



BAB 4

DETEKSI DAN KARAKTERISASI GEN PENYANDI BIOSINTESIS SENYAWA ANTICENDAWAN

Pendahuluan

Beberapa gen atau kelompok gen yang mengkode biosintesis senyawa anticendawan dan berperan dalam penekanan penyakit pada *Pseudomonas* sp. seperti pioluteorin, pirolnitritin, fenazin dan DAPG telah diidentifikasi dan dikarakterisasi dengan baik. Kelompok gen penyandi biosintesis pioluteorin telah diidentifikasi dan dikarakterisasi pada *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Nowak-Compson *et al.* 1999). Ada sepuluh gen yang diperlukan untuk biosintesis pioluteorin (*plt*), terdiri dari delapan gen struktural *plt*LABCDEFGF dan dua gen regulator transkripsi *plt*R dan *plt*M. Sekuen lengkap gen pioluteorin (33648 bp) *Pseudomonas fluoescens* Pf5 dapat diakses di *GenBank* dengan nomer akses F081920. Deduksi sekuen asam amino delapan gen *plt* memiliki kemiripan dengan sekuen gen yang diketahui mempunyai fungsi biosintesis yaitu tipe 1 poliketida sintetase (*plt*B, *plt*C), asil koenzim A (*acil-CoA*) dehidrogenase (*plt*E), asil koenzim-A sintetase (*plt*F), thioesterase (*plt*G) dan tiga halogenase (*plt*A, *plt*D dan *plt*M). Produk delapan gen *plt* terlibat dalam biosintesis pioluteorin dari prekursor prolin dan asetat.

Empat gen *prn*ABCD yang terlibat dalam biosintesis pirolnitritin telah dikarakterisasi oleh Hammer *et al.* (1997). Sekuen lengkap gen *prn*ABCD *Pseudomonas fluorescens* (6197 bp) yaitu triptofan halogenase PrnA (*prn*A), PrnB (*prn*B), halogenase PrnC (*prn*C) and aminopirolnitritin oksidase PrnD (*prn*D) dapat diakses di *GenBank* dengan nomer akses U74493. Kirner *et al.* (1998) menjelaskan setiap fungsi produk gen *prn*ABCD. Produk gen *prn*A mengkatalisis klorinasi L-triptofan menjadi 7-kloro-L-triptofan. Produk gen *prn*B mengkatalisis pengaturan cincin dan dekarboksilasi untuk mengubah 7-kloro-L-triptofan menjadi monodekloroaminopirolnitritin. Produk gen *prn*C mengklorinasi monodekloroaminopirolnitritin pada posisi 3 untuk membentuk aminopirolnitritin. Produk gen *prn*D mengkatalisis oksidasi gugus amino dari aminopirolnitritin menjadi gugus nitro untuk membentuk pirolnitritin.



Lokus biosintesis fenazin terdiri dari tujuh gen dalam satu operon yang disebut *phz*ABCDEFG pada *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (Mavrodi *et al.* 1998). Pierson *et al.* (1995) menjelaskan gen fenazin pada *P. aureofaciens* 30-84 terdiri dari *phz*FABCD (*GenBank* L48339). Protein PhzF mirip dengan 3-deoksi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfat sintase pada tanaman *Solanaceae*. PhzA mempunyai kemiripan dengan 2,3-dihidro-2,3-dihidroksibenzoat sintase (EntB) dari *Escherichia coli*. PhzB mempunyai kemiripan dengan anthranilat sintase. Meskipun PhzC memiliki kemiripan yang sedikit dengan gen yang sudah diketahui, produknya bertanggung jawab untuk mengkonversi asam fenazin-1-karboksilat menjadi asam 2-hidroksi-fenazin-1-karboksilat. PhzD mempunyai kemiripan dengan piridoksamin fosfat oksidase. Oleh karenanya, produk gen ini diyakini mempunyai kemiripan dengan enzim-enzim dalam jalur biosintesis asam nikotinat, enteroselin dan triptofan. Sementara, Delaney *et al.* (2001) menjelaskan gen fenazin *phz*XYFABCD pada *P. aureofaciens* 30-84. Gen *phz*X dan *phz*Y homolog dengan *phz*A dan *phz*B pada *P. fluorescens* 2-79. Sekuen gen *phz*ABCDEFG pada *Pseudomonas fluorescens* 2-79 dapat diakses di *GenBank* dengan nomer L48616 dan *phz*X dan *phz*Y (1211 bp) pada *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* dengan nomer AF007801.

