
Analysis Internal Primer Of Genes 16s Rrna Endophytic Bacteria Producing Compound Antimicrobial For Sequencing

Dina Vaniana, Dwi Hilda Putri

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang

Vaniana61@gmail.com

Abstract. Endophytic bacteria can produce active compounds that function as antitumor, antioxidant and antimicrobial. The steps taken can be done for the use of endophytic bacteria is identification of bacteria. Endophytic bacteria have a 16S rRNA gene. The most widely used technique for identification is DNA sequencing. For the sequencing process it takes a primer that can read 1500 bp sequences. The purpose of this study was to obtain primers who could read the internal area of the 16S rRNA gene and be able to be used in the sequencing process. This research uses BioEdit software and Primer Designer. The isolate used as a DNA template in the sequencing process is B.J.T.A.2.1. DNA template were amplified using the PCR method. The results of PCR products were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis. The sequencing process is carried out with NIF (forward) and NIR (reverse) primers. The results showed that the primer could recognize the 16S rRNA internal region of the antimicrobial compound endophytic bacteria. Both primers are able to start the sequencing process and produce a sequence of 1130 bp. However, good sequence readings were only ± 100 bp due to contamination of DNA template.

Katakunci : bakteri endofit, gen16S rRNA, primer internal



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2017 by author and Universitas Negeri Padang.

1. PENDAHULUAN

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang hidup dalam jaringan tumbuhan dan berinteraksi dengan inangnya tanpa menyebabkan infeksi (Kumala, 2008). Bakteri endofit mampu menghasilkan senyawa aktif yang berfungsi sebagai antitumor, antioksidan dan antimikroba (Beck, 2003; Castillo, 2003; Simanjuntak, 2004).

Hasil penelitian Azizah (2017), mengemukakan bahwa isolat bakteri endofit yang diisolasi dari daun sirih (*Piper betle*). Afifah (2018), Putri (2018) dan Yandila (2018) juga sudah berhasil dalam mengisolasi beberapa jenis bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba dari tumbuhan Andalus (*Morus macroura* Miq.). Tahapan yang dilakukan dapat dilakukan untuk penggunaan bakteri endofit adalah identifikasi bakteri. Bakteri

memiliki daerah yang bersifat universal yang dapat digunakan sebagai identifikasi bakteri yaitu daerah gen 16S rRNA.

Teknik yang paling banyak digunakan untuk identifikasi adalah sekuensing DNA. Terdapat beberapa komponen yang dibutuhkan untuk sekuensing DNA, salah satunya adalah primer. Primer berfungsi sebagai pembatas sekuen DNA target yang akan diamplifikasi (Handoyo, 2000). Primer yang biasa digunakan dalam proses sekuensing adalah primer eksternal, namun hanya dapat membaca ± 600 bp. Secara teori, panjang sekuen yang dapat dibaca satu kali proses sekuensing berkisar antara 1000-1500 bp (Tasma, 2016). Dibutuhkannya suatu primer yang dapat mengenali daerah gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba untuk proses sekuensing DNA. Primer yang digunakan harus memiliki kriteria primer yang baik. Kriteria tersebut meliputi: panjang primer, %GC, *melting temperature* (T_m), interaksi primer (*dimer* dan *hairpin*), stabilitas primer, *runs*, dan *false priming* (Henegariu, 1997).

Primer yang didesain dalam bentuk *degenerate primer* yang dapat mengenali lebih dari satu basa nukleotida. Morales (2005), telah merancang primer internal untuk melihat spesifisitas primer berbasis 16S rRNA. Hasil pengujian secara *in silico* menunjukkan bahwa beberapa primer memiliki tingkat spesififikasi yang rendah. Hal ini karena desain primer yang dibuat dalam bentuk *degenerate primers*. Primer dalam bentuk *degenerate* memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tidak mudah diamplifikasi pada tahapan PCR selama sekuensing. Penggunaan *degenerate* dapat diminimalisir agar mendapatkan primer yang bersifat universal dan memiliki spesifisitas yang baik.

