

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Telah berhasil dilakukan isolasi DNA total genom pada 17 bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L. dengan menggunakan protokol standar dari kit Fermentas yang telah mengalami beberapa modifikasi. Selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dari setiap hasil isolasi DNA bakteri tersebut. Dari setiap isolat DNA diambil 1  $\mu$ l kemudian diencerkan hingga lima ratus kali pengenceran, selanjutnya dianalisis kuantitas dan kemurniannya melalui spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Hasil spektrofotometer tersebut selanjutnya dihitung untuk menentukan konsentrasi DNA yang diperoleh. Perhitungan konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA} = \lambda_{260} \times \text{konstanta DNA } double \text{ helix (50)} \times \text{faktor pengenceran (500)}$$

Konsentrasi DNA yang baik digunakan sebagai *template* dalam proses amplifikasi adalah sekitar 1pg-1 $\mu$ g (Sambrook & Russel, 2001), maka semua sampel isolat DNA yang akan diamplifikasi harus diencerkan hingga masing-masing sampel mencapai konsentrasi yang sama, yaitu pada penelitian ini adalah 100 ng/ $\mu$ l. Konsentrasi DNA dari setiap sampel disamakan dengan tujuan agar kualitas produk amplifikasi yang dihasilkan bersifat homogen.

Spektrofotometer dan kuantifikasi hasil isolasi DNA bakteri endofit akar

*Vetiveria zizanioides* L. dapat dilihat pada tabel berikut ini:

**Tabel 4.1** Hasil Spektrofotometer DNA Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides*

Sampel	Panjang gelombang cahaya		Rasio $\lambda$ 260/ $\lambda$ 280	Konsentrasi DNA (ng/ $\mu$ l)
	$\lambda$ 260	$\lambda$ 280		
Isolat A	0.027	0.024	1.27	675
Isolat B	0.026	0.195	1.29	650
Isolat C	0.011	0.009	1.5	275
Isolat D	0.027	0.022	1.25	675
Isolat E	0.026	0.195	1.33	650
Isolat F	0.045	0.034	1.32	1125
Isolat G	0.026	0.022	1.174	650
Isolat H	0.016	0.009	1.778	400
Isolat I	0.020	0.015	1.33	400
Isolat J	0.025	0.020	1.25	625
Isolat K	0.027	0.022	1.22	675
Isolat L	0.022	0.013	1.32	550
Isolat M	0.050	0.040	1.25	1250
Isolat N	0.019	0.017	1.28	475
Isolat O	0.066	0.057	1.29	1650
Isolat P	0.057	0.045	1.27	1425
Isolat Q	0.028	0.021	1.33	700

Dengan menggunakan rumus perhitungan konsentrasi DNA, maka dapat diketahui bahwa konsentrasi DNA yang diperoleh sekitar 275-1650 ng/ $\mu$ l. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh sampel isolat DNA tersebut memiliki konsentrasi DNA yang cukup banyak untuk dilakukan proses amplifikasi. Selain itu, telah dihitung juga rasio absorbansi 260/280 nm untuk mengetahui kemurnian DNA. Dari data yang dihasilkan tersebut, dapat dilihat bahwa rentang rasio kemurnian DNA yang didapatkan dari setiap hasil isolasi DNA cukup baik, yaitu sekitar 1.2-1.7. Berdasarkan Held (2001), kemurnian DNA yang baik itu memiliki rentang rasio antara 1.2-2, jika kurang atau lebih dari angka rasio tersebut, artinya banyak kontaminan seperti adanya protein atau RNA.

## B. Hasil Amplifikasi dan Elektroforesis

### 1. Gen Domain *ketosynthase* (KS)

Amplifikasi fragmen gen KS diketahui dapat digunakan untuk penyelidikan homologi hibridisasi yang secara signifikan dapat memfasilitasi kloning biosintesis antibiotik. Selain itu, analisis filogenetik bakteri berdasarkan fragmen KS dapat menunjukkan evolusi species bakteri yang mensintesis *ketosynthase* tersebut atau hanya evolusi molekuler dari gen biosintesis antibiotik saja. Filogenetik yang tidak sama menunjukkan bahwa itu merupakan evolusi tersendiri dari poliketida aromatik (Metsa-Ketela *et al.*, 2002). *Ketosynthase* (KS) merupakan salah satu domain PKS yang berupa superfamili enzim kompleks biosintesis yang berasosiasi dan biasanya ditemukan pada fungi, bakteri dan tumbuhan. Perkembangan biologi molekuler terkini memberikan kemajuan untuk penelitian enzim tersebut. Domain enzim *ketosynthase* (KS) kurang lebih memiliki ukuran 700 pb (Moffit & Neilan, 2002).

Dalam penelitian ini telah berhasil dilakukan amplifikasi gen domain *ketosynthase* terhadap 17 isolat bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L., namun hasilnya menunjukkan bahwa hanya sebanyak lima dari 17 isolat bakteri saja yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase*. Pada proses amplifikasi gen tersebut dipakai dua pasang primer *degenerate oligonucleotide*, yaitu DKF-DKR dan *heterocyst glycolipid* (HGLF dan HGLR). Perbedaan aplikasi penggunaan kedua pasangan primer ini adalah tujuan amplifikasi dari gen itu sendiri. Pasangan primer *degenerate oligonucleotide* digunakan untuk mendeteksi gen *polyketide synthase* (PKS) tipe I, khususnya domain *ketosynthase* dari suatu organisme,



Hasil elektroforesis tersebut menunjukkan bahwa hanya amplicon sampel H, M, dan O saja yang berhasil teramplifikasi. Hal ini berarti bahwa diantara 17 bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides*, hanya tiga isolat bakteri saja yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* tipe I oleh primer DKF-DKR, yaitu isolat H, M, dan O. Adapun yang terlihat dari hasil visualisasi tersebut adalah bahwa ukuran gen dari masing-masing amplicon rata-rata kecil, yaitu sekitar 400 pb pada isolat H dan 700 pb pada isolat M dan O. Hal ini berkorelasi dengan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Moffit & Neilan (2002), bahwa gen *ketosynthase* memiliki ukuran sekitar 700 pb. Perbedaan ukuran gen dari ketiga amplicon tersebut menunjukkan bahwa domain atau tipe *ketosynthase* yang dimilikinya pun berbeda.

