

**DESAIN PRIMER UNTUK SEKUENSING YANG AKAN MENGENALI  
DAERAH INTERNAL GEN 16S rRNA BAKTERI ENDOFIT PENGHASIL  
SENYAWA ANTIMIKROBA**

**SKRIPSI**

*Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Sains*



**DINA VANIANA  
NIM. 15032060**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2019**

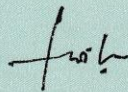
**HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI**

**DESAIN PRIMER UNTUK SEKUENSING YANG AKAN MENGENALI  
DAERAH INTERNAL GEN 16S rRNA BAKTERI ENDOFIT PENGHASIL  
SENYAWA ANTIMIKROBA**

Nama : Dina Vaniana  
Nim/ BP : 15032060/2015  
Program Studi : Biologi  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 28 Januari 2019

Disetujui oleh  
Dosen Pembimbing



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed  
NIP. 19750815 200604 2 001

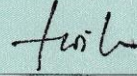


**PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI**

**Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi  
Program Studi Biologi Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Padang**

Judul : Desain Primer untuk Sekuensing yang Akan Mengenali  
Daerah Internal Gen 16S rRNA Bakteri Endofit  
Penghasil Senyawa Antimikroba  
Nama : Dina Vaniana  
NIM/TM : 15032060/2015  
Program Studi : Biologi  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 12 Februari 2019

**Tim Penguji**

	Nama	Tanda Tangan
1. Ketua	: Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.	1. 
2. Anggota	: Dezi Handayani, M.Si.	2. 
3. Anggota	: Rahmawati D, S.Pd., M.Pd.	3. 

## SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dina Vaniana  
NIM/TM : 15032060/2015  
Program Studi : Biologi  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul "**Desain Primer untuk Sekuensing yang akan Mengenali Daerah Internal Gen 16S rRNA Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba**" adalah benar hasil karya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya, pendapat yang ditulis atau 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, 12 Februari 2019

Diketahui oleh,  
Sekretaris Jurusan Biologi



Dr. Syamsurizal, M. Biomed.  
NIP. 19670901199203 1 003

Saya yang menyatakan,



Dina Vaniana  
NIM. 15032060

## ABSTRAK

**Dina Vaniana, 2019.** “Desain Primer untuk Sekuensing yang akan Mengenali Daerah Internal Gen 16S rRNA Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba”

Kemampuan bakteri endofit berinteraksi dengan inang dan dapat menghasilkan senyawa aktif membuat bakteri ini bermanfaat bagi lingkungannya. Senyawa aktif bakteri endofit memiliki kemampuan sebagai antikanker, antimikroba dan antioksidan. Terdapat gen 16S rRNA pada setiap jenis bakteri. Proses sekuensing merupakan metode yang baik digunakan untuk mengidentifikasi bakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendesain primer untuk proses sekuensing yang akan mengenali daerah gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Oktober sampai bulan Desember 2018 di Laboratorium Penelitian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Pengambilan sekuen dilakukan melalui *website National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Uji bioinformatika yang dilakukan menggunakan software BioEdit dan Primer Designer. Isolat yang digunakan sebagai cetakan DNA adalah B.J.T.A.2.1. Primer yang telah didesain dianalisis di Macrogen Singapura dan dilakukan proses sekuensing.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer yang didesain mampu digunakan untuk proses sekuensing yaitu primer NIF (*forward*) dan primer NIR (*reverse*). Proses sekuensing mampu menghasilkan sekuen yang utuh meskipun hanya  $\pm 100$  bp yang dapat dibaca dengan baik.

**Keyword:** *Bakteri endofit, Primer Internal, Sekuensing*

## KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Desain Primer untuk Sekuensing yang akan Mengenali Daerah Internal Gen 16S rRNA Bakteri Endofit 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 jurusan 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 pembimbing, yang telah memberikan waktu, fikiran dan tenaga untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini dari awal sampai akhir.
2. Bapak Dr. Syamsurizal, M. Biomed., selaku Sekretaris Jurusan Biologi dan pembimbing dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Ibu Dezi Handayani, S.Si., M.Si, dan Ibu Rahmawati D, S.Pd., M.Pd tim dosen penguji yang telah memberikan kritikan dan saran dalam penulisan skripsi ini.
4. Bapak/Ibu dosen staf Jurusan Biologi yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi ini.

