

OPTIMASI KONSENTRASI PRIMER DAN SUHU *ANNEALING* UNTUK DETEKSI GEN PKS-I PADA BAKTERI ASOSIASI MANGROVE *Avicennia marina* ASAL PANTAI TIRANG, SEMARANG

Optimization of Primer Concentration and Annealing Temperature for Detection of PKS-I Genes in Mangrove Associated Bacteries *Avicennia marina* From Tirang Beach, Semarang

Arinda Rosari, Aninditia Sabdaningsih, Diah Ayuningrum, dan Oktavianto Eko Jati

Departemen Sumber Daya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Jacob Rais, Tembalang, Semarang, Indonesia 50275; Telephone/Fax: 024-76480685

Email: arindarossa@gmail.com, aninditiasabdaningsih@live.undip.ac.id,
diahayuningrum21@lecturer.undip.ac.id, oktavianto.eko.jati@gmail.com

Diserahkan tanggal: 17 Agustus 2024, Revisi diterima tanggal: 29 September 2024

ABSTRAK

Mangrove hidup di wilayah ekstrem yang menjadikannya memiliki mekanisme unik dalam beradaptasi yang mengarah pada jalur metabolisme dan berpengaruh terhadap proses produksi metabolit sekundernya. Bakteri asosiasi mangrove memiliki sifat yang mirip dengan inangnya. Pemanfaatan bakteri asosiasi dinilai lebih berkelanjutan, karena proses penelitian menjadi lebih cepat, mudah dan terjangkau. Senyawa metabolit sekunder disintesis oleh gen penyandi seperti PKS (*polyketide synthetase*). Gen penyandi menjadi kunci dalam produksi senyawa metabolit sekunder. Produk metabolit sekunder di kalangan industri sedang banyak dicari. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan gen penyandi metabolit sekunder PKS-I pada isolat bakteri. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium *Tropical Marine Biotechnology*. Metode penelitian menggunakan metode deskriptif kualitatif. Proses penelitian melalui beberapa tahapan yaitu rekultur bakteri, ekstraksi DNA, Amplifikais dan visualisasi, kemudian hasil di deskripsikan dan didukung dengan data kuantitatif. Hasil deteksi gen PKS-I ditemukan pada 7 isolat yaitu D.I.2a, D.II.3c, B.I.1a, B.I.3a, A.I.3a, B.II.3a, dan D.III.2a menggunakan optimasi konsentrasi primer 10 μ M dan suhu *annealing* 50°C.

Kata Kunci: Ekstraksi DNA, Endofit, Metabolit Sekunder, PCR, Senyawa Bioaktif

ABSTRACT

Mangroves live in extreme areas that make them have unique mechanisms of adaptation that lead to metabolic pathways and affect the production of secondary metabolites. Mangrove-associated bacteria have similar properties to their hosts. Utilization of associated bacteria is considered more sustainable, because the research process becomes faster, easier and more affordable. Secondary metabolite compounds are synthesized by encoding genes such as PKS (polyketide synthetase). Encoding genes are key in the production of secondary metabolite compounds. Secondary metabolite products in the industry are being sought after. The purpose of this study was to detect the presence of PKS-I secondary metabolite encoding gene in bacterial isolates. The research was conducted at the Tropical Marine Biotechnology Laboratory. The research method used descriptive qualitative method. The research process went through several stages, namely bacterial reculture, DNA extraction, Amplifikais and visualization, then the results were described and supported by quantitative data. The results of PKS-I gene detection were found in 7 isolates namely D.I.2a, D.II.3c, B.I.1a, B.I.3a, A.I.3a, B.II.3a, and D.III.2a using primer concentration optimization of 10 μ M and annealing temperature of 50°C.

Keywords: Bioactive Compounds, DNA Extraction, Endophytes, PCR, Secondary Metabolites

PENDAHULUAN

Mangrove menjadi salah satu tanaman di wilayah pesisir yang sangat unik. Mangrove hidup di wilayah ekstrem, antara pertemuan darat dan laut. Pengaruh lingkungan membuatnya memiliki mekanisme adaptasi yang unik. Mekanisme adaptasi tersebut membuat Mangrove dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif tertentu. Menurut Dongoran et al. (2022), ekosistem mangrove merupakan lingkungan dengan potensi penghasil senyawa bioaktif yang besar. Kondisi lingkungan yang dinamis membuat organisme yang hidup disana memiliki tipe adaptasi yang unik. Hal tersebut mengarah pada jalur metabolisme yang berpengaruh terhadap proses produksi metabolit sekundernya.