Pasangan primer *degenerate oligonucleotide* lainnya (HGLF & HGLR) juga digunakan dalam amplifikasi gen *ketosynthase* pada penelitian ini. Berbeda dengan pasangan primer *degenerate oligonucleotide* DKF-DKR, tujuan dari penggunaan pasangan primer ini adalah untuk mengetahui tingkat diversitas jenis *ketosynthase* dari setiap organisme, sehingga hasil dari amplifikasi gen dengan menggunakan primer ini dapat menunjukkan keragaman jenis *ketosynthase* pada setiap organisme yang dianalisis (Moffit & Neilan, 2002). Hasil amplifikasi gen *ketosynthase* dengan menggunakan primer ini hampir sama dengan produk PCR dari penggunaan primer DKF-DKR, bahwa hanya tiga dari 17 isolat bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* yang berhasil teramplifikasi. Hasil amplifikasi gen *ketosynthase* dengan menggunakan primer tersebut dapat dilihat dalam visualisasi DNA melalui elektroforesis pada Gambar 4.2 berikut ini:



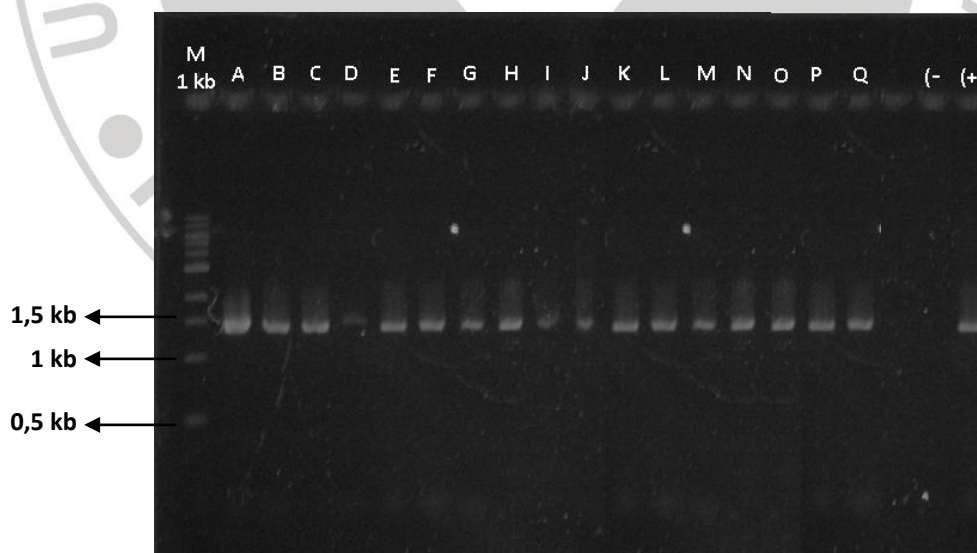
**Gambar 4.2** Hasil Elektroforesis Amplikon Gen *ketosynthase* dengan Primer *Degenerate Oligonucleotide* HGLF-HGLR pada Isolat Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L. M 50 bp = DNA Marker 50 pb *Gen Ruller* (Fermentas)

Dari hasil elektroforesis tersebut terlihat bahwa hanya sampel A, K, dan O yang berhasil teramplifikasi. Ukuran gen pada masing-masing amplikon adalah sekitar 400 pb pada sampel A dan K serta 700 pb pada sampel O. Hasil visualisasi tersebut menunjukkan bahwa sampel DNA yang berhasil teramplifikasi oleh pasangan primer ini berbeda dengan pasangan primer sebelumnya (DKF & DKR), kecuali sampel DNA “O” yang berhasil teramplifikasi pada kedua pasangan primer. Hal ini mungkin saja disebabkan karena adanya perbedaan *region* atau diversitas *ketosynthase* yang dimiliki masing-masing bakteri tersebut.

## 2. Gen *16S rRNA*

Hasil amplifikasi gen *ketosynthase* menunjukkan bahwa hanya lima diantara 17 bakteri saja yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase*. Dari hasil analisis tersebut, maka perlu diketahui lebih jauh mengenai jenis mikroorganisme

yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* tersebut. Keanekaragaman jenis organisme dapat dilakukan melalui analisis sekuen gen *16S rRNA* bagi organisme prokaryota. Perbandingan sekuen *16S rRNA* merupakan metode yang baik untuk mengetahui hubungan filogeni dan evolusi di antara organisme *bacteria*, *archaeobacteria*, dan eukaryot (Weisburg *et al.*, 1991). Amplifikasi gen *16S rRNA* dilakukan pada 17 sampel DNA (total genom) bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L., baik isolat bakteri yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* maupun yang tidak. Dalam proses amplifikasi gen *16S rRNA* ini digunakan primer 63F dan 1387R untuk mengamplifikasi DNA *template*. Produk yang dihasilkan pada amplifikasi gen *16S rRNA* ini berukuran sekitar 1300 pb (Marchesi *et al.*, 1998). Produk dari proses amplifikasi (amplikon) gen *16S rRNA* pada bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L ini dapat divisualisasikan dengan menggunakan alat elektroforesis yang ditunjukkan pada Gambar 4.3 berikut ini.



**Gambar 4.3** Hasil Elektroforesis Amplikon Gen *16SrRNA* pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L. M 1kb = DNA Marker 1kb Gen Ruller (Fermentas), (+) = Kontrol Positif PCR, (-) = Kontrol Negatif PCR.