Primer dengan jenis *degenerate* biasanya dibuat untuk primer-primer yang bekerja secara universal. Berdasarkan studi literatur terdapat beberapa genus bakteri endofit yang umum ditemukan sebagai penghasil senyawa antimikroba. Penelitian ini akan mendesain primer yang dapat mengenali daerah internal gen 16S rRNA dan menganalisis primer tersebut untuk proses sekuensing DNA.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan dan Alat

Seperangkat komputer dengan *software* untuk analisis gen 16S rRNA bakteri endofit yaitu BioEdit version 7.0.9.0., Primer Designer version 2.0. untuk melihat karakteristik primer internal, dan koneksi internet ke database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menu genome dan *nucleotide*. Proses PCR dilakukan untuk menyiapkan grafik PCR yang akan menjadi cetakan dalam proses sekuensing. Alat yang dibutuhkan untuk proses PCR adalah aluminium foil, autoklaf, beaker glass, cawan petri, erlenmeyer, lampu bunsen, jarum

ose, *microwave*, tabung reaksi, vortex, timbangan analitik, *waterbath*, *wrapping*, tabung *eppendorf*, mikropipet, sentrifuse, mesin PCR, mesin Elektroforesis, dan gel doc elektroforesis (UVITEC FIREREADER V10). Bahan yang dibutuhkan adalah isolat B.J.T.A.2.1, TAE 1X, EtBr, *loading dye*, agarose dan mix PCR.

2.2 Desain Primer

Pengambilan data sekuen DNA dilakukan melalui website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menu genome dan nucleotide. Sekuen yang diambil adalah gen 16S rRNA dari bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba. Bakteri endofit yang diambil adalah perwakilan dari genus-genus yang diketahui mampu menghasilkan senyawa antimikroba (berdasarkan studi literatur yang dilakukan). Perwakilan setiap genus diambil sebanyak dua spesies. Sekuen gen 16S rRNA bakteri yang diperoleh disimpan di komputer dalam *software* BioEdit version 7.0.9.0.

Sekuen gen 16S rRNA di *alignment* menggunakan *software* BioEdit version 7.0.9.0. menu *ClustalW Multiple*. Setelah proses *alignment*, ditentukan daerah homogen dari semua sekuen untuk dijadikan sekuen target dalam mendesain primer untuk proses sekuensing. Primer yang telah didesain (*forward* dan *reverse*) dianalisis menggunakan *software* Primer Designer version 2.0. Primer dapat dikatakan baik apabila sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan.

2.3 Sekuensing

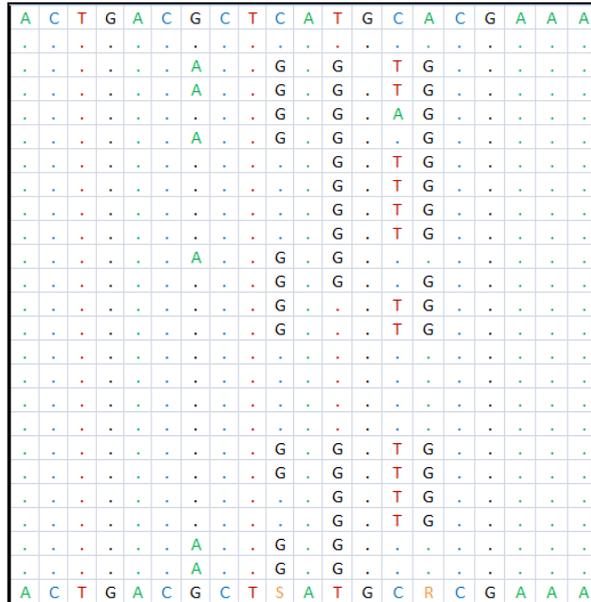
Dibutuhkannya cetakan DNA untuk proses sekuensing. PCR bakteri yang digunakan untuk cetakan PCR diisolasi dari isolat B.J.T.A.2.1 bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba yang tersedia di laboratorium Penelitian Biologi FMIPA UNP. Hasil analisis yang menunjukkan pita DNA, dapat digunakan sebagai cetakan DNA untuk proses sekuensing. Sekuensing dilakukan di Macrogen Singapura dan dianalisis pada *software* BioEdit.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