Pemanfaatan mangrove secara langsung untuk senyawa bioaktif dalam lingkup komersil akan menyebabkan terganggunya ekosistem mangrove. Mikroorganisme asosiasi mangrove memiliki karakteristik yang mirip dengan inangnya. Hal tersebut memungkinkan banyak hal yang dapat dieksplor dari mikroorganisme asosiasi Mangrove. Menurut Ayuningrum et al. (2019), pemanfaatan bakteri asosiasi dinilai lebih berkelanjutan dalam proses eksplorasi senyawa bioaktif dari suatu lingkungan. Karena membuat proses menjadi lebih cepat, mudah dan terjangkau.

Beberapa jenis bakteri banyak ditemukan pada ekosistem Mangrove. Menurut Islamiah et al. (2017), genus bakteri yang sering ditemukan pada kawasan mangrove, khususnya jenis *Avicennia marina* yaitu genus *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, dan *Vibrio*. Beberapa genus bakteri yang telah disebutkan diketahui memiliki aktivitas metabolit sekunder di dalam tubuhnya. Menurut Yanti et al. (2021), bakteri yang hidup di sekitar tanaman mangrove biasanya dapat menghasilkan enzim ataupun senyawa metabolit sekunder yang dapat digunakan untuk membantu inangnya dalam melakukan pertahanan. Senyawa tersebut dapat menjadi pengendali hayati karena dapat berfungsi sebagai antimikroba (melawan patogen), membantu proses penyediaan fosfat dan fiksasi nitrogen, serta menghasilkan beberapa enzim penting seperti protease, kinitase, lipase, dan lain-lain.

Dalam kalangan industri senyawa bioaktif dicari untuk dimanfaatkan sebagai antitumor, antikanker, antijamur dan antibakteri. Senyawa hasil metabolit sekunder dibentuk oleh gen-gen penyandi seperti PKS (*polyketide synthetase*) yang memiliki tiga tipe. Menurut Komaki dan Tamura (2020), PKS dibentuk dari jalur perakitan yang berbeda sehingga menghasilkan beberapa tipe PKS. Gen PKS merupakan gen penyandi yang berperan dalam mensintesis senyawa-senyawa bioaktif untuk mempertahankan kehidupannya. Gen penyandi menjadi kunci dalam produksi senyawa metabolit sekunder. Produk

metabolit sekunder di kalangan industri sedang banyak dicari, untuk itu perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen penyandi metabolit sekunder yaitu PKS-I pada isolat bakteri asosiasi mangrove *Avicennia marina* yang berasal dari Pantai Tirang, Semarang.

Berdasarkan penelitian terdahulu oleh Handayani et al. (2023), diperoleh hasil aktivitas antimikroba pada 8 isolat bakteri endofit yang diteliti. Hal tersebut mengindikasikan bahwa bakteri endofit tersebut memiliki gen penyandi metabolit sekunder di dalamnya. Akan tetapi, hal tersebut harus dipastikan melalui uji secara molekuler untuk mendeteksi keberadaan gen penyandi metabolit sekunder pada 8 isolat bakteri tersebut.

METODE PENELITIAN

Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan pada Januari-Mei 2024. Sampel isolat diperoleh dari penelitian sebelumnya oleh Handayani et al. 2023. Ekstraksi sampel dan identifikasi molekuler di laksanakan di Laboratorium *Tropical Marine Biotechnology*, FPIK, Universitas Diponegoro, Kota Semarang, Jawa Tengah.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain autoklaf, bunsen, cawan petri, *centrifugator*, elektroforesis kit, erlenmeyer, gelas ukur, jarum ose, *Laminar Air Flow* (LAF), *hot plate* dan *magnetic stirrer*, mikropipet dan tip, neraca, *shaker*, *thermal cycler*, *UV-Visualization*, *vortex*. Bahan yang digunakan diantaranya isolat bakteri berpotensi pada uji antibakteri sebelumnya, agarose, akuades, air laut, alkohol 70%, ddH₂O, DNA *Ladder*, *gel green stain*, *My Taq™ Red Mix-Bioline*, Larutan TBE 10%, *loading dye*, media *Peptone Yeast Agar*, primer K1F dan M6R, *Zymo Research DNA kit*.

Prosedur penelitian

Sampel isolat diperoleh dalam keadaan beku setelah penyimpanan pada suhu pada suhu -80°C selama 12 bulan untuk selanjutnya dicairkan lalu ditumbuhkan kembali.

Rekultur bakteri

Rekultur bertujuan untuk menumbuhkan kembali bakteri setelah berada di fase dorman (tidur). Cara rekultur yaitu dengan mengambil 0,01 ml untuk diinokulasikan pada media *peptone yeast broth* 50 ml (salinitas disesuaikan), lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C di atas shaker dengan kecepatan 100 rpm. Setelah itu dapat disimpan sebagai stok kerja atau dikultur kembali sesuai kebutuhan (Zainuddin et al., 2022).