Gen yang terlibat dalam biosintesis antifungi 2,4 diasetilfloroglucinol (DAPG) telah diklon dari galur-galur *Pseudomonas* yang berbeda (Keel *et al.* 1992; Keel *et al.* 1996). Bangera dan Thomashow (1999) telah mengidentifikasi dan mengkarakterisasi kelompok gen untuk biosintesis DAPG dari *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Sekuen seluruh lokus biosintesis, sekarang telah tersedia untuk *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Enam *open reading frame* *phl*ABCDEF teridentifikasi dalam lokus ini. Gen *phl*ABC terkonservasi di eubakteria dan archaeobakteria. Gen *phl*D mengkode poliketida sintase yang homolog dengan *chalcone* dan *stilbene* sintase pada tanaman. Gen *phl*E dan *phl*F yang mengapit di kedua sisinya mengkode *putative efflux* dan *regulator*. *Phl*ABC diperlukan untuk mengubah *monoacetylphloroglucinol* (MAPG) menjadi 2,4 DAPG, produk gen ini juga berfungsi dalam sintesis MAPG. *Phl*D bertanggungjawab untuk sintesis MAPG yang merupakan prekursor DAPG dari *acetoacetyl-CoA*. Sekuen gen *phl*ABCDEF (7198 bp) dapat diakses di *GenBank* dengan nomer U41818.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Ketersediaan gen biosintesis antifungi yang telah diklon dan disekuon memudahkan untuk mengembangkan *primer* dan *probe* yang dapat digunakan untuk mendeteksi *Pseudomonas* spp. penghasil senyawa anticendawan. Raaijmaker *et al.* (1997) dan de Souza dan Raaijmaker (2003) telah berhasil membuat *primer* dan *probe* spesifik berdasarkan sekuen gen yang telah diketahui. Oleh karenanya, deteksi gen penyandi senyawa anticendawan tertentu pada bakteri penghasil anticendawan telah sangat dipermudah. *Primer* dan *probe* spesifik dapat juga membantu mempercepat pencarian galur-galur penghasil antifungi yang lebih teradaptasi pada kondisi-kondisi tanah lokal dan yang lebih efektif pada sistem tanaman-patogen tertentu (Raaijmackers *et al.* 1997).

Pendekatan yang dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya gen penyandi senyawa anticendawan pada bakteri *Pseudomonas* sp. CRB adalah dengan menggunakan primer spesifik yang telah dikenal. Dengan cara ini akan dapat diketahui apakah bakteri *Pseudomonas* sp. CRB mempunyai gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan pioluteorin, pirolnitritin, fenazin 1-asam karboksilat dan 2,4 diasetilfloroglusinol. Dengan cara ini juga dapat menemukan dengan cepat bakteri yang mempunyai gen penyandi senyawa anticendawan tersebut atau tidak. Jika deteksi gen tidak menunjukkan hasil positif maka senyawa anticendawan yang lain, yang mungkin belum diketahui, yang berbeda atau mungkin baru diperkirakan terlibat dalam sifat antagonismenya.

Tujuan penelitian

1. Mendeteksi secara molekuler gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan pioluteorin, pirolnitritin, fenazin 1-asam karboksilat dan 2,4 diasetilfloroglusinol pada bakteri *Pseudomonas* sp. CRB.
2. Mengkarakterisasi gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan berdasarkan analisis sekuen yang telah diklon.