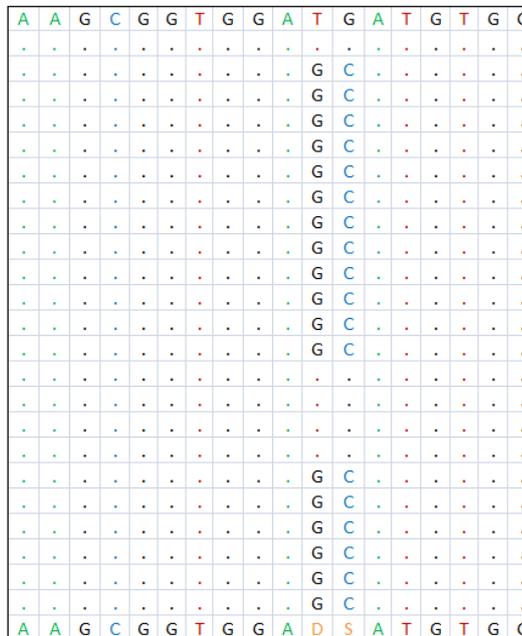
3.1.1 Primer Internal

Hasil analisis menunjukkan bahwa primer *forward* dan *reverse* yang sesuai dengan kriteria adalah primer NIF dan NIR. Primer yang telah didesain memiliki beberapa daerah yang bervariasi setelah dilakukan proses *alignment* dengan sekuen gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba. Variasi dari sekuen gen 16S rRNA menyebabkan primer didesain dalam bentuk *degenerate*.



Gambar 1. Variasi Basa Nukleotida Sekuen Gen 16S rRNA Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba dengan Primer *Forward*

Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa terdapat 5 variasi basa nukleotida pada sekuen. Penggunaan *degenerate* ditetapkan pada sekuen primer *forward* basa ke-10 dan ke-15. Simbol yang digunakan untuk variasi basa ke-10 adalah S yang dapat membaca basa nukleotida C dan G. Selanjutnya pada basa ke-15 simbol yang digunakan adalah R yang dapat membaca basa nukleotida G dan A.

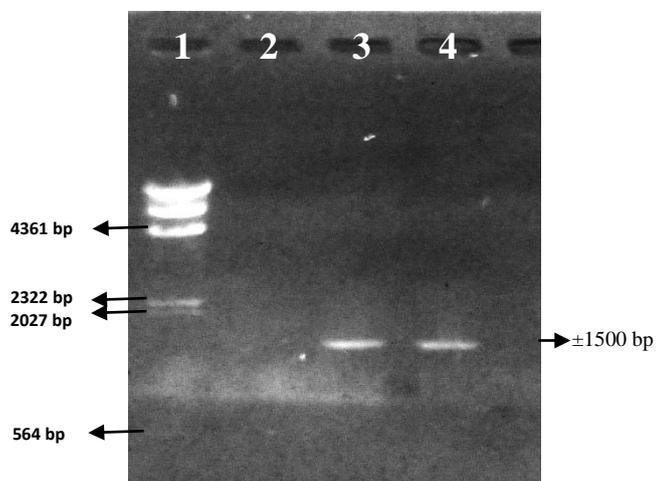


Gambar 2. Variasi Basa Nukleotida Sekuen Gen 16S rRNA Bakteri Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba dengan Primer *Reverse*

Variasi basa nukleotida pada sekuen primer *reverse* (NIR) lebih sedikit dibandingkan primer *forward* (NIF). Variasi berada pada posisi basa nukleotida ke-11 dan ke-12. Simbol yang digunakan untuk variasi basa ke-11 adalah D yang dapat membaca basa nukleotida G dan T. Pada basa ke-12 digunakan simbol S yang dapat membaca basa nukleotida G dan C.