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA murni. Langkah ekstraksi DNA mengikuti protokol yang tertera pada *Zymo Research DNA kit*. Isolat ditanam kembali selama 1x24 jam pada suhu ruang

sampai tumbuh optimal. Selanjutnya 50-100 mg (1-2 ose) bakteri dipindahkan ke dalam *ZR BashingBead™ Lysis Tube* (0.1 dan 0.5 mm), kemudian ditambahkan 200 µl PBS dan 750 µl *ZR BashingBead™ Buffer*, lalu di vortex selama 20 menit. Selanjutnya sampel disentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Lalu hasil supernatan dipindahkan sebanyak 400 µl ke *Zymo-Spin™ III-F Filter* dalam *Collection Tube* dan disentrifugasi 8000 rpm selama satu menit. Selanjutnya ditambahkan *Genomic Lysis Buffer* ke filtrat yang terbentuk di *Collection Tube* dan dihomogenisasi. Campuran tersebut dipindahkan sebanyak 800 µl ke *Zymo-Spin™ IICR Column* dalam *Collection Tube* baru, lalu disentrifugasi 10.000 rpm selama satu menit. Buang cairan dari *Collection Tube* dan mengulangi langkah sebelumnya. Selanjutnya ditambahkan 200 µl *DNA Pre-Wash Buffer* ke *Zymo-Spin™ IICR Column* dalam *Collection Tube* baru, lalu disentrifugasi kembali pada 10.000 rpm selama satu menit. Setelah itu, ditambahkan 500 µl *g-DNA Wash Buffer* ke *Zymo-Spin™ IICR Column* dan disentrifugasi selama satu menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Selanjutnya *Zymo-Spin™ IICR Column* dipindahkan ke *microtube* 1,5 ml steril dan ditambahkan 100µl (minimum 35 µl) *DNA Elution Buffer* lalu disentrifugasi kembali selama 30 detik pada 10.000 rpm. Cairan yang tertampung pada *microtube* merupakan ekstrak DNA yang dapat disimpan dalam *freezer* -20°C agar terjaga kualitasnya.

Amplifikasi gen PKS-I

Amplifikasi DNA dilakukan untuk mengambil gen tertentu dari fragmen DNA yang diperbanyak secara sintesis melalui metode PCR (*Polymerase chain reaction*). Proses amplifikasi DNA menggunakan metode PCR dengan primer spesifik untuk mendeteksi adanya gen tertentu. Primer gen PKS-I menggunakan primer K1F (5'-TSA AGT CSA ACA TCC GBC A-3') dan M6R (5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3') (Ghashghaei et al., 2022).

Komposisi PCR terdiri dari 2µl DNA *template* dan mix PCR yang terdiri dari 1µl Primer Forward dengan konsentrasi 10µM, 1µl Primer Reverse dengan konsentrasi 10µM, 12,5µl *My Taq™ Red Mix-Bioline* dan 8,5µl ddH₂O (Sari et al., 2021). Menurut Ghashghaei et al. (2022) dengan modifikasi, amplifikasi gen PKS-I dilakukan pada suhu denaturasi awal 95°C selama tiga menit diikuti dengan 35 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama satu menit per siklus. *Annealing* pada suhu 50°C selama satu menit. Ekstensi pada suhu 72°C selama satu menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama tujuh menit.

Visualisasi hasil PCR

Visualisasi hasil PCR dilakukan melalui proses elektroforesis menggunakan gel agarose 1% dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah itu dilakukan visualisasi dengan *UV-Visualization*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi DNA

Isolat bakteri sejumlah 8 sampel diekstraksi menggunakan *Zymo Research DNA kit*. Hasil ekstraksi kemudian diukur konsentrasi dan kemurnian DNA nya menggunakan *ThermoScientific Nanodroptm 2000/2000c Spectrophotometer*. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian DNA

No	Kode Isolat	Konsentrasi (ng/ µl)	Kemurnian
1	D.I.2a	118,7	1,92
2	D.I.3c	78	1,90
3	B.I.1a	59,1	2,02
4	B.I.3a	109,5	1,92
5	A.I.3a	128,2	1,89
6	D.II.3a	32,2	1,56
7	B.II.3a	92,4	1,82
8	D.III.2a	103,3	2,00

Berdasarkan hasil pengukuran, kandungan konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi memiliki nilai yang bervariasi tetapi masih tergolong baik. Hasil ekstraksi yang baik memiliki kemurnian antara 1,8-2 dan konsentrasi DNA lebih dari 100ng/µl. Pengukuran dilakukan dengan mengambil 1 µl *Buffer* ekstraksi lalu ditetaskan sebagai blanko, untuk pengukuran sampel ditetaskan 1 µl sampel. Hasilnya akan keluar dalam bentuk tabel. Konsentrasi DNA dapat dilihat dalam kolom *Concentration nucleid acid* dan kemurnian DNA dapat dilihat pada kolom A260/A280. Hasil ekstraksi pada 8 isolat sampel tergolong baik, karena berkisar antara 1,82-2,02. Kecuali 1 sampel dengan kode isolat D.II.3a yang memiliki kemurnian 1,56. Menurut Priyastomo et al. (2023), kemurnian DNA diukur berdasarkan penyerapan cahaya UV. DNA akan menyerap sinar UV pada gelombang dengan panjang 260nm sedangkan kontaminannya seperti protein akan menyerap cahaya gelombang dengan panjang 280 nm. Sehingga kemurnian DNA dilihat dari perbandingan nilai absorbansi panjang gelombang 260nm dengan panjang gelombang 280nm. Menurut Nugroho et al. (2016), nilai kemurnian DNA kurang dari 1,8 diperkirakan terkontaminasi oleh protein, sedangkan nilai kemurnian DNA yang lebih dari 2,0 diindikasikan terkontaminasi oleh RNA.