5. Kepada kedua orang tua tercinta, Ibunda Nila Erminda dan Ayahanda Saidina Umar (alm) untuk doa dan dukungan yang selalu mengiringi setiap langkah penulis.
6. Keluarga yang senantiasa memberikan doa serta dukungan.
7. Semua teman-teman di grup penelitian, Kak jia, Anggi, Iffa, Ami, Nada, Anti, Mutia, Yanti, Fatmil, Caca, Mita, Jani, Afif, dan Apis untuk semua dukungan dan bantuannya. Penulis bersyukur bisa berproses bersama kalian dalam penulisan skripsi ini.
8. Keluarga besar Biologi Sains 2015 yang selalu memberikan dukungan, bantuan serta doanya.

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

Padang, 12 Februari 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b>	
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	
<b>SURAT PERNYATAAN</b>	
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>i</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	5
C. Tujuan Penelitian .....	6
D. Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Bakteri Endofit pada Tumbuhan Penghasil Senyawa Antimikroba .....	7
B. Identifikasi Bakteri .....	10
C. Sekuensing Daerah 16S rRNA Bakteri .....	11
D. Desain Primer .....	15
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b>	
A. Jenis Penelitian .....	17
B. Waktu dan Tempat .....	17
C. Alat dan Bahan .....	17
D. Prosedur Penelitian .....	18
1. Persiapan penelitian .....	18
2. Pelaksanaan Penelitian .....	19
E. Analisis Data .....	22
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
A. Hasil Penelitian.....	23
B. Pembahasan .....	30
<b>BAB V. SIMPULAN DAN SARAN</b>	
A. Kesimpulan .....	35
B. Saran .....	35
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>36</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>41</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba.....	9
2. Karakteristik <i>Sequencing</i> dengan Metode Sanger.....	15

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Kolonisasi Bakteri Endofit pada Setiap Organ Tumbuhan .....	8
2. Pemetaan Daerah Homogen dan Heterogen pada Gen 16S rRNA Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba .....	23
3. <i>Alignment</i> Primer Forward dengan Sekuen Gen 16S rRNA Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba .....	25
4. <i>Alignment</i> Primer Reverse dengan Sekuen Gen 16S rRNA Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba .....	27
5. Hasil Elektroforesis Produk PCR .....	28
6. Kromatogen Hasil Sekuensing .....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Hasil Desain Awal Primer Menggunakan Software Primer Designer .....	41
2. Kromatogram Hasil Sekuensing dengan Primer NIF dan NIR .....	45

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang hidup dalam jaringan tumbuhan dan berinteraksi dengan inangnya tanpa menyebabkan infeksi (Kumala, 2009). Bakteri endofit yang terdapat di dalam jaringan tumbuhan diketahui dapat memicu pertumbuhan dan berperan sebagai agen pengendali hayati. Bakteri ini mampu melakukan penetrasi ke jaringan internal tumbuhan, karena menghasilkan enzim ekstraseluler berupa selulase. Selain digunakan untuk menghidrolisis dinding ekstraseluler sel, enzim ini juga digunakan untuk masuk ke ruang antar sel melalui korteks akar (Eliza, 2007; Reinhold-Hurek, 2006). Kemampuan bakteri endofit berinteraksi dengan inang dan dapat menghasilkan senyawa aktif membuat bakteri ini bermanfaat bagi lingkungannya. Senyawa aktif bakteri endofit memiliki kemampuan sebagai antikanker, antimikroba dan antioksidan (Singh, 2013).

