

BAB VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Isolasi Bakteri Endofit

Sampel buah cabai rawit dilakukan untuk menghilangkan mikroorganisme epifit yang terdapat pada permukaan jaringan tumbuhan, sehingga koloni yang diperoleh merupakan koloni endofit yang berasal dari dalam jaringan tumbuhan (Larran *et.al.*, 2001). Penggunaan alkohol bertujuan untuk mensterilkan bagian permukaan buah, dengan merusak lapisan membran sel mikroorganisme. Alkohol dapat melarutkan lipid dan mendenaturasi protein yang ada pada membran sel. Hal tersebut dapat mengganggu fungsi membran sel dalam mengatur transportasi cairan ke dalam sel sehingga sel mikroorganisme yang masih menempel akan mengalami lisis (McDonnell and Russell, 2001). Kemampuan alkohol pada permukaan cabai untuk mensterilkan permukaan organ tumbuhan, diperlukan kombinasi dengan bahan kimia lainnya.

Bahan kimia kombinasi yang digunakan adalah natrium hipoklorit (NaOCl). Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme dengan cara mengganggu proses oksidasi dari enzim-enzim penting sehingga fungsi metabolisme dari sel tersebut terganggu dan sel mikroorganisme tidak dapat tumbuh (Valera *et.al.*, 2009 ; Sforza *et.al.*, 2018). Isolasi mikroba endofit dari hasil pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} selama 2x24jam pada tanaman cabai rawit (*Capsicum annuum*) menghasilkan 8 isolat. Isolat yang tumbuh kemudian diisolasi pada media baru menggunakan metode *streak plate* untuk memperoleh isolat murni.

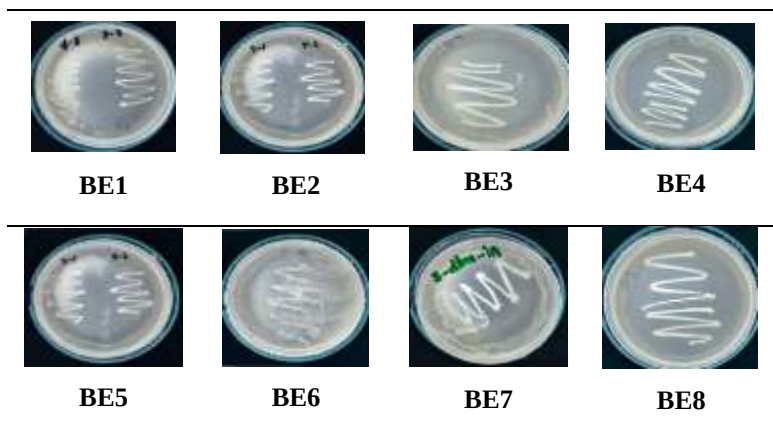
VI.2 Identifikasi Bakteri Endofit Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Identifikasi bakteri endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis dapat diamati bentuk morfologi yang berbeda dari koloni bakteri endofit yang berkolonisasi pada masing-masing isolat. Pengamatan makroskopis dilakukan terhadap koloni isolat murni, meliputi: bentuk, tepi koloni dan warna. Isolasi bakteri bertujuan untuk memisahkan bakteri dari kultur campuran sehingga diperoleh koloni murni. Isolat bakteri endofit yang diambil untuk di subkultur adalah koloni yang dominan (Hadioetomo, 1995). Hal ini dilakukan secara terus-menerus hingga diperoleh koloni murni. Koloni murni adalah koloni yang memiliki morfologi yang sama karena berasal dari pembelahan suatu sel yang sama (Waluyo, 2005).

Pengamatan secara mikroskopis dapat dilakukan dengan pewarnaan Gram yang bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri yang diperoleh agar dapat diklasifikasikan sebagai bakteri Gram-positif atau Gram-negatif. Sebelum dilakukan pewarnaan terlebih dahulu dilakukan fiksasi. Hal ini dilakukan untuk merekatkan sel mikroba pada gelas objek serta membunuh mikroorganisme secara cepat dengan tidak menyebabkan perubahan-perubahan bentuk dan strukturnya. Pewarnaan menggunakan kristal violet digunakan sebagai pewarna primer. Zat warna dari Kristal violet didiamkan selama beberapa menit dan zat warna yang berlebihan dibuang dan ditambahkan iodine. Bakteri Gram-positif akan menunjukkan warna ungu yang

disebabkan warna kristal violet-iodium tetap dipertahankan meskipun diberikan larutan pemucat. Hal tersebut dikarenakan iodium dapat membentuk ikatan kompleks berwarna coklat kehitaman yang sukar larut. Bakteri Gram negatif memiliki komponen dinding sel yang sebagian besar tersusun lapisan lipid, sehingga pada saat pewarnaan kurang dapat mempertahankan zat warna utama terutama pada saat dicuci dengan alkohol (lipid rusak pada saat dicuci dengan alkohol) sehingga hasil akhir yang terlihat dari koloni bakteri ini berwarna merah. Dapat disimpulkan perbedaan sifat Gram terletak dari sifatnya menyerap pewarna.