Konsentrasi DNA dari 8 sampel isolat sangat bervariasi. Terdapat 4 isolat yang memiliki hasil konsentrasi di atas 100 ng/µl, yaitu D.I.2a, B.I.3a, A.I.3a dan D.III.2a, sedangkan sisanya memiliki konsentrasi dibawah 100 ng/µl, yang berkisar antara 32,2-92,4 ng/µl. Akan tetapi kisaran konsentrasi 32,2-92,4 ng/µl juga sebenarnya sudah cukup untuk melakukan metode PCR. Menurut Pharmawati (2009),

untuk melakukan metode PCR hanya dibutuhkan konsentrasi DNA *template* sekitar 20-30 ng/μl. Konsentrasi DNA yang tinggi dapat menambah kontaminan sehingga berpengaruh dalam proses PCR.

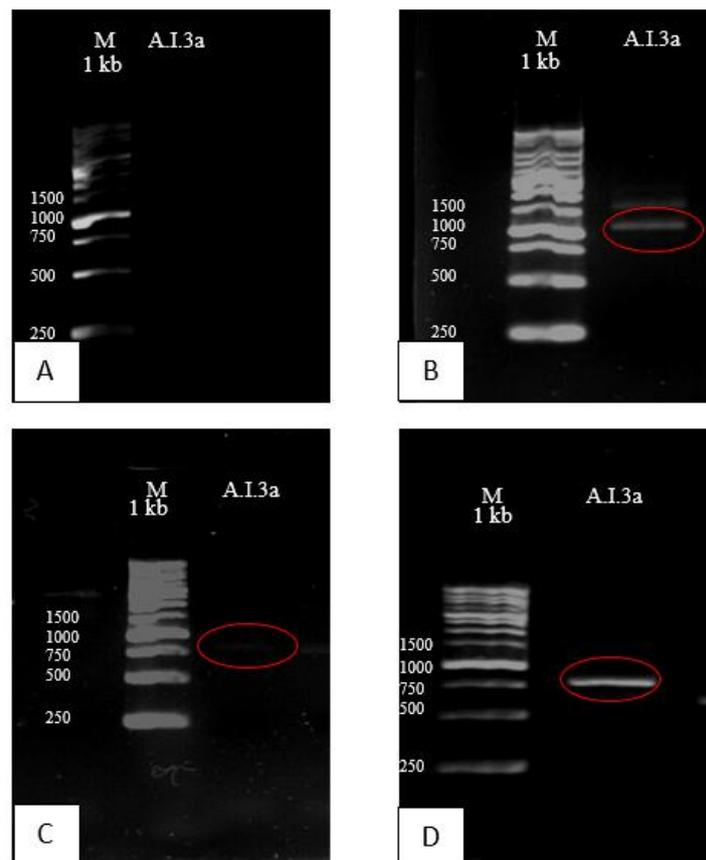
Nilai kemurnian DNA sangat berpengaruh terhadap hasil identifikasi molekuler nantinya. Menurut Emilia et al. (2021), ekstraksi DNA dilakukan agar DNA murni dapat terpisah dari protein, lemak maupun karbohidrat. Hasil ekstraksi DNA yang bagus dapat menjadi penanda keberhasilan uji molekuler. Sampel yang akan diekstraksi dianjurkan sampel yang masih baru, untuk bakteri dianjurkan yang berumur 24 jam agar dapat memperoleh hasil DNA yang baik dan berkualitas. Seperti pada penelitian Pratiwi et al. (2023), lama inkubasi bakteri sangat berpengaruh terhadap hasil ekstraksi DNA yang dihasilkan. Inkubasi yang lebih lama membuat dinding sel bakteri lebih kuat, sehingga perlu usaha lebih untuk dapat melisiskan dinding sel bakteri secara sempurna. Akan tetapi, proses lisis yang berlebihan juga dapat merusak atau mematikan DNA (Baharuddin et al., 2014). Selain itu sampel yang tidak fresh juga memungkinkan terjadi degradasi DNA (Saputro et al., 2015).