Beberapa jenis bakteri endofit sudah diisolasi dari berbagai jenis tanaman dan mampu menghasilkan senyawa aktif antimikroba. Penelitian yang dilakukan oleh Afifah (2018), Putri (2018) dan (Yandila, 2018) berhasil mengisolasi beberapa jenis bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba dari tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.). Hasil penelitian Sagita (2017), mengemukakan bahwa isolat bakteri endofit yang diisolasi dari daun sirih (*Piper betle*) memberikan zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Salah satu tahapan yang harus dilakukan dalam penelitian mengenai bakteri endofit adalah proses isolasi dan identifikasi bakteri. Identifikasi penting dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri endofit yang telah diisolasi. Identifikasi bakteri yang baik berguna untuk memudahkan dalam komunikasi ilmiah dan mempelajari karakter bakteri lebih spesifik, sehingga dapat dikembangkan menjadi penelitian yang lebih maju. Identifikasi bakteri endofit dapat dilakukan secara konvensional, yaitu dengan cara pengamatan karakter morfologis, fisiologis, dan biokimiawi bakteri uji. Proses identifikasi dengan metode ini bersifat terbatas karena waktu yang dibutuhkan lebih lama dan memiliki tingkat sensitivitas yang rendah. Bakteri mampu mengubah karakteristik morfologis dan biokimia secara tiba-tiba karena perubahan lingkungan atau mutasi genetik (Bakri, 2015; Sakhno, 2016).

Identifikasi berbasis molekuler dapat digunakan untuk mengatasi kelemahan identifikasi secara konvensional, karena memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Amman, 1995). Hasil penelitian Aabo (1995) mengemukakan bahwa identifikasi dengan metode molekuler memiliki sensitivitas sebesar 92% sedangkan dengan metode biokimia hanya 50%. Teknik identifikasi bakteri secara molekuler dapat berupa hibridisasi *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA), *Array* Oligonukleotida, dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik PCR dapat menjadi dasar dalam uji *fingerprinting*, PCR-multipeks, Real-time PCR dan analisis sekuensing DNA (Dwiyitno, 2010)

Analisa sekuensing DNA merupakan teknik dalam penentuan urutan basa nukleotida suatu molekul DNA. Urutan basa nukleotida DNA memiliki informasi

paling mendasar suatu gen karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan makhluk hidup (Lokapirnasari, 2017). Metode sekuensing memiliki akurasi dan reliabilitas yang sangat tinggi, sehingga lebih mudah dalam mengidentifikasi suatu jenis bakteri.

Metode sekuensing yang paling banyak digunakan untuk identifikasi bakteri adalah analisis sekuensing gen *16S ribosomal Ribonucleic Acid* (rRNA). Prokariot memiliki 3 jenis rRNA dengan ukuran nukleotida berbeda yaitu 5S, 16S dan 23S. Gen 5S rRNA memiliki ukuran nukleotida 120 *base pair* (bp), sehingga tidak efisien digunakan untuk identifikasi. Sebaliknya gen 23S rRNA memiliki ukuran nukleotida sebesar 2900 bp, sehingga sulit untuk disekuensing. Gen 16S rRNA adalah yang paling memenuhi syarat dan memiliki nukleotida sebesar 1500 bp, yang terdiri dari daerah yang konservatif dan variatif (Clarridge, 2004; Rinanda, 2011).

Proses sekuensing yang umum dilakukan saat ini adalah menggunakan metode Sanger. Sekuensing metode Sanger merupakan metode sekuensing DNA berdasarkan penggabungan selektif rantai-terminating dideoksi oleh DNA *polimerase* selama replikasi *in vitro*. Metode sekuensing ini memerlukan beberapa komponen reaksi, salah satu yang penting adalah satu buah primer spesifik. Proses sekuensing biasanya dilakukan secara dua arah menggunakan primer yang dipakai untuk mengamplifikasi cetakan DNA (*forward* dan *reverse*), atau disebut juga primer eksternal (Lokapirnasari, 2017).