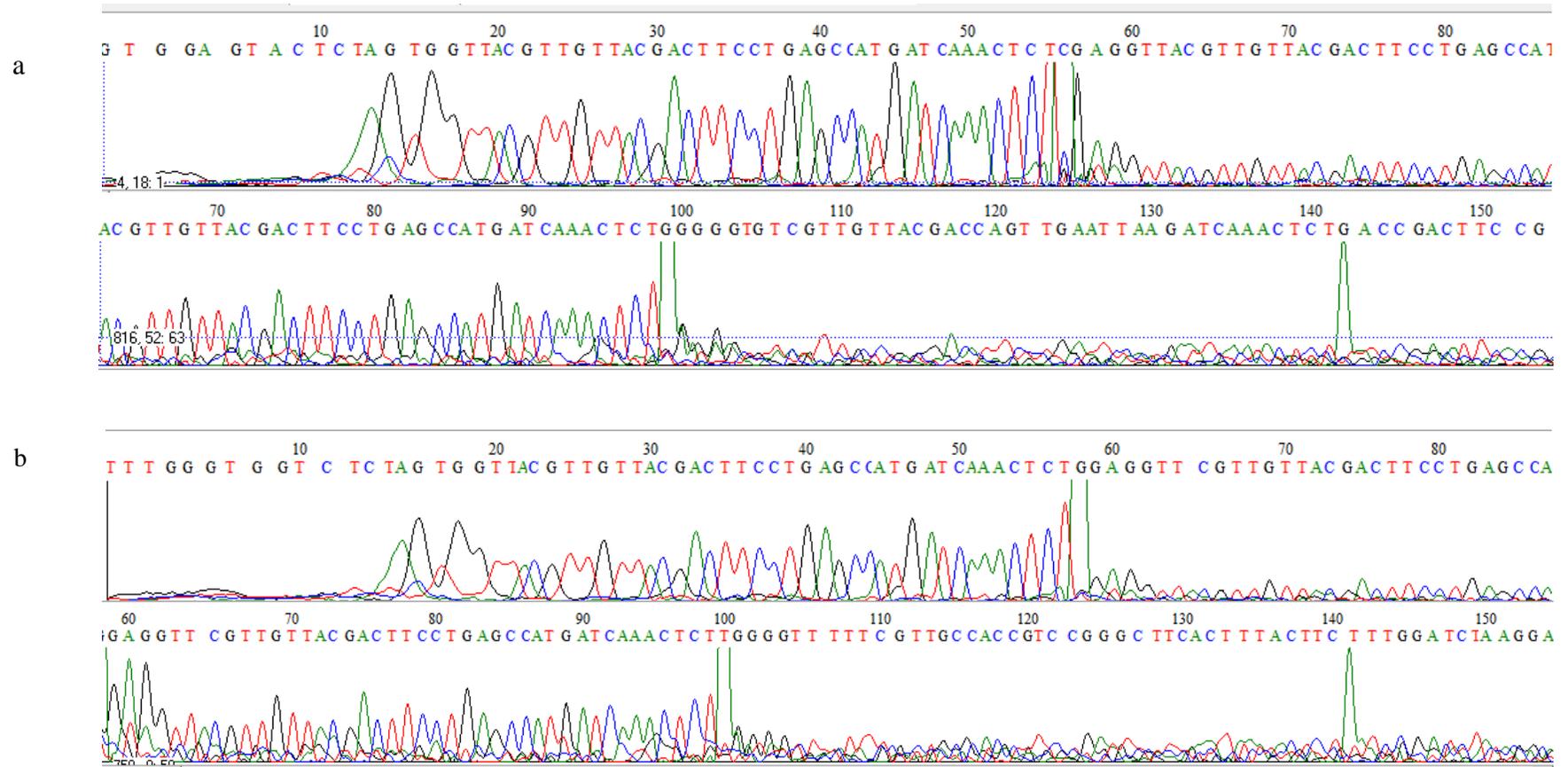
3.1.2 Sekuensing

Untuk sekuensing dibutuhkan cetakan DNA yang disintesis melalui reaksi PCR menggunakan pasangan primer eksternal universal untuk gen 16S rRNA yaitu 27F (*forward*) dan 1492R (*reverse*). Hasil PCR dianalisis menggunakan metode elektroforesis pada agarose 1%. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil elektroforesis produk PCR. 1: Marker λ *Hind*III. 2: Kontrol negatif. 3: Kontrol positif. 4: Isolat B.J.T.A.2.1