Bakteri Gram-positif memiliki dinding peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan bakteri Gram-negatif (Karimela *et.al.*, 2018). Berdasarkan hasil pemurniaan dan pewarnaan Gram, dihasilkan 8 isolat murni dengan kode BE1 sampai BE8 seperti pada Gambar VI.1. Isolat BE1 adalah Gram-positif dengan bentuk kokus, Isolat BE2, BE3, BE4, BE6, BE7 dan BE8 adalah Gram-negatif dengan bentuk basil. Sedangkan BE5 adalah Gram-positif dengan bentuk basil.



Gambar VI.1

Isolat Bakteri Endofit (Hasil Pengamatan Secara Makroskopis)

Tabel VI.1

Isolat Bakteri Endofit (Hasil Pengamatan Secara Mikroskopis)

Klasifikasi	Bentuk Sel	Kode Isolat
Gram (+)	Kokus	BE1
Gram (-)	Basil	BE2
Gram (-)	Basil	BE3
Gram (-)	Basil	BE4
Gram (+)	Basil	BE5
Gram (-)	Basil	BE6
Gram (-)	Basil	BE7
Gram (-)	Basil	BE8

VI.3 Isolasi DNA Bakteri Endofit

Isolasi DNA adalah proses perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Tahap penghancuran sel atau jaringan memiliki beberapa cara yakni dengan cara fisik seperti menggerus sampel dengan menggunakan mortar dan pestle dalam nitrogen cair dan iradiasi (Giacomazzi *et,al.*, 2005). Cara lain untuk melisiskan membran dan dinding DNA adalah secara kimiawi maupun enzimatik. Isolasi DNA bakteri endofit dilakukan menggunakan *kit* TRIsure™ dengan metode fenol-kloroform. Penambahan *kit* TRIsure™ akan melarutkan protein, lipid, dan molekul lain yang merupakan kontaminan dan harus dipisahkan agar menghasilkan DNA murni. Kemudian pemisahan dimaksimalkan dengan cara menambahkan kloroform, sehingga nantinya akan terbentuk 2 fase.

Tahapan pertama dari prosedur pengerjaan isolasi bakteri endofit adalah homogenisasi dan pemisahan *fasa*. Tahapan homogenisasi merupakan proses yang digunakan untuk membuat campuran menjadi seragam. Penambahan Trisure pada supernatan hasil sentrifugasi yang kemudian divortex, menyebabkan semua campuran menjadi homogen. Setelah semua campuran bersatu, dilakukan penambahan kloroform. Penambahan kloroform dilakukan untuk meningkatkan efisiensi fenol dalam mendenaturasi protein dan lipid. Isolasi DNA dengan penambahan kloroform menyebabkan protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi bersamaan dengan DNA (Karp, 2008).

Pemisahan *fasa* setelah penambahan fenol-kloroform akan membentuk 2 bagian, yaitu: fase air (*colosless*) dan interfase/fase organik (berwarna hijau). Fase organik yang berisikan DNA diendapkan dengan penambahan etanol 100% yang kemudian dihomogenkan secara inversi (membolak-balikkan tube secara perlahan) sehingga akan terbentuk serat-serat putih berupa DNA yang akan tetap tertinggal pada dasar *tube* setelah dilakukan inkubasi, namun apabila protein masih bercampur dengan DNA pada fase organik tetap bisa dipisahkan dengan prose sentrifugasi. Pencucian DNA dilakukan dengan cara menambahkan natrium sitrat dalam etanol 10%.

