sapi mastitis. Dalam penelitian lain, metode RAPD berhasil menganalisis *Escherichia coli* dalam industri es krim (Luche *et al.*, 2017) dan menemukan 2 profil isolat berbeda pada *Burkholderia cepacia* penyebab penyakit kistik fibrosis pada manusia (Furlanis *et al.*, 2010).

Berdasarkan kemampuan metode RAPD untuk menunjukkan diferensiasi yang berbeda antar isolat, maka menarik untuk diuji kemampuan metode ini dalam menghasilkan profil genetik bakteri endofit andalas. Profil RAPD yang dihasilkan akan bermanfaat sebagai proses autentikasi kultur stok bakteri yang terdapat di laboratorium dan industri secara luas. Berdasarkan besarnya kemampuan metode RAPD dalam mendeteksi polimorfisme, maka metode RAPD dapat digunakan dalam mengidentifikasi perubahan genetik isolat Bakteri Endofit.

Metode RAPD memiliki konsistensi yang kurang stabil. Hal tersebut disebabkan karena primer RAPD tidak menempel secara sempurna ke *template*, sehingga terbentuk pola pita RAPD yang samar. Inkonsistensi pola pita RAPD disebabkan beberapa faktor, diantaranya tidak tepatnya konsentrasi komponen reaksi RAPD PCR (konsentrasi primer dan konsentrasi *template*). Selain itu, kualitas dan kemurnian DNA juga ikut mempengaruhi hasil reaksi RAPD PCR (Lamboy, 1994; Padmalatha & Prasad, 2006). Hasil penelitian Pharmawati (2009) terhadap DNA tumbuhan *Grevillea spp.* menunjukkan bahwa konsentrasi DNA *template* rendah (10 – 25 ng/ μ L), menghasilkan pola pita RAPD yang stabil. Sebaliknya, konsentrasi DNA *template* tinggi (45 ng/ μ L), menyebabkan beberapa pola pita RAPD tidak teramplifikasi.

Berdasarkan uraian masalah yang telah dijabarkan, maka dilakukan penelitian dengan judul “profil RAPD kultur stok bakteri endofit Andalus (*Morus macroura* Miq.) penghasil senyawa antimikroba”.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, masalah dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimana kondisi optimum reaksi RAPD PCR dari kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba?
2. Apakah primer dalam reaksi RAPD PCR mampu menghasilkan profil RAPD spesifik untuk kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba?
3. Bagaimana stabilitas profil genetik kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba menggunakan RAPD PCR.

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui kondisi optimum reaksi RAPD PCR dari kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba.
2. Untuk mengetahui kemampuan primer pada reaksi RAPD PCR dalam menghasilkan profil genetik spesifik untuk kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba.
3. Untuk mengetahui stabilitas profil genetik kultur stok bakteri endofit Andalas penghasil senyawa antimikroba menggunakan RAPD PCR.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Menemukan metode autentikasi kultur stok bakteri secara molekuler.
2. Sebagai informasi dan bahan acuan untuk penelitian selanjutnya.