Berdasarkan Gambar 3 dapat dilihat bahwa terbentuknya pita DNA dari isolat yang digunakan. Pita DNA berada di antara panjang marker 564 bp dan 2027 bp, sehingga dapat diperkirakan bahwa panjang pita DNA ± 1500 bp. DNA dari isolat B.J.T.A.2.1 ini dapat dijadikan sebagai cetakan untuk proses sekuensing. Hasil analisis pada Gambar 4 menunjukkan bahwa proses sekuensing dapat berjalan dengan baik menggunakan primer NIF dan NIR yang telah didesain. Hasil bacaan sekuensing yang didapatkan sepanjang 1130 bp.



Gambar 6. Kromatogen Hasil Sekuensing; a) Produk primer *forward*. b) Produk primer *reverse*

3.2 PEMBAHASAN

Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan senyawa aktif sebagai antimikroba membuat bakteri ini baik untuk dilakukan identifikasi secara molekuler. Sekuensing merupakan metode yang paling tepat untuk mengidentifikasi sekuen daerah gen 16S rRNA pada bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba. Pada metode sekuensing diperlukannya beberapa komponen penting yang dapat membantu keberhasilan metode ini, diantaranya yaitu primer yang dapat mengenali daerah gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba.

Penelitian ini telah berhasil mendesain 2 buah primer internal yaitu primer *forward* (NIF) dan primer *reverse* (NIR). Masing-masing panjangnya 20 bp (5'ACTGACGCTCATGCACGAAA3') untuk primer NIF dan 18 bp (5'AAGCGGTGGATGATGTGG3') untuk primer NIR. Kedua primer ini telah dilakukan *alignment* menggunakan program BioEdit dengan sekuen gen 16S rRNA bakteri penghasil senyawa antimikroba. Hasil *alignment* menunjukkan bahwa terdapatnya variasi pada basa nukleotida sehingga primer harus didesain dalam bentuk *degenerate* untuk masing-masing primer (Gambar 1 dan Gambar 2).

Primer NIF menggunakan simbol S dan R, sedangkan primer NIR menggunakan Simbol S dan D sebagai simbol *degenerate*. *Degenerated primer* pada primer NIF ditetapkan berada pada basa nukleotida ke-10 pada sekuen primer, dimana pada daerah ini terdapat 2 jenis basa nukleotida yaitu C dan G. Berdasarkan variasi tersebut, maka basa nukleotida primer *forward* pada basa ke-10 diubah menjadi simbol S. Variasi selanjutnya berada pada basa nukleotida ke-15 pada sekuen primer, dimana pada daerah ini terdapat 2 jenis basa nukleotida yaitu A dan G.

Variasi basa nukleotida pada daerah target primer *reverse* lebih sedikit dibandingkan primer *forward* yaitu hanya 2 basa nukleotida (Gambar 4). *Degenerated primer* ditetapkan berada pada basa nukleotida ke-11 pada sekuen primer, dimana pada daerah ini terdapat 2 jenis basa nukleotida yaitu T dan G. Berdasarkan variasi tersebut, maka basa nukleotida primer *reverse* pada basa ke-11 diubah menjadi simbol D. Variasi selanjutnya berada pada basa nukleotida ke-12 pada sekuen primer, dimana pada daerah ini terdapat 2 jenis basa nukleotida yaitu C dan G. Berdasarkan variasi tersebut, maka basa nukleotida primer *reverse* pada basa ke-12 diubah menjadi simbol S. Berdasarkan variasi tersebut, maka basa nukleotida primer *forward* pada basa ke-15 diubah menjadi simbol R. Menurut Omar (2014) *degenerate primer* dapat berupa S (G, C), N (A, G, C, T), V (A, G, C), D (A, G, T), R (A, G), B (G, C, T), M (A, T), dan W (A, T).