Bahan dan Metode

Deteksi gen anticendawan dengan PCR. Deteksi gen anticendawan 2,4- DAPG, fenazin, pioluteorin dan pirolnitritin dilakukan dengan *polymerase chain reaction*

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



(PCR) menggunakan primer spesifik yang telah dikenal secara internasional dapat mengamplifikasi segmen gen tersebut. Bakteri penghasil fenazin, pirolnitritin dan pioluteorin *Pseudomonas chlororaphis* DF190 and DF202 (dari laboratorium Prof. Dilantha Fernando, *University of Manitoba*, Kanada), bakteri penghasil anticendawan fenazin *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, bakteri penghasil anticendawan DAPG *Pseudomonas fluorescens* Q2-87, Q8-R1 dan bakteri penghasil anticendawan DAPG, pioluteorin, pirolnitritin *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (dari laboratorium Dr. Linda Thomashow, *United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service (USDA-ARS), Washington State University*, Amerika Serikat) disertakan dalam penelitian ini sebagai bakteri kontrol positif.

Reaksi PCR. Tujuh pasang primer digunakan untuk mengamplifikasi gen DAPG, fenazin, pioluteorin dan pirolnitritin. Amplifikasi PCR (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, Amerika Serikat) dilakukan dalam 25µl campuran reaksi yang mengandung 2x GC bufer II, 400µM campuran *deoxynucleotide triphosphate* (dNTP), 2.5 unit Takara *long amplification (LA) Taq* polimerase (Takara, Jepang), 10 pmol masing-masing primer, 20 ng cetakan DNA genom, dan ddH₂O sampai volume 25 µl. Kondisi PCR untuk amplifikasi masing-masing gen dijelaskan sebagai berikut.

DAPG. Primer oligonukleotida Phl2a: 5'-GAG GAC GTC GAA GAC CAC CA-3' dan Phl2b: 5'-ACC GCA GCA TCG TGT ATG AG-3' digunakan untuk mendeteksi adanya gen DAPG (*phlD*). Produk PCR gen target menggunakan primer ini adalah 745 bp. Siklus PCR yang dilakukan sesuai dengan Raaijmakers *et al.* (1997) terdiri dari denaturasi awal 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer 62°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1 menit dan pemanjangan akhir 72°C selama 2 menit.

Fenazin. Primer oligonukleotida PHZX: 5'-TTT TTT CAT ATG CCT GCT TCG CTT TC-3' dan PHZY: 5'-TTT GGA TCC TTA AGT TGG AAT

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



GCC TCC-3' digunakan untuk mendeteksi adanya gen fenazin (*phzXY*). Produk PCR gen target menggunakan primer ini adalah 1.1 kb. Siklus PCR yang dilakukan sesuai dengan Delaney *et al.* (2001) terdiri dari denaturasi awal 94°C selama 1.50 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 45 detik, penempelan primer 58°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1.75 menit dan pemanjangan akhir 72°C selama 1 menit.

Primer oligonukleotida PHZ1 5'-GGC GAC ATG GTC AAC GG-3' dan PHZ2 5'-CGG CTG GCG GCG TAT TC-3' digunakan untuk mendeteksi adanya gen fenazin (*phzAF*). Produk PCR gen target menggunakan primer ini adalah 1.4 kb. Siklus PCR yang dilakukan sesuai dengan Delaney *et al.* (2001) terdiri dari denaturasi awal 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer 56°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1.75 menit dan pemanjangan akhir 75°C selama 1 menit.

Primer oligonukleotida Phen1: 5'-CCC CTG TTG ACA ATT AAT CAT GG-3' dan Phen2: 5'-ACC TTG ACG TTG TAC CAT TCC CAA-3' digunakan untuk mendeteksi adanya gen fenazin *phzAB*. Siklus PCR yang dilakukan sesuai dengan Viebahn *et al.* (2003) terdiri dari denaturasi awal 92°C selama 4 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 92°C selama 1 menit, penempelan primer 56°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1.75 menit dan pemanjangan akhir 75°C selama 1 menit.

Pioluteorin. Primer oligonukleotida *pltBf* (5'-CGG AGC ATG GAC CCC CAG C-3') dan *pltBr* (5'-GTG CCC GAT ATT GGT CTT GAC CGA G-3') 3' digunakan untuk mendeteksi adanya gen *pyoluteorin* (*pltB*). Produk PCR gen target menggunakan primer ini adalah 773 bp. Siklus PCR yang dilakukan sesuai dengan Mavrodi *et al.* (2001) terdiri dari denaturasi awal 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer 90°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1 menit dan pemanjangan akhir 70°C selama 1 menit.