Terdapat banyak faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi DNA hasil ekstraksi. Proses lisis sangat berpengaruh terhadap hasil ekstraksi. Proses lisis yang tepat memiliki hasil dinding sel yang

sudah hancur secara sempurna tetapi tidak sampai menghancurkan sel di dalamnya. Faktor kedua yang mungkin mempengaruhi hasil ekstraksi DNA yaitu *Buffer* yang digunakan. *Buffer* sangat berpengaruh terhadap proses pencucian sehingga akan mempengaruhi DNA yang dihasilkan (Fadlan et al., 2019). Jika metode dan kit ekstraksi yang digunakan sama antar setiap sampel, tetapi hasil ekstraksi memiliki kemurnian dan konsentrasi yang berbeda, hal tersebut bisa saja disebabkan oleh jumlah isolat bakteri yang dimasukkan ketika proses ekstraksi. Menurut Gall-David et al. (2023), jumlah biomassa bakteri yang dimasukkan ke dalam kit untuk di ekstraksi juga dapat mempengaruhi hasil kemurnian dan konsentrasi DNA yang dihasilkan. Karena belum tentu sampel yang dimasukkan murni berisi bakteri seluruhnya, mungkin saja bakteri bercampur dengan kontaminan lainnya.

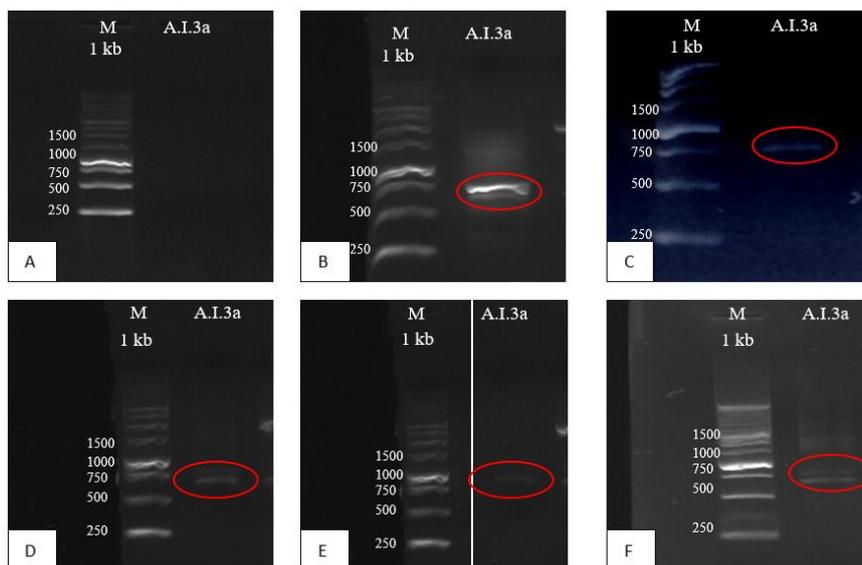
Optimasi konsentrasi primer

Deteksi gen PKS-I pada isolat bakteri berpotensi dilakukan dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Optimasi konsentrasi primer dilakukan untuk mendapatkan komposisi konsentrasi primer yang tepat agar gen PKS-I dapat teramplifikasi secara sempurna. Hasil optimasi konsentrasi primer dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil optimasi konsentrasi primer

Keterangan: A=Konsentrasi primer 0,4μM, B=Konsentrasi primer 2μM, C=Konsentrasi primer 5μM, D=Konsentrasi primer 10μM



Gambar 2. Hasil optimasi suhu *annealing*

Keterangan: A=suhu *annealing* 46,5°C, B= suhu *annealing* 50°C, C= suhu *annealing* 53°C, D= suhu *annealing* 55°C, E= suhu *annealing* 58°C, F= suhu *annealing* 60°C.

Hasil optimum pada optimasi konsentrasi primer diperoleh pada konsentrasi primer 10 μ M. Proses optimasi konsentrasi primer dilakukan dalam empat kali percobaan untuk menentukan konsentrasi primer yang tepat. Percobaan pertama yaitu menggunakan primer dengan konsentrasi 0,4 μ M. Konsentrasi ini diperoleh dari anjuran pada formulir pembelian primer (Ayuso-Sacido dan Genilloud, 2005). Akan tetapi karena tidak menunjukkan hasil sama sekali, maka konsentrasi ditingkatkan menjadi 2 μ M dan 5 μ M. Pada konsentrasi 2 μ M, muncul pita tipis dan *smear* pada sampel A.I.3a dengan konsentrasi DNA *template* paling tinggi yaitu 128 ng/ μ l, sedangkan pada sampel lainnya tidak muncul pita sama sekali. Pada konsentrasi 5 μ M, pita tipis dapat ditemukan pada sebagian besar sampel, yaitu sampel A.I.3a, B.I.1a, B.I.3a, B.II.3a, dan D.I.3c, sedangkan pada sampel D.II.3a, D.I.2a dan D.III.2a tidak ditemukan pita. Hal tersebut dikarenakan rendahnya konsentrasi primer dan konsentrasi DNA *template* sehingga antara primer dan DNA *template* sulit untuk teramplifikasi. Menurut Pharmawati (2009), tinggi rendahnya konsentrasi primer sangat berpengaruh terhadap amplifikasi. Primer yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat mengakibatkan tidak terjadi amplifikasi. Pada konsentrasi 10 μ M dapat ditemukan pita tunggal yang cukup tebal pada 6 sampel yaitu A.I.3a, B.I.1a, B.I.3a, B.II.3a, D.I.3c, dan D.III.2a. Serta pita *smear* pada sampel D.I.2a. Sampel D.II.3a tidak memunculkan pita sama sekali.