Proses sekuensing merupakan menentukan susunan basa (A, T, G, dan C) yang membentuk DNA. Sekuensing DNA dimodifikasi dari amplifikasi DNA pada PCR. Untuk

sekuensing dibutuhkan cetakan DNA yang disintesis melalui reaksi PCR menggunakan pasangan primer eksternal universal untuk gen 16S rRNA yaitu 27F (*forward*) dan 1492R (*reverse*). Hasil PCR dianalisis menggunakan metode elektroforesis pada agarose 1%. Penggunaan agarose 1% ini disesuaikan dengan panjang sekuen cetakan DNA yang digunakan. Terbentuknya pita DNA menunjukkan bahwa DNA dapat dilanjutkan untuk proses sekuensing.

Hasil dari sekuensing menunjukkan bahwa primer yang telah didesain mampu menghasilkan sekuen sampai 1130 bp. Proses sekuensing menghasilkan panjang sekuen lebih dari 1000 bp menandakan bahwa primer NIF dan primer NIR dapat bekerja dengan baik. Namun, sekuen hanya dapat dibaca hanya ± 100 bp saja untuk masing-masing primer. Hal ini kemungkinan diakibatkan oleh tercemarnya DNA cetakan saat proses isolasi DNA. Kemungkinan lainnya karena isolat yang memang sulit untuk dilakukan proses sekuensing sehingga grafik tidak terbaca dengan baik.

4. KESIMPULAN

Primer yang telah didesain mampu mengenali daerah internal gen 16S rRNA bakteri endofit penghasil senyawa antimikroba. Primer NIF dan NIR dapat juga digunakan dalam proses sekuensing meskipun hanya ± 100 bp dari sekuen yang dapat dibaca dengan baik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M. Biomed. Sebagai pembimbing yang telah banyak menyediakan waktu, tenaga, pikiran dan kesabaran dalam memberikan bimbingan, arahan, saran, dan motivasi dalam menyelesaikan penelitian ini. Terimakasih juga kepada teman-teman yang sudah membantu dan memberikan dukungan dalam penelitian ini dan kepada orang tua serta keluarga yang selalu mendukung dan memberikan semangat dan doa.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, N. I. D. H. P. (2018). Isolation and Identification of Endophytic Bacteria from the Andalas Plant Stem (*Morus macroura* Miq.). *Bioscience*, 72-75.
- Azizah, N. (2017). Isolasi Bakteri Endofit dari Daun Sirih (*Piper betle* L.) sebagai senyawa antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal IPTEK Terapan*, 65-74.
- Beck, H. C., Hansen, A. M., Lauritsen, F. R. (2003). Novel pyrazine metabolites found in polymyxin biosynthesis by *Paenibacillus polymyxa*. *FEMS microbiology letters*, 220(1), 67-73.

- Castillo, U., Harper, J. K., Strobel, G. A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H. (2003). Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS microbiology letters*, 224(2), 183-190.
- Handoyo, D. D. (2000). Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 17-29.
- Henegariu, O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vancee and P. H. Vogt. (1997). Multiplex PCR: Critical by Step Protocol. *BioTechniques*, 23, 504-511.
- Kumala, S. M. (2008). Fermentasi goyang dan diam isolat bakteri endofit buah makassar (*Brucea javanica* L. Merr) dan uji aktivitas antimikrobanya. Yogyakarta: Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia.
- Morales, S. E. A. H. W. E. (2005). Empirical Testing of 16S rRNA Gene PCR Primer Pairs Reveals Variance in Target Specificity and Efficacy Not Suggested by In Silico Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2677-2683.
- Omar, H. S., Salah El-Din El-Assal, Ebtissam H. A. Hussein and Mohamed H. Soliman. (2014). Identification And Characterization Of The Trehalose Gene (Otsa) In Some Pathogenic Bacteria Using An In Silico Approach. *International Journal of Advanced Research*, 2(11), 403-412.
- Putri, M. F., Mades Fifendy, Dwi Hilda Putri. (2018). Diversitas Bakteri Endofit Pada Daun Muda dan Tua Tumbuhan Andaleh (*Morus macroura* Miq.). *Eksakta*, Vol 19 No. 1.
- Tasma, I. (2016). Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom Untuk Mempercepat Program Pemuliaan Tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian*, 34, 159-168.
- Yandila, S. (2018). Isolasi Bakteri Endofit dari Akar Tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.) dan Uji Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. FMIPA UNP, Padang.