Pirolnitrin. Primer oligonukleotida PRND1 (5'-GGG GCG GGC CGT GT GAT GGA-3') dan PRND2 (5'-YCC CGC SGC CTG YCT GGT CTG-3')

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

digunakan untuk mendeteksi adanya gen pirolnitrin (*prnD*). Produk PCR gen target menggunakan primer ini adalah 786 bp. Siklus PCR yang dilakukan sesuai dengan de Souza dan Raaijmakers (2003) terdiri dari denaturasi awal 95°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 95°C selama 1 menit, penempelan primer 68°C selama 1 menit, pemanjangan 72°C selama 1 menit dan pemanjangan akhir 72°C selama 5 menit.

Primer oligonukleotida PrnCf: 5'-CCA CAA GCC CGG CCA GGA GC-3' dan PrnCr: 5'-GAG AAG AGC GGG TCG ATG AAG CC-3' digunakan untuk mendeteksi adanya gen pirolnitrin (*prnC*). Produk PCR gen target menggunakan primer ini adalah 719 bp. Siklus PCR yang dilakukan sesuai dengan Mavrodi *et al.* (2001) terdiri dari denaturasi awal 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer 58°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1 menit dan pemanjangan akhir 72°C selama 1 menit. Produk amplifikasi dari setiap proses PCR dari masing-masing gen target dielektroforesis dengan *gel agarose* 1%, dalam bufer *Tris base Acetic acid EDTA* (TBE) 1x selama 30 menit 100 V. Selanjutnya, *gel* diwarnai dengan ethidium bromida selama 10 menit dan difoto dibawah sinar ultra violet.

Kloning DNA dengan vektor pCR[®]4Blunt-TOPO[®]. Fragmen gen target yang diinginkan selanjutnya diklon. Kloning dilakukan dengan menggunakan Zero Blunt TOPO PCR Cloning for Sequencing (Invitrogen, Jepang) sesuai dengan protokol yang disediakan oleh perusahaannya. *Reagen* dan jumlah reaksi ligasi fragmen gen penyandi senyawa anticendawan dengan vektor kloning pCR[®]4Blunt-TOPO yang digunakan tertera pada Tabel 5.

Tabel 5. Reaksi ligasi menggunakan Zero Blunt TOPO PCR Cloning.

Reagen	Jumlah (µl)
Produk PCR ujung tumpul	1 (~50 ng/µl)
Air luntan garam	1
Air steril	sampai dengan 3
Vektor TOPO	1
Volume akhir	6

Reagen dicampur dengan perlahan dan kemudian diinkubasi selama 3 jam atau semalam pada suhu kamar (23-24°C).

Produk PCR dari gen target yang diinginkan diamplifikasi kembali dengan menggunakan polimerase PrimeStarMax (Takara, Jepang) untuk menghasilkan produk PCR berujung tumpul. PCR yang dilakukan diawal menggunakan Takara LA Taq polimerase, menghasilkan ujung A (*Adenosine*) menggantung di ujung 3' yang tidak sesuai dengan vektor kloning TOPO yang memakai cara *blunt-end cloning*. Reaksi PCR terdiri dari komponen seperti disebutkan dalam Tabel 6.

Tabel 6 Reaksi PCR menggunakan polimerase Prime StarMax.

Campuran reaksi	Jumlah yang digunakan	Volume (µl)
PrimeStarMax Premix (2x)	25 µl	25
Primer 1	10-15 pmol	1
Primer 2	10-15 pmol	1
DNA cetakan	< 200 ng	2
Milli Q	up to 50µl	21

Kondisi PCR untuk PrimeStarMax adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 10 detik, denaturasi 98°C selama 10 detik, penempelan primer 55°C selama 5 detik, pemanjangan 72°C selama 10 detik dan pemanjangan akhir 72°C selama 7 menit. Produk PCR dielektroforesis dan diwarnai dengan Mupid Blue (Qiagen, Jepang). Gel yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan dipotong. DNA kemudian dipurifikasi dari gel menggunakan *gel extraction kit* (Qiagen, Jepang). DNA dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Amerika Serikat).