Berdasarkan hasil elektroforesis dari amplicon tersebut, dapat terlihat bahwa semua 17 amplicon gen *16S rRNA* isolat bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L. berhasil teramplifikasi. Hasil visualisasi tersebut menunjukkan bahwa hampir semua amplicon memiliki ukuran gen yang sama, yaitu sekitar 1,3 kb.

**Tabel 4.2** Hasil Amplifikasi Gen *16S rRNA* dan Gen *ketosynthase* Menggunakan Primer *Degenerate Oligonucleotide* DKF-DKR dan HGLF HGLR ;  
(+) Menunjukkan Hasil PCR Positif. (-) Menunjukkan Hasil PCR Negatif

Sampel	16s rRNA	DKF-DKR	HGLF-HGLR
Isolat A	+	-	+
Isolat B	+	-	-
Isolat C	+	-	-
Isolat D	+	-	-
Isolat E	+	-	-
Isolat F	+	-	-
Isolat G	+	-	-
Isolat H	+	+	-
Isolat I	+	-	-
Isolat J	+	-	-
Isolat K	+	-	+
Isolat L	+	-	-
Isolat M	+	+	-
Isolat N	+	-	-
Isolat O	+	+	+
Isolat P	+	-	-
Isolat Q	+	-	-

Untuk mengetahui hubungan filogenetik gen *ketosynthase* pada bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L. ini, maka selanjutnya dilakukan analisis *in silico* (bioinformatika) dan studi filogenetik.



### C. Hasil Eksplorasi Gen *ketosynthase* pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L.

Setelah proses amplifikasi gen *ketosynthase* dan *16S rRNA* berhasil dilakukan, selanjutnya dilakukan proses *sequencing* pada masing-masing amplicon tersebut. Proses *sequencing* ini hanya dilakukan khusus untuk bakteri yang memiliki gen *ketosynthase* saja. Proses *sequencing* pada amplicon gen *16S rRNA* bertujuan untuk mendapatkan urutan nukleotida yang akan dianalisis secara *in silico* agar memperoleh informasi mengenai jenis bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L. yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase*, sedangkan proses *sequencing* pada amplicon gen *ketosynthase* bertujuan untuk mendapatkan urutan nukleotida yang mengekspresikan *ketosynthase* pada masing-masing bakteri. Urutan nukleotida yang didapatkan dari hasil *sequencing* pada setiap amplicon tersebut dapat dibandingkan dengan jenis bakteri lain yang memiliki gen yang serupa, sehingga kemudian dihasilkan informasi mengenai filogeni masing-masing bakteri berdasarkan gen yang dianalisis. Pada hasil *sequencing* amplicon gen *ketosynthase*, urutan nukleotida yang telah terbaca kemudian diterjemahkan menjadi kode asam amino. Hal ini dikarenakan proses *alignment* pada analisis filogenetik gen *ketosynthase* dilakukan bukan pada urutan nukleotida, tetapi dalam bentuk urutan asam amino.

Adapun jumlah amplicon yang dianalisis melalui proses *sequencing* adalah sebanyak 11 amplicon, yaitu lima amplicon gen *16S rRNA* pada sampel bakteri yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* (Sampel A, H, K, M, dan O), tiga amplicon gen *ketosynthase* dengan primer *degenerate oligonucleotide* DKF-DKR

(Sampel H, M, dan O) serta tiga amplicon gen *ketosynthase* dengan primer HGLF-HGLR (Sampel A, K, dan O).

## 1. Analisis Gen *16S rRNA* pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L. yang Memiliki Gen *ketosynthase*

Untuk mengetahui jenis kelompok bakteri yang telah terdeteksi memiliki gen *ketosynthase*, diperlukan analisis gen *16S rRNA*. Analisis sekuens gen *16S rRNA* dilakukan dari satu arah ujung *forward* dengan menggunakan primer 63F. Setelah diketahui urutan nukleotida dari hasil *sequencing* tersebut, lalu dilakukan analisis bioinformatika selanjutnya, yakni penyelarasan urutan nukleotida berdasarkan tingkat kemiripan antar nukleotida (*alignment*) dari data sekuens isolat bakteri dengan *database* sekuens gen *16S rRNA* yang ada pada "GenBank". Urutan sekuens gen *16S rRNA* isolat bakteri A, H, K, M, dan O yang berupa hasil *sequencing* satu arah (*forward*) kemudian dianalisis menggunakan program BLAST pada situs "GenBank". Program BLAST akan memproses penyejajaran data sekuens yang dimasukkan dengan data sekuens yang ada pada *database* secara otomatis. Hasil penyejajaran sekuens gen *16S rRNA* sampel dengan sekuens yang ada pada *database* akan ditampilkan secara lengkap dalam bentuk grafik kesesuaian penyejajaran sekuens dan skor penyejajaran sekuens, kemiripan dengan sekuens *database*, dan tampilan penyejajaran sekuens dengan sekuens *database*. Tampilan ini akan memperlihatkan identitas spesies bakteri spesifik yang kemiripannya cukup tinggi dengan gen *16S rRNA* subjek.

Hasil analisis bioinformatika untuk sekuens parsial gen *16S rRNA* isolat bakteri A, H, K, M dan O (arah *forward*) memperlihatkan kesamaan yang cukup tinggi antara sekuens isolat bakteri dengan sekuens yang ada pada *database*. Dari hasil penyejajaran sekuens gen *16S rRNA* isolat bakteri A, diketahui bahwa bakteri yang dianalisis merupakan spesies *Lysinibacillus sphaericus* dengan berbagai *strain* dan persentase identitas kemiripan yaitu sekitar 81% (Tabel 4.3). *Strain* bakteri yang paling mirip adalah *Lysinibacillus sphaericus* strain p85\_F04 dengan *Accession number* JQ835492.1 yang memiliki persentase identitas kemiripan 81% dan angka kemungkinan ketidakmiripan (*E value*) sama dengan  $2e-87$ . Menurut Marshall *et al.* (2008), jika hasil identitas kemiripan dari analisis BLAST menunjukkan nilai  $<97,5\%$  maka bakteri tersebut merupakan jenis baru atau bakteri dengan *strain* baru yang belum diketahui jenisnya “*unknown*”. Dengan demikian maka isolat A merupakan bakteri *Lysinibacillus sphaericus* dengan *strain* baru.