Secara teori, panjang sekuen yang dapat dibaca satu kali proses sekuensing berkisar antara 1000-1500 bp (Tasma, 2016). Namun dalam pelaksanaan,

biasanya rata-rata panjang nukleotida yang berhasil dibaca dalam satu kali sekuensing hanya sekitar 400-900 bp. Beberapa faktor yang mempengaruhi pembacaan hasil sekuensing adalah kemurnian cetakan PCR, kualitas enzim yang digunakan, ketepatan reaksi, akurasi primer dan lain-lain. Dengan keterbatasan pembacaan hasil sekuensing ini, jika gen 16S rRNA yang memiliki panjang 1500 bp disekuensing dengan primer eksternal, maka akan terdapat daerah di bagian tengah yang tidak akan terbaca oleh sekuensing yang dilakukan.

Solusi yang dapat dilakukan untuk mendapatkan sekuen nukleotida gen 16S rRNA yang utuh adalah dengan merancang primer internal. Primer internal *forward* dan *reverse* akan memulai proses sekuensing dari bagian tengah gen 16S rRNA ke arah *upstream* dan *downstream*, sehingga diharapkan tidak ada bagian yang luput dari pembacaan sekuensing. Morales (2009) telah merancang primer internal untuk melihat spesivitas primer berbasis 16S rRNA. Hasil pengujian secara *in silico* menunjukkan bahwa beberapa primer memiliki tingkat spesifikasi yang rendah. Hal ini karena desain primer yang dibuat dalam bentuk *degenerate primers*. Primer dalam bentuk *degenerate* memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tidak mudah diamplifikasi pada tahapan PCR selama sekuensing.

*Degenerate primers* merupakan campuran urutan oligonukleotida dimana pada beberapa posisi mengandung sejumlah kode yang dapat mengenali lebih dari satu jenis basa nitrogen. Primer dengan jenis *degenerate* biasanya dibuat untuk primer-primer yang bekerja secara universal, yang akan mengenali semua/sekelompok besar jenis bakteri. Jumlah *degenerate* dapat dikurangi dengan membatasi jenis bakteri yang akan diidentifikasi. Berdasarkan studi literatur yang

dilakukan, hanya 12 genus bakteri yang umum ditemukan sebagai bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba (Amman, 1995; Castillo, 2002; Kandel, 2017; Murthi, 2015; Sagita, 2017; Setiawan, 2018; Sukiman & Nuriyanah, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh (Walters *et al.*, 2016) menyebutkan bahwa sering diperbaharainya database gen 16S rRNA bakteri mempengaruhi efisiensi primer PCR yang sudah ada. Pengoptimalan database gen 16S rRNA juga merupakan alasan lain untuk perancangan primer secara berkala.

Mendesain suatu primer untuk proses PCR/sekuensing perlu memperhatikan beberapa parameter, seperti kandungan GC dalam kisaran 40-60%, harus terbebas dari pembentukan struktur sekunder yang terjadi akibat tumpang tindih dengan primer lainnya dan lain-lain (Borah, 2011). Untuk membantu dalam perancangan primer yang baik, dapat digunakan *software* bioinformatik (Judelson, 2006).

Berdasarkan penjelasan yang telah disampaikan, maka peneliti akan mendesain primer internal yang spesifik yang dapat mengenali daerah 16S rRNA pada bakteri untuk mendapatkan hasil yang optimal selama sekuensing. Penelitian yang akan dilakukan mengikat judul “Desain primer untuk sekuensing yang akan mengenali daerah internal gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba”.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah, rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana analisis bioinformatik daerah gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba?



2. Bagaimana desain primer yang tepat untuk sekuensing yang akan mengenali daerah internal gen 16S rRNA pada bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba?
3. Apakah primer yang didesain dapat digunakan untuk sekuensing daerah gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba secara utuh?

### **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menganalisis secara bioinformatik daerah gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba.
2. Mengetahui desain primer yang tepat untuk sekuensing yang akan mengenali daerah internal gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba.
3. Mengetahui kemampuan primer yang didesain dalam mensekuensing daerah gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba secara utuh.

### **D. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini:

1. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat mempermudah dalam mengenali gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba.
2. Menambah ilmu dalam bidang bioinformatika dan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.