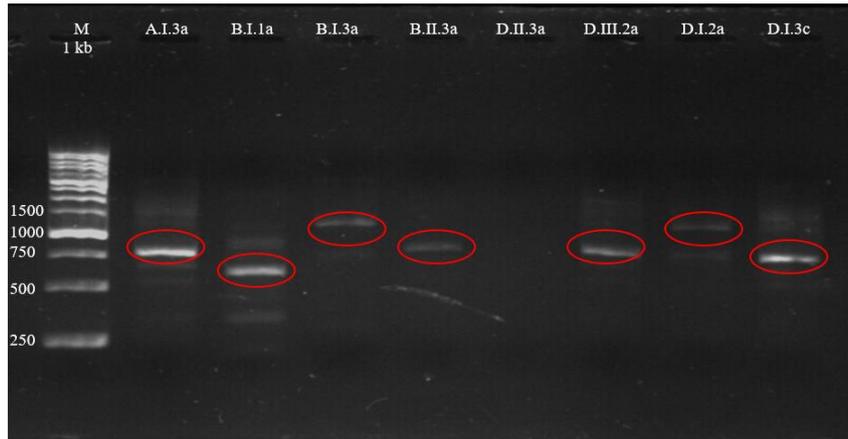
Optimasi suhu *annealing*

Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk menemukan suhu *annealing* yang tepat untuk penempelan primer. *Annealing* merupakan salah satu tahap yang sangat penting dalam proses PCR, karena pada tahap ini primer akan menempel pada DNA

template. Tahap ini akan sangat berpengaruh terhadap spesifitas dan jumlah DNA yang dihasilkan. Hasil optimasi suhu *annealing* untuk deteksi gen PKS-I dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil optimum pada optimasi suhu *annealing* untuk deteksi gen PKS-I diperoleh pada suhu *annealing* 50°C. *Annealing* menggunakan suhu lainnya, yaitu pada suhu 46,5°C tidak menghasilkan pita. Pada suhu 53°C, 55°C, 58°C dan 60°C dapat menghasilkan pita, akan tetapi tipis.

Optimasi suhu *annealing* terhadap primer K1F dan M6R untuk mendeteksi PKS-I pada sampel A.Am.P.3a menggunakan primer dengan konsentrasi 10 μ M diawali dengan suhu *annealing* 55°C dan 58°C mengikuti amplifikasi Ayuso-Sacido dan Genilloud (2005) dengan modifikasi. Hasil yang didapatkan yaitu pita muncul pada kedua suhu tersebut, akan tetapi pada suhu 55°C pita tersebut samar, sedangkan pada suhu 58°C pita yang ditemukan tunggal, tetapi sangat tipis. Kedua hasil tersebut masih kurang optimal untuk mendeteksi gen PKS-I. Pada percobaan selanjutnya dilakukan menggunakan suhu *annealing* 53°C. Hasil diperoleh pita tunggal yang lebih jelas daripada dua suhu sebelumnya. Selanjutnya dilakukan percobaan menggunakan suhu *annealing* 60°C mengikuti optimasi gen NRPS. Hasil yang didapatkan sangat tipis dan *smear*, hingga tidak terbaca. Lalu selanjutnya percobaan dilakukan menggunakan suhu *annealing* 46,5°C. Suhu tersebut tidak menunjukkan pita sama sekali. Diduga karena suhu 46,5°C terlalu jauh dari Tm (*Temperature melting*) primer K1F dan M6R yaitu 55,7°C. Menurut Herman et al. (2018), optimasi suhu *annealing* dalam mendeteksi suatu gen target umumnya dilakukan pada kisaran $\pm 5^\circ\text{C}$ dari Tm (suhu melelehnya primer dalam proses amplifikasi). Percobaan terakhir dilakukan menggunakan suhu



Gambar 3. Hasil akhir deteksi gen PKS-I (suhu *annealing* 50°C dan konsentrasi primer 10 µM) Target panjang basa 1200-1400bp

annealing 50°C. Hasil yang didapatkan berupa pita tunggal, tebal dan bercahaya, hasil tersebut sudah cukup optimal untuk dapat diterapkan pada seluruh isolat sampel bakteri asosiasi mangrove *Avicennia marina* untuk mendeteksi keberadaan gen PKS-I.