**Tabel 4.3** Hasil Analisis Bioinformatik Gen *16S rRNA* Isolat Bakteri A.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JQ835492.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain p85_F04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	333	333	38%	$2e-87$	81%
JF815049.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain LB22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	333	333	38%	$2e-87$	81%
JF703635.1	Uncultured <i>Lysinibacillus</i> sp. Clone HaG17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	333	333	38%	$2e-87$	81%

Hasil penyejajaran sekuens untuk gen *16S rRNA* isolat bakteri H menunjukkan bahwa bakteri yang dianalisis merupakan spesies *Pantoea* sp. dengan berbagai *strain* dan persentase identitas kemiripan yaitu antara 72-77%

(Tabel 4.4). *Strain* yang paling mirip adalah *Pantoea* sp. strain F16-PCAi-T3P21 dengan *Accession number* JN853251.1 yang memiliki persentase identitas kemiripan 76% dan angka kemungkinan ketidakmiripan (*E value*) sama dengan  $2e-138$ .

**Tabel 4.4** Hasil Analisis Bioinformatik Gen *16S rRNA* Isolat Bakteri H.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN853251.1	<i>Pantoea</i> sp. strain F16-PCAi-T3P21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	502	502	60%	$2e-138$	76%
JN853256.1	<i>Pantoea</i> sp. strain F6-PCAi-T3P21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	400	400	60%	$8e-138$	76%
FJ608234.1	<i>Citrobacter freundii</i> strain F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	491	491	53%	$4e-135$	76%
DO129699.1	<i>Halomonas</i> sp. Strain HPC111 Clone HaG77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	475	475	57%	$3e-130$	76%

Dari hasil penyejajaran sekuens gen *16S rRNA* isolat bakteri K, diketahui bahwa bakteri yang dianalisis merupakan spesies *Bacillus* sp dengan berbagai *strain* dan persentase identitas kemiripan yaitu sekitar 86% (Tabel 4.5). *Strain* bakteri yang paling mirip adalah *Bacillus* sp strain MC-BAC-4 dengan *Accession number* JN593079.1 yang memiliki persentase identitas kemiripan 86% dan angka kemungkinan ketidakmiripan (*E value*) sama dengan 0.0. Hal ini menunjukkan bahwa gen yang dianalisis merupakan gen parsial *16S rRNA* milik bakteri *Bacillus* sp.

**Tabel 4.5** Hasil Analisis Bioinformatik Gen *16S rRNA* Isolat Bakteri K.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JN593079.1	<i>Bacillus</i> sp. strain MC-BAC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1303	1303	91%	0.0	86%
FN667913.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ucsc27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1303	1303	91%	0.0	86%
JQ897973.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain srm 4 2012 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1299	1299	91%	0.0	86%
GU011949.1	<i>Bacillus cereus</i> . Strain NBST4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1299	1299	91%	0.0	86%

Hasil penyejajaran sekuens untuk gen *16S rRNA* isolat bakteri M menunjukkan bahwa bakteri yang dianalisis merupakan spesies *Acinetobacter* sp. dengan berbagai *strain* dan persentase identitas kemiripan yaitu 84% (Tabel 4.6). *Strain* yang paling mirip adalah *Acinetobacter* sp. strain MJ4 dengan *Accession number* HQ650820.2 yang memiliki persentase identitas kemiripan 84% dan angka kemungkinan ketidakmiripan (*E value*) sama dengan 0.0.