Keller dan Mark (1989) menerangkan bahwa pencucian kembali pellet yang dipresipitasi oleh natrium sitrat dalam etanol 10% bertujuan untuk menghilangkan residu-residu garam yang masih tersisa. Garam-garam yang terlibat dalam proses isolasi bersifat kurang larut dalam etanol sehingga dapat terpresipitasi bersama DNA, oleh sebab itu dibutuhkan pencucian DNA dengan natrium sitrat dalam etanol 10% setelah presipitasi dengan etanol untuk menghilangkan residu garam (Ausubel *et.al.*, 2003). Setelah dilakukan proses presipitasi dan dilakukan pencucian dengan natrium sitrat dalam etanol 10%, maka etanol dibuang dengan cara membalikkan *tube* yang bertujuan untuk menghilangkan residu etanol dari pelet DNA. Tahapan terakhir adalah pelarutan DNA kembali dengan menambahkan natrium hidroksida yang kemudian disentrifugasi untuk diambil supernatan yang mengandung DNA

murni. DNA yang didapatkan kemudian ditambahkan EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) sampai pH 7,5.

Kuantifikasi DNA dilakukan dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang (λ) 260nm dan 280nm. DNA murni dapat menyerap cahaya ultraviolet dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, karena keberadaan basa-basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada λ 260 nm, sedang kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada λ 280 nm. Sehingga kemurnian DNA dapat dikur dengan menghitung nilai absorbansi λ 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi λ 280 ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$), dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8 - 2,0. Hal yang perlu dipertimbangkan ketika mengevaluasi sampel menggunakan absorbansi adalah adanya kontaminan dari proses isolasi DNA yang dapat menyerap di berbagai wilayah spektrum UV. Adanya kontaminan dalam sampel DNA secara langsung dapat mempengaruhi keakuratan hasil kuantifikasi.

Berdasarkan hasil isolasi bakteri endofit menggunakan kit TRIsure™ didapatkan hasil konsentrasi dan rasio yang memenuhi syarat adalah BE2 dan BE4 seperti pada **Tabel VI.2**

Tabel VI.2
Konsentrasi dan Rasio Isolasi DNA

Konsentrasi ng/µl	Rasio	Sample ID
483.2	1.71	BE 1
1076.8	1.81	BE 2
865.3	1.74	BE 3
1748.3	1.92	BE 4
199.7	1.64	BE 5
91.9	1.61	BE 6
164.6	1.69	BE 7
312.4	1.71	BE 8

VI.4 Desain Primer dan Analisis secara *in silico*

Jurnal yang dijadikan acuan pada penelitian kali ini berjudul *”Isolation and Molecular Identification Of Endophytic Bacteria From Rambutan Fruits (Nephelium lappaceum L.) Cultivar Binjai”* yang di teliti oleh Soni Suhandono *et.al.*, pada tahun 2016 dengan urutan primer 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) dan 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Suhandono *et.al.*, 2016). Primer yang digunakan kemudian dilakukan evaluasi menggunakan beberapa situs web seperti pada **Table VI.3**

Table VI.3
Situs Web Evaluasi Primer

Software	Primer	Panjang	%GC	Tm(°C)
http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html	Forward	20	50	52
	Reverse	19	42	47
http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html	Forward	20	50	51,8
	Reverse	19	42	46,8
https://www.thermofisher.com	Forward	20	50	61,5
	Reverse	19	42,1	53,8

Hasil evaluasi primer digunakan untuk mengetahui panjang primer, %GC dan TM. Primer merupakan untai asam nukleat yang berfungsi sebagai titik awal untuk sintesis DNA. Primer juga dapat diartikan sebagai *oligonucleotide* atau rangkaian pendek DNA yang digunakan untuk menginisiasi (memulai) duplikasi DNA. Primer yang digunakan dalam amplifikasi umumnya terdiri dari dua jenis, yakni: *forward* dan *reverse*.

Panjang primer yang memasuki rentang berkisar 18-22 basa. Primer dengan panjang kurang dari 18 basa memiliki kemungkinan *mispriming* (penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan) tinggi. Hal ini akan mengurangi spesifisitas primer sehingga produk yang dihasilkan tidak sesuai dengan yang diinginkan. Evaluasi %GC

yang disarankan adalah 50%-60%. Persen GC akan berpengaruh pada ikatan antar untai DNA. Jika suatu primer memiliki nilai %GC dibawah 40%, maka dapat menurunkan efisiensi pada proses PCR karena primer tidak mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada template. Persen GC yang tinggi akan mengakibatkan ikatan antar untai DNA menjadi kuat karena GC mengandung lebih banyak ikatan antar nukleotida dari pada AT sehingga akan berpengaruh pada nilai T_m . Nilai T_m akan berpengaruh pada suhu denaturasi untai double helix DNA dan suhu *annealing* (penempelan) primer. Primer dengan T_m terlalu tinggi melebihi 70°C akan mudah mengalami *mispriming* (salah penempelan) (Wirajana, 2016). Hasil analisis primer dapat dilihat pada **lampiran 7**.