Berikut hasil akhir deteksi gen PKS-I menggunakan suhu *annealing* 50°C dengan konsentrasi primer 10 µM dapat dilihat pada Gambar 3. Ringkasan hasil akhir deteksi keberadaan gen PKS-I pada isolat bakteri asosiasi mangrove *Avicennia marina* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil deteksi gen PKS-I pada isolat bakteri

No	Kode Isolat	Deteksi Gen PKS-I
1	D.I.2a	+
2	D.I.3c	+
3	B.I.1a	+
4	B.I.3a	+
5	A.I.3a	+
6	D.II.3a	-
7	B.II.3a	+
8	D.III.2a	+

Keterangan: (+)= isolat yang memiliki gen PKS-I, (-)= isolat yang tidak memiliki gen PKS-I

Hasil akhir optimasi suhu *annealing* optimal untuk deteksi gen PKS-I diperoleh pada suhu 50°C dengan hasil pita tunggal dan tebal pada sampel A.I.3a, B.I.1a, dan D.I.3c. Hasil pita tunggal dan tipis ada pada sampel B.I.3a, B.II.3a, dan D.III.2a. Hasil *smear* dan tipis terlihat pada sampel D.I.2a, dan untuk sampel D.II.3a tidak menunjukkan hasil sama sekali. Pita yang muncul menggunakan konsentrasi primer 10 µM berkisar pada panjang basa 750-1500. Perbedaan hasil ketebalan pita disebabkan oleh sampel isolat yang berbeda jenisnya. Menurut Ghashghaei *et al.* (2023), setiap jenis bakteri memiliki optimasi suhu *annealing* yang berbeda-beda untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal. Pada penelitian Lee *et al.* (2014), untuk mendeteksi gen PKS-I dengan hasil yang optimal digunakan suhu *annealing* 57°C. Panjang basa yang masih kurang sesuai dengan target

diakibatkan oleh belum optimalnya optimasi yang dilakukan, baik dari amplifikasi maupun komposisi PCR yang digunakan, seperti konsentrasi primer dan DNA *template*. Bakteri yang memiliki aktivitas antimikroba juga tidak hanya disebabkan adanya gen PKS-I di dalam tubuhnya. Terdapat jenis gen lain yang juga dapat menjadi sumber antimikroba pada bakteri antara lain PKS-II, PKS-III, dan NPRS (Kapley *et al.*, 2016).

Penelitian mengenai optimasi konsentrasi primer dan suhu *annealing* pada bakteri asosiasi mangrove *Avicennia marina* untuk mengetahui keberadaan gen PKS I dapat dijadikan sebagai pedoman dalam mencari optimasi dikemudian hari. Pentingnya keberadaan gen PKS I dalam isolat bakteri yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat dan sebagainya mendukung pemanfaatan sumber daya dari bidang perikanan.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai deteksi gen PKS-I, didapatkan hasil optimasi pada suhu *annealing* 50°C dan konsentrasi primer 10 µM. Hasil terlihat pada 7 isolat sampel yaitu sampel D.I.2a, D.II.3c, B.I.1a, B.I.3a, A.I.3a, B.II.3a, dan D.III.2a.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas dana hibah Riset Publikasi Internasional (RPI) Universitas Diponegoro dengan Nomor SK:185-71/UN7.D2/PP/V/2023, yang telah mendanai penelitian ini serta kepada tim penelitian yang telah membantu selama keberjalanan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ayuningrum, D., Liu, Y., Riyanti, Sibero, M. T., Kristiana, R., Asagabaldan, M. A., Wuisan, Z. G.,