**Tabel 4.6** Hasil Analisis Bioinformatik Gen *16S rRNA* Isolat Bakteri M.

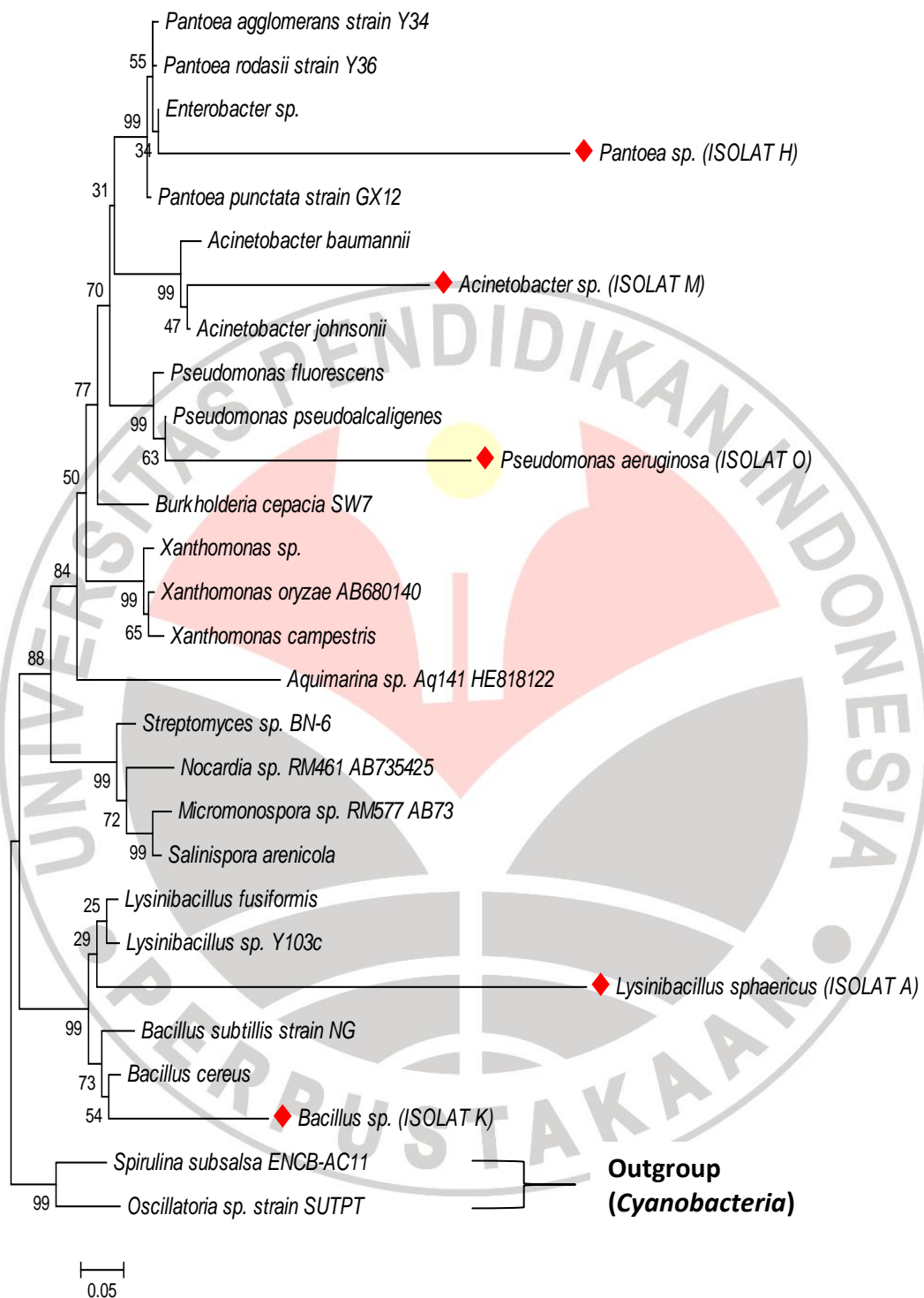
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ650820.2	<i>Acinetobacter</i> sp. strain MJ4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	746	746	70%	0.0	84%
NR 044975.1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain ATCC 17909 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	746	746	70%	0.0	84%
HQ743922.1	<i>Uncultured organism clone</i> strain ELU0016-T94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	746	746	70%	0.0	84%

Hasil penyejajaran sekuens untuk gen *16S rRNA* isolat bakteri O menunjukkan bahwa bakteri yang dianalisis merupakan spesies *Pseudomonas aeruginosa*. dengan berbagai *strain* dan persentase identitas kemiripan yaitu 72-73% (Tabel 4.7). *Strain* yang paling mirip adalah *Pseudomonas aeruginosa*. strain AU5056 dengan *Accession number* AY486371.1 yang memiliki persentase identitas kemiripan 73% dan angka kemungkinan ketidakmiripan (*E value*) sama dengan  $5e-116$ .

**Tabel 4.7** Hasil Analisis Bioinformatik Gen *16S rRNA* Isolat Bakteri O.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY486371.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . strain AU5056 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	428	428	59%	5e-116	73%
EF157824.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain VP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	426	426	60%	2e-115	73%
EF102842.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain P-5-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	419	419	61%	2e-113	73%
HQ631966.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain SO28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	417	417	62%	8e-113	72%

Untuk melihat hubungan kekerabatan kelima isolat dengan sejumlah bakteri lainnya, dilakukan analisis sekuens parsial *gen 16S rRNA* dengan membuat pohon filogenetik. Sekuens parsial *gen 16S rRNA* setiap bakteri endofit akar *Vetiveria* yang sudah diidentifikasi disejajarkan melalui *alignment* pada program *ClustalX* dengan beberapa sekuens *gen 16S rRNA* milik bakteri endofit yang diambil dari situs *GenBank*. Setelah sekuens disejajarkan kemudian dibuat pohon filogenetiknya. Pohon filogenetik dibentuk melalui program *MEGA5* dengan kelompok *Cyanobacteria* sebagai *outgroup*.



**Gambar 4.4** Pohon Filogenetik Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L Berdasarkan Gen *16S rRNA* dengan Menggunakan Program *MEGA 5*

Hasbi Yusuf, 2012

Eksplorasi Gen Ketosynthase pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L.

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

Berdasarkan pohon filogenetik yang terbentuk (Gambar 4.4), dapat disimpulkan bahwa setiap bakteri yang diidentifikasi memiliki tingkat kesamaan yang tinggi dengan genus lain yang sama. Hal tersebut dibuktikan dengan percabangan (nodus) yang dekat pada setiap bakteri yang teridentifikasi dengan bakteri lainnya yang masih satu genus. Dari data yang didapatkan, diketahui bahwa sampel bakteri yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* termasuk ke dalam filum *Firmicutes* (*Lysinibacillus* dan *Bacillus*) serta filum *Proteobacteria* (*Pantoea*, *Acinetobacter*, dan *Pseudomonas*). Berdasarkan Donadio *et al.* (2007), telah dinyatakan bahwa klaster gen *polyketide synthase* (PKS) dan *non-ribosomal peptide synthase* (NRPS) sebagian besar terdapat pada kelompok bakteri *Firmicutes* dan *Proteobacteria* setelah *Actinobacteria* dan *Cyanobacteria*.