VI.5 Amplifikasi DNA

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode untuk mengamplifikasi (perbanyak) DNA spesifik dengan melakukan proses pemanjangan nukleotida melalui primer *forward* dan *reverse* secara simultan. Proses pemanjangan nukleotida dilakukan oleh DNA polimerase berdasarkan cetakan DNA (Bardakci and Skibinski, 1994). Tahap amplifikasi diawali dengan pembuatan campuran dari komponen-komponen yang dibutuhkan. Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR, yaitu: primer, *taq* polymerase, *buffer* PCR, MgCl₂, dNTP's dan nuclease free water.

Primer merupakan rantai DNA pendek yang terdiri atas beberapa nukleotida. Primer berfungsi sebagai pemula dalam proses sintesis DNA dengan PCR. Konsentrasi primer yang tinggi ($\geq 0,5\mu\text{M}$) dapat

meningkatkan kesalahan penempelan primer pada DNA cetakan, sehingga menyebabkan penumpukan primer (dimer) yang tidak spesifik dan akan mengganggu analisis. Namun untuk penggunaan konsentrasi yang terlalu rendah akan memberikan hasil amplifikasi yang tidak jelas. Keberhasilan dalam mengamplifikasi DNA sangat dipengaruhi oleh primer yang berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Primer yang digunakan pada proses amplifikasi ini merupakan primer universal yang digunakan untuk amplifikasi gen pengkode bakteri endofit 16S rDNA. Primer ini menghasilkan produk PCR berukuran 1500bp sehingga diharapkan mampu mengidentifikasi sampai tahap genus dan spesies.

Taq polimerase merupakan enzim polimerase DNA yang berfungsi sebagai katalis untuk reaksi polimerisasi DNA. Enzim polimerase DNA yang digunakan untuk proses PCR didapat dari hasil isolasi bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur 95°C. Aktivitas polimerase DNA bergantung dari jenisnya dan dari mana bakteri tersebut diisolasi.

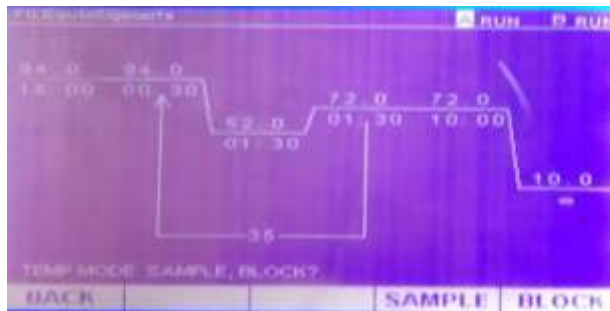
Buffer PCR berfungsi untuk menjaga pH sesuai pada kondisi yang diharapkan. Selain buffer PCR, diperlukan juga adanya ion Mg^{2+} , berasal dari $MgCl_2$. Kegunaan $MgCl_2$ pada proses amplifikasi adalah sebagai kofaktor dari aktivitas DNA polimerase. Keberadaan $MgCl_2$ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan *template* yang

membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Umumnya *buffer* PCR sudah mengandung senyawa $MgCl_2$ yang diperlukan, tetapi disarankan dilakukan penambahan $MgCl_2$ agar dapat dengan mudah melakukan variasi konsentrasi $MgCl_2$ sesuai yang diperlukan.

Deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP) digunakan sebagai sumber nukleotida pada proses PCR. dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisisidin trifosfat) dan dGTP 50 (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus $-OH$ pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template (Handoyo, 2001).

Dalam proses amplifikasi DNA menggunakan PCR, meliputi tiga tahapan utama (denaturasi, aneling dan *extention*) dengan dua tambahan tahapan, yaitu: predenaturasi dan *final extention* disertai dengan suhu dan waktu yang berbeda - beda. Tahapan pertama adalah predenaturasi (pemisahan) rantai DNA awal dengan bantuan enzim *Taq* polymerase pada suhu $94^{\circ}C$ selama 15 menit. Tahap selanjutnya adalah denaturasi pada suhu $94^{\circ}C$ selama 30 detik. Kemudian adalah tahapan yang cukup kritis untuk menentukan berhasil tidaknya proses amplifikasi DNA, yaitu *annealing*. Annealing adalah tahap penempelan primer pada gen target. Suhu annealing yang digunakan adalah $52^{\circ}C$ selama 1 menit 30 detik.