- Trianto, A., Radjasa, O. K., Sabdono, A., dan Schäberle, T. F. 2019. Tunicate-Associated Bacteria Show a Great Potential for the Discovery of Antimicrobial Compounds. *PLoS ONE*, 14(3): 1-14.
- Ayuso-Sacido, A., and O. Genilloud. 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes : detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49: 10- 24.
- Baharuddin, M., Patong, A. R., Ahmad, A., dan La Nafie, N. 2014. Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Hidrolisis Cmc oleh Enzim Selulase dari Isolat Bakteri Larva Kupu-Kupu Cossus Cossus. *Teknosains: Media Informasi Sains dan Teknologi*, 8(3) 343-356.
- Dongoran, S.S.I., Subagiyo, dan Setyati, W. A. 2022. Pseudomonas sp., Moraxella sp., Vibrio sp., dari Sedimen Mangrove sebagai Antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Journal of Marine Research*, 11(3): 475-482.
- Fadlan, F., Ai, D., Tantan, H. A., Asep, D., dan Ernawati. 2019. Perbandingan Ekstraksi DNA Salmonella typhi dari Kultur Darah Metode Spin Column dan Alcohol Based. *Jurnal Riset Kesehatan*, 11(2): 232-243.
- Emilia, Harnelly, E., dan Anhar, A. 2021. Optimalisasi Metode Ekstraksi DNA Daun, Kulit Kayu dan Kayu Pinus merkusii Jungh. Et de Vriese. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian*, 6(4): 766-778.
- Gall-David, S.L., Boudry, G., dan Bataillon, S. B. 2023. Comparison of Four DNA Extraction Kits Efficiency for 16SrDNA Microbiota Profiling of Diverse Human Samples. *Future Science OA*, 9(1).
- Ghashghaei, S., Etemadifar, Z., Tavassoli, M., dan Mofid, M. R. 2022. Optimization of Degenerate PCR Conditions for Reducing Error Rates in Detection of PKS and NRPS Gene groups in Actinomycetes. *PubMed*, 15(1): 28-37.
- Handayani, N., Sabdaningsih, A., Jati, O. E., dan Ayuningrum, D. 2023. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Akar Avicennia marina di Kawasan Mangrove Pantai Tirang, Semarang. *Jurnal Pasir Laut*, 7(2): 68-73.
- Herman, Nainggolan, M., dan Roslim, D. I. 2018. Optimasi Suhu Annealing untuk Empat Primer RAPD pada Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.). *Jurnal Dinamika Pertanian*, 34(1): 41-46.
- Islamiah, D. N., Rahmawati, dan Linda, R. 2017. Jenis-jenis Bakteri Rizosfer Kawasan Tanah Mangrove Avicennia di Kelurahan Terusan, Kecamatan Mempawah Hilir, Kalimantan Barat. *Jurnal Protobiont*, 6(3): 165-172.
- Kapley, A., Tanksale, H., Sagarkar, S., Prasad, A. R., Kumar, R. A., Sharma, N., Qureshi, A., dan Purohit, H. J. 2016 Antimicrobial activity of *Alcaligenes* sp. HPC 1271 Against Multidrug Resistant Bacteria. *Functional and Integrative Genomics*, 16(1): 57-65.
- Komaki, H. dan Tamura, T. 2020. Polyketide Synthase and Nonribosomal Peptide Synthase Gene Clusters in Type Strains of the Genus Phytohabitans. *Life (Basel)*, 10(11): 257.
- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Goh, B. H., Yin, W. F., Ab Mutalib, N. S., dan Chan, K. G. 2014. Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated From Tropical Mangrove Sediments in Malaysia. *The Scientific World Journal*, 2014: 698178.
- Nugroho, K., Terryana, R. T., Rijzaani, H., dan Lestari, P. 2016. Metode Ekstraksi DNA pada Jatropha spp. Tanpa Menggunakan Nitrogen Cair. *Jurnal Littri*, 22(4): 159-166.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA PCR-RAPD Pada *Grevillea* spp. (*Proteaceae*). *Jurnal Biologi*, 13(1): 12-16.
- Pratiwi, N., Pramila, C., Safitri, F., Namidya, S. K., dan Putri, D. H. 2023. Pengaruh Radiasi Mikro Terhadap DNA Mikroba. *Serambi Biologi*, 8(1): 74-78.
- Priyastomo, D. A., Hilmia, N., Pramudyaswari, E. F., dan Islami, R. Z. 2023. Analisis Konsentrasi serta Kemurnian DNA Hasil Ekstraksi Rumput Raja (*Pennisetum purpureoides*) dan Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum*) Menggunakan Metode CTAB dan DNAzol. *Pastura*, 12(2): 89-92.
- Saputro, A., Yudianto, A., dan Koesbardiati, T. 2015. Pengaruh Lama Paparan Suhu Kamar Terhadap Kualitas DNA pada Pemeriksaan Swab Earphone dalam Penentuan Jenis Kelamin. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 17(1): 33-45.
- Sari, F., Widyorini, N., dan Sabdaningsih, A. 2021. Isolasi dan Identifikasi dengan Gen 16S Rna dari Bakteri Asosiasi Spons Kelas Demospongiae di Perairan Tulamben Bali. *Jurnal Pasir Laut*, 5(2): 110-118.
- Yanti, D., Rahmawati dan Kurniatuhadi, R. 2021. Karakteristik Morfologis dan Fisiologis Bakteri Endofit dari Akar Napas Tumbuhan Avicennia marina (Forsk.) Vierh di Mempawah Mangrove Park (Mmp). *Jurnal Biologica Samudra*, 3(2): 166-183.
- Zainuddin, M., Pringgenies, D., Radjasa, O. K., Haeruddin, Sabdaningsih, A., dan Herawati, V. E. 2022. Optimasi Kondisi Inkubasi Kultur (Suhu dan Agitasi) Terhadap Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri *Bacillus firmus* Asosiasi Sponge (Porifera: Demospongiae) dari Nusa Lembongan Bali Indonesia. *Journal of Marine Research*, 11(3): 547-556.