Setelah mengetahui jenis bakteri yang telah dianalisis, dapat dipastikan bahwa bakteri-bakteri tersebut diduga memang memiliki gen *ketosynthase*. Hal ini dibuktikan dengan karakteristik dan aplikasi yang sering dimanfaatkan dari setiap bakteri tersebut. Menurut Wirth, M. *et al.* (2007), genus *Lysinibacillus* dapat dijadikan sebagai agen insektisida, khususnya obat anti nyamuk karena dapat menghasilkan senyawa *endotoxin*. Begitu pun dengan bakteri lainnya, seperti genus *Acinetobacter* yang dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi dan biosurfaktan karena dapat menghasilkan jenis peptida dan enzim baru (Gutnick, 2008 dalam Gerischer, 2008). Genus *Pseudomonas* dan *Bacillus* dapat menghasilkan beraneka jenis metabolit sekunder yang bisa dijadikan produk seperti antibiotik, antifungi, senyawa antikanker, insektisida, serta



*immunosuppressant* (Ryan *et al.*, 2007) dimana kebanyakan dari senyawa tersebut bisa diproduksi dengan bantuan aktivitas *ketosynthase*.

Untuk memastikan keberadaan dan jenis domain *ketosynthase* pada setiap bakteri endofit yang telah teridentifikasi, diperlukan analisis filogenetik bakteri endofit tersebut berdasarkan gen *ketosynthase* yang dimiliki dibandingkan dengan bakteri lain yang telah diketahui pasti memiliki gen *ketosynthase*.

## **2. Hasil Analisis Gen *ketosynthase* pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L.**

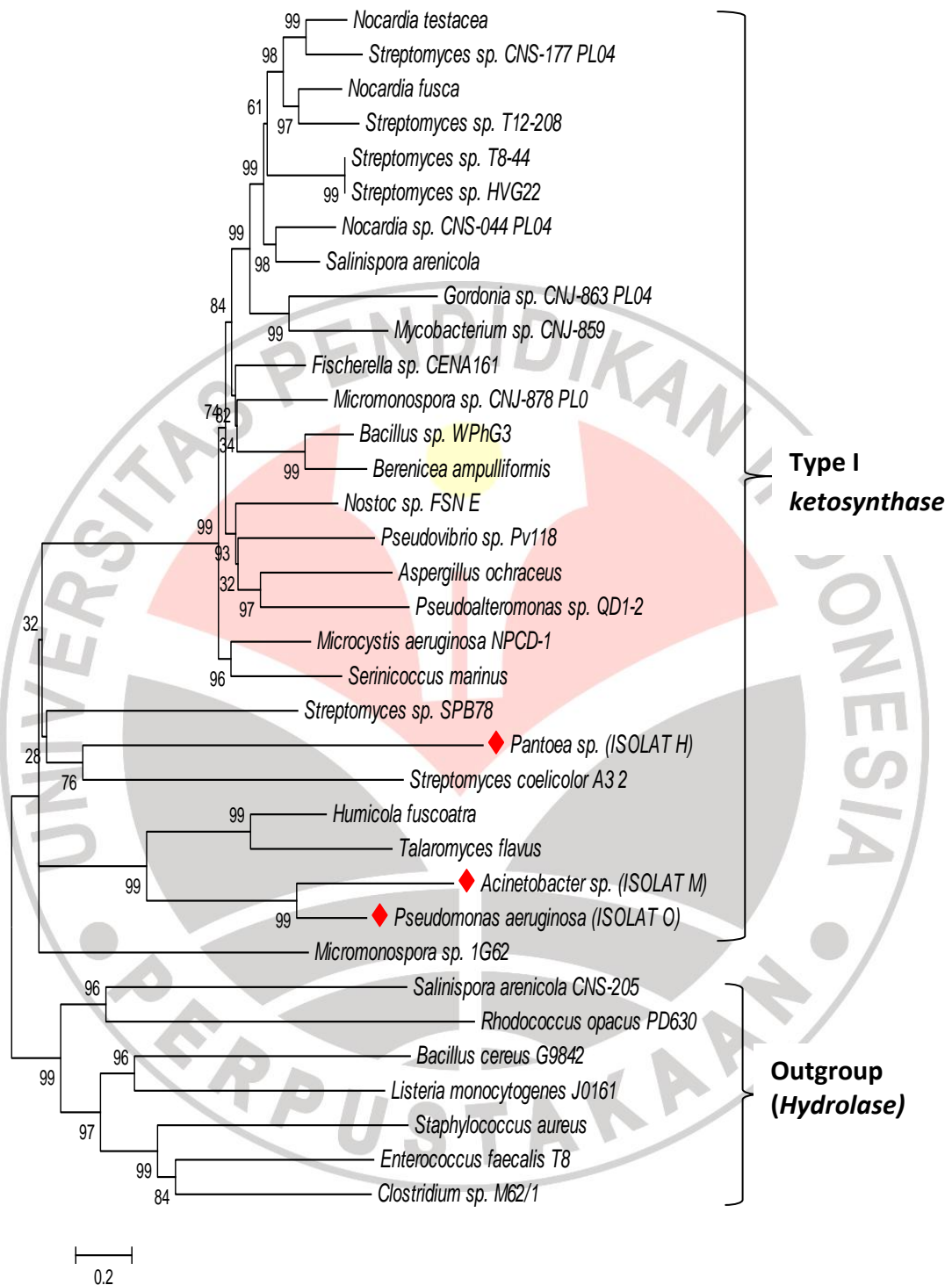
Sama halnya dengan proses analisis pada gen *16S rRNA* sebelumnya, gen *ketosynthase* yang sudah diamplifikasi pada setiap bakteri endofit yang akan dianalisis harus melewati tahap *sequencing* terlebih dahulu. Analisis sekuens gen *ketosynthase* dilakukan dari satu arah ujung *forward* dengan menggunakan primer *degenerate oligonucleotide forward* (DKF dan HGLF)

Setelah diketahui urutan nukleotida yang mengekspresikan gen *ketosynthase* pada setiap bakteri, kemudian urutan nukleotida tersebut diterjemahkan menjadi asam amino dengan menggunakan *tools* konversi nukleotida menjadi asam amino secara online. Setelah urutan nukleotida pada setiap bakteri telah dikonversi menjadi asam amino, kemudian setiap sekuens tersebut disejajarkan melalui proses *alignment* dengan menggunakan program *ClustalX*. Proses *alignment* tersebut dilakukan pada setiap sekuens asam amino dari ampikon primer yang berbeda disejajarkan dengan sejumlah sekuens asam amino yang diekspresikan oleh gen *ketosynthase* pada sejumlah bakteri yang didapatkan dari *GenBank*

kelompok protein. Setelah setiap sekuens disejajarkan, kemudian dibuat pohon filogenetik kedekatan tiap bakteri yang dianalisis berdasarkan gen *ketosynthase* yang dimiliki dengan menggunakan program MEGA 5.