Tahap selanjutnya adalah elongasi, yaitu perpanjangan rantai DNA yang berlangsung pada suhu 72°C. Tahap terakhir adalah *extention* yaitu pemanjangan DNA, suhu yang digunakan pada proses *extention* adalah 72°C dengan waktu yang diperlukan selama 1 menit 30 detik serta *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit. Tahapan amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus (Sharma *et.al.*, 2017). Suhu amplifikasi DNA bisa dilihat pada gambar VI.2.



Gambar VI.2 Suhu Amplifikasi DNA

Pada proses amplifikasi DNA terdapat beberapa kendala, yaitu: kesalahan pemilihan suhu *annealing* sehingga terbentuknya dimer. Kesalahan dalam pemilihan suhu *annealing* dapat berpengaruh terhadap hasil. Hal tersebut dapat mempengaruhi keberhasilan amplifikasi karna pada proses ini penempelan primer pada seutas DNA tunggal memerlukan suhu optimal. Annealing sangat tergantung pada suhu yang optimum dengan rentang 55-60°C. Jika suhu yang digunakan terlalu tinggi maka akan mengakibatkan gagalnya proses amplifikasi karna tidak terjadinya penempelan primer, dan sebaliknya jika suhu yang digunakan pada proses ini

terlalu rendah maka dapat menyebabkan primer menempel pada gen bukan target. Sehingga sangat penting untuk mencari suhu *annealing* yang optimum pada proses amplifikasi (Lorenz, 2012). Hasil dari kesalahan pemilihan suhu *annealing* adalah terbentuknya dimer. Dimer merupakan keadaan dimana primer forward dan reverse saling menempel. Keadaan tersebut dapat terjadi jika konsentrasi primer lebih tinggi dibandingkan konsentrasi *template*. Keadaan tersebut mengakibatkan menempelnya forward dengan reverse, reverse dengan reverse dengan membentuk *loop* atau forward dengan forward. Hal tersebut dapat diatasi dengan melakukan optimasi terhadap konsentrasi primer dan *template*. Setelah dilakukan optimasi konsentrasi primer dan *template* didapatkan pita pada ukuran 1500bp yang merupakan gen marker dari bakteri endofit pada primer universal. Pita Genomik DNA yang dihasilkan seperti pada Gambar VI.3



Gambar VI.3 DNA Genomik dari Bakteri Endofit (BE) dari *Capsicum annuum*. L

VI.6 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan mempurifikasi dari molekul DNA. Prinsip: pemisahan molekul DNA berdasarkan perbedaan bobot molekulnya didalam agarosa gel. Fragmen DNA yang memiliki bobot melekul lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan fragmen DNA yang memiliki bobot molekul lebih besar. Hasil amplifikasi DNA ditampilkan dalam bentuk pita-pita DNA pada saat dijalankan pada elektroforesis menggunakan gel. Gel yang digunakan pada penelitian adalah gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Kelebihan elektroforesis menggunakan gel agarosa adalah laju pemisahannya lebih cepat sehingga fragmen DNA lebih cepat terbentuk, preparasi gel lebih cepat karna pembuatan gel agarosa lebih mudah dan tidak bersifat toksik sehingga pada penelitian ini digunakan gel agarosa.

Setiap sumur dalam gel agarosa ini diisi dengan 5 μ L DNA *template* dan 2 μ L dan loading dye. Loading dye berfungsi sebagai pemberat DNA sehingga sampel berada di dasar gel (Sudjadi, 2008). Hasil amplifikasi dielektroforesis untuk mengetahui keberhasilan primer universal 8F dan 1492R dalam menggandakan bakteri endofit dengan konsentrasi dan rasio bakteri endofit yang berbeda-beda tingkat kemurnian DNAny. Dilihat dari hasil elektroforesis tampak bahwa adanya perpindahan DNA dari kutub negatif ke kutub positif. Dimana panjang basa yang dihasilkan adalah pada ukuran 1500bp. Isolasi DNA bakteri endofit berhasil mengamplifikasi pita BE1,

BE2, BE3, BE4 dan BE5 yang berhasil mengamplifikasi menggunakan primer 8F dan 1492R pada pita berukuran sekitar 1500bp.