Transformasi. Satu µl reaksi kloning ditambahkan ke dalam suspensi sel elektrokomenpeten *E. coli* TOP 10. Campuran ini kemudian dipindahkan dengan hati-hati ke dalam kuvet dengan celah 2 mm dan dielektroforasi menggunakan protokol yang telah diatur untuk *E. coli* (2 mm; 2.5Kv), yaitu: voltase 2500v, capacitance 25µF, resistance 200Ω (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad, Amerika Serikat). Segera, 1 ml medium SOB (24-25°C) ditambahkan. Medium SOB yang mengandung sel *E. coli* yang telah ditransformasi tersebut digoyang di atas *shaker*



dengan kecepatan 125 rpm selama 1 jam pada suhu 37°C, untuk membantu terekspresinya gen resisten antibiotik. Untuk setiap transformasi yang dilakukan, 300µl reaksi transformasi disebar di atas medium selektif agar-agar Luria Berthani (LB) yang mengandung ampisilin 50µg/ml pada 3 cawan, masing-masing 100 µl dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Hanya rekombinan positif setelah ditransformasi ke *E. coli* tumbuh pada medium selektif agar-agar LB. Vektor kloning Zero Blunt TOPO menggunakan gen letal *ccdB*, gen yang mengontrol kematian sel, sebagai cara seleksinya. Jika DNA sisipan terligasi, ekspresi gen *ccdB* terganggu sehingga rekombinan tumbuh dan membentuk koloni yang terlihat. Jika tidak ada DNA sisipan, vektor kloning akan terligasi sendiri (*self ligation*), gen letal *ccdB* terekspresi sehingga sel tidak tumbuh. Oleh karenanya, koloni-koloni rekombinan saja yang tumbuh tanpa ada koloni-koloni lain di sekitarnya yang bukan rekombinan (“*zero background*”). Selanjutnya, PCR koloni digunakan untuk menganalisa secara langsung transforman positif yang membawa sisipan fragmen DNA.

Sekuensing DNA. DNA plasmid dipurifikasi dari sel transforman menggunakan QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Jepang) dan selanjutnya disekuensing. Plasmid DNA disekuensing menggunakan Applied Biosystems BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits v1.1 and v3.1 (Applied Biosystems, Amerika Serikat). Reaksi siklus sekuensing dilakukan dengan primer TOPO seq F hulu (5'-TTAGCTCACTCATTAGGCACCCC-3') dan TOPO seq hilir (5'-CGATTAAGTTGGGTAACGCCA-3'), menurut kondisi siklus yang direkomendasikan oleh perusahaannya. Produk reaksi sekuensing dipurifikasi dengan presipitasi etanol dan dikeringkan dalam sentrifugasi vakum. Selanjutnya, dideskuensi untuk membuat untai tunggal dengan cara diresuspensi dalam 10 µl formamid dan dipanaskan 96°C selama 2 menit. Sekuen DNA plasmid ditentukan dengan elektroforesis kapiler pada mesin sekuensing ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Amerika Serikat) yang menterjemahkan sinyal fluoresen menjadi sekuens DNA yang sesuai. Untuk mensekuens panjang DNA seluruhnya, 2 sekuens primer internal dibuat berdasarkan sekuens yang didapatkan sebelumnya, sekitar 500-600 basa. Pemilihan sekuens yang dipakai sebagai primer ditentukan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

berdasarkan rekomendasi dalam protokol BigDye Terminator v1.1 and v1.3 cycle sequencing kit. Data sekuen dikompilasi dan dianalisis dengan program BioEdit versi 7.0.9.0 (Hall 1999). Pencarian kemiripan sekuen nukleotida dan protein di pusat data *GenBank* dilakukan dengan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang terdapat di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Cloning DNA dengan vektor pGEM-T Easy

Produk PCR. Target gen diamplifikasi menggunakan DNA polimerase Taq dengan bufer GC sesuai dengan petunjuk perusahaannya. Polimerase Taq karena LA Taq menghasilkan ujung A (*Adenosine*) menggantung di ujung 3' sesuai untuk vektor kloning TA menggunakan pGEM-T Easy (Promega, Amerika Serikat). Amplifikasi