Pendeteksian gen PKS tipe I ataupun *ketosynthase* tipe I dapat dilakukan dengan menggunakan primer *degenerate oligonucleotide* ketika proses amplifikasi (Moffit & Neilan, 2002). Primer tersebut digunakan untuk memastikan bakteri yang dianalisis tersebut memiliki gen *ketosynthase* tipe I. Dari hasil amplifikasi gen *ketosynthase* pada bakteri endofit akar *Vetiveria*, diketahui bahwa diantara 17 bakteri yang telah diidentifikasi terdapat lima jenis bakteri yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase*. Adapun gen *ketosynthase* yang teramplifikasi menggunakan primer *degenerate oligonucleotide* DKF-DKR terdapat pada tiga jenis isolat bakteri yang termasuk ke dalam filum *Proteobacteria*, yaitu isolat H (*Pantoea* sp), isolat M (*Acinetobacter* sp), dan isolat O (*Pseudomonas aeruginosa*). Untuk memastikan adanya gen *ketosynthase* pada setiap bakteri yang teridentifikasi, dilakukan studi filogenetik dengan membandingkan setiap bakteri tersebut dengan bakteri yang sudah jelas memiliki gen *ketosynthase* dan bakteri yang memiliki gen lain (*hydrolase*) sebagai *outgroup*.

Dari hasil analisis filogenetik tersebut menunjukkan bahwa tiga jenis bakteri yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* oleh primer *degenerate oligonucleotide* DKF-DKR ini dipastikan memiliki gen *ketosynthase*, khususnya *ketosynthase* tipe I. Adapun pohon filogenetik untuk kelompok bakteri endofit yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* tipe I ditunjukkan pada gambar berikut ini:

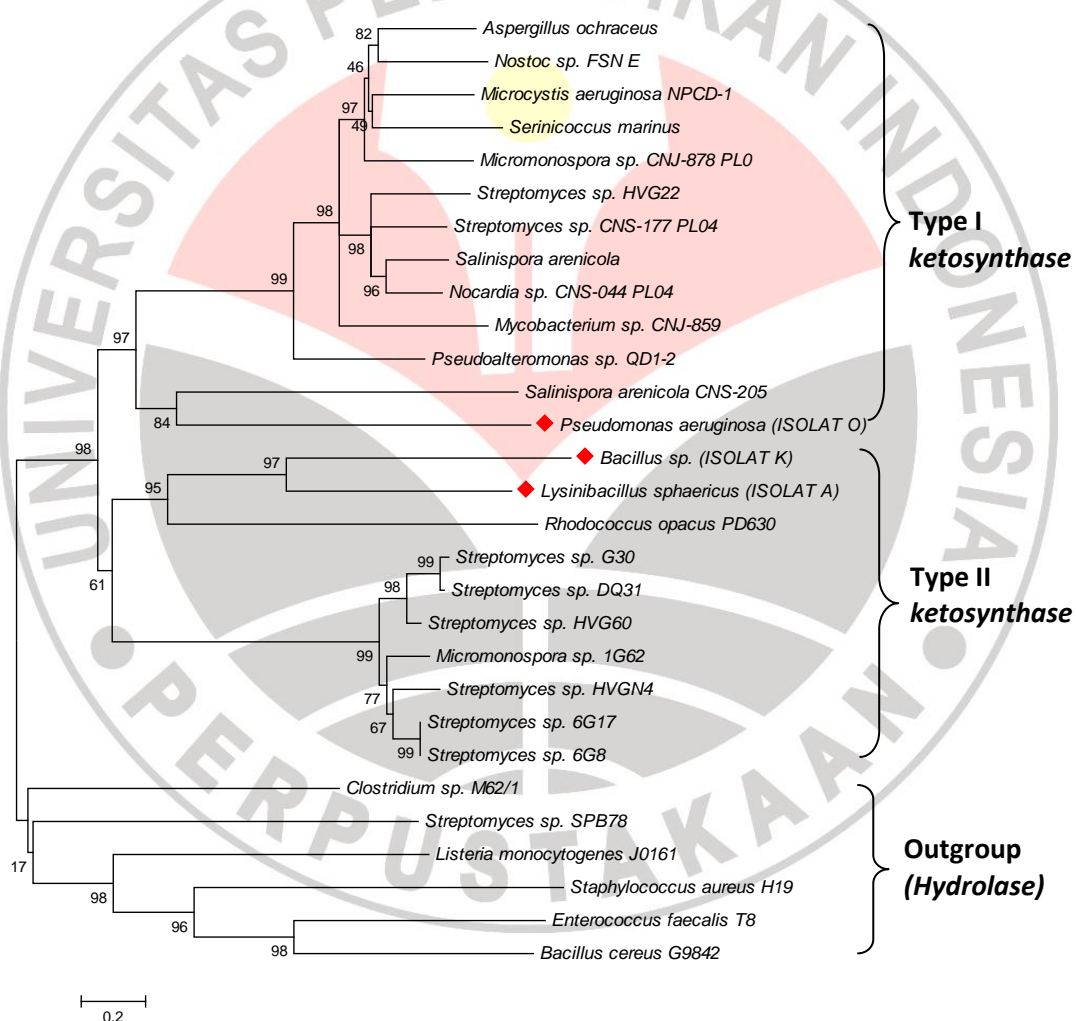


**Gambar 4.5** Pohon Filogenetik *ketosynthase* pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* Menggunakan Primer *Degenerate Oligonucleotide* DKF. Sekuens yang diamplifikasi dalam studi ini ditandai dengan tanda merah

Dari pohon filogenetik yang dihasilkan, dapat dilihat bahwa tiga jenis bakteri yang terdeteksi memiliki gen *ketosynthase* tersebut masuk ke dalam kelompok bakteri yang telah diketahui jelas memiliki gen *ketosynthase* tipe I. Hal ini diperkuat dengan terpisahnya kelompok bakteri yang memiliki gen lain (*hydrolase*) sebagai *outgroup* dengan kelompok bakteri yang memiliki gen *ketosynthase* tersebut. Pada pohon filogenetik yang terbentuk, dapat dilihat bahwa bakteri *Pantoea* sp. (Isolat H) memiliki cabang kekerabatan yang dekat dengan bakteri *Streptomyces coelicolor* yang diketahui sebelumnya memiliki gen *ketosynthase* tipe I. Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa Isolat bakteri H (*Pantoea* sp) memiliki gen *ketosynthase* yang mirip dengan *Streptomyces coelicolor*. Sedangkan dua bakteri lainnya, yaitu isolat bakteri M (*Acinetobacter* sp) dan isolat bakteri O (*Pseudomonas aeruginosa*) terpisah dengan isolat H, membentuk satu cabang kekerabatan baru yang dekat. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua bakteri tersebut mengalami evolusi pada gen *ketosynthase* yang dimilikinya, namun masih merupakan gen *ketosynthase* tipe I. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Janke-Kodama *et al.* (2005), hasil distribusi filogenetik sekuens domain *ketosynthase* (KS) PKS tipe I pada bakteri menunjukkan adanya evolusi gen berupa transfer gen horizontal yang diperlihatkan melalui duplikasi, delesi, dan lain-lain.

Evolusi PKS tipe I melalui transfer gen horizontal ini kebanyakan terjadi pada kelompok bakteri *Proteobacteria* (Janke-Kodama *et al.*, 2005), dimana ketiga jenis bakteri yang telah teridentifikasi (*Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp., dan *Pseudomonas aeruginosa*) itu juga termasuk ke dalam kelompok bakteri tersebut.

Adapun proses amplifikasi gen *ketosynthase* berikutnya adalah dengan menggunakan primer *degenerate oligonucleotide heterocyst glycolipid* (HGLF). Tujuan digunakannya primer tersebut adalah untuk mengetahui distribusi dan diversitas *ketosynthase* yang dimiliki oleh setiap bakteri yang diidentifikasi. Pohon filogenetik untuk hasil analisis yang kedua ini ditunjukkan pada Gambar 4.6 di bawah ini:



**Gambar 4.6** Pohon Filogenetik Diversitas *ketosynthase* pada Bakteri Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* Menggunakan Primer HGLF Menunjukkan Diversitas dari Domain *ketosynthase* yang Dimiliki Setiap Bakteri. Sekuens yang diamplifikasi dalam studi ini ditandai dengan tanda merah

Pohon filogenetik yang ditunjukkan pada Gambar 4.6 menunjukkan bahwa isolat bakteri O memiliki cabang yang terpisah dengan isolat bakteri A dan K. Isolat bakteri O (*Pseudomonas aeruginosa*) termasuk ke dalam kelompok bakteri *Firmicutes* dan juga kelompok bakteri yang memiliki gen *ketosynthase* tipe I, sedangkan bakteri K (*Bacillus sp*) dan isolat bakteri A (*Lysinibacillus sphaericus*) termasuk ke dalam kelompok bakteri *Proteobacteria* dengan gen *ketosynthase* tipe II. Perbedaan cabang kekerabatan ini berkorelasi dengan hasil amplifikasi gen yang telah dilakukan, bahwa gen *ketosynthase* yang diamplifikasi dari sampel A dan K menunjukkan ukuran gen sekitar 400 pb, sedangkan gen *ketosynthase* yang diamplifikasi dari isolat bakteri O berukuran 700 pb. Berdasarkan Moffit & Neilan (2002), gen *ketosynthase* berukuran sekitar 700 pb. Namun pada penelitian yang telah dilakukan Liu *et al.* (2012), hasilnya menunjukkan bahwa gen *ketosynthase* tipe II pada umumnya memiliki ukuran yang lebih kecil, yaitu sekitar 470 pb. Hal tersebut sesuai dengan hasil amplifikasi gen *ketosynthase* dengan pohon filogenetik yang dihasilkan, bahwa sampel bakteri yang memiliki gen *ketosynthase* dengan ukuran sekitar 400 pb termasuk ke dalam golongan *ketosynthase* tipe II.

Selain itu, pohon filogenetik tersebut juga menunjukkan bahwa setiap bakteri yang telah teridentifikasi terpisah dengan kelompok bakteri yang lain. Berdasarkan Metsa-Keteela *et al.*, (2002), fragmen *ketosynthase* dapat menunjukkan evolusi species bakteri yang mensintesis *ketosynthase* tersebut, sehingga filogenetik yang tidak sama atau terpisah menunjukkan bahwa itu merupakan evolusi tersendiri dari poliketida aromatik yang dimiliki oleh setiap

bakteri. Hal tersebut memberikan penjelasan bahwa terpisahnya kelompok bakteri yang teridentifikasi pada pohon filogenetik tersebut menunjukkan terjadinya evolusi pada masing-masing gen *ketosynthase* pada bakteri itu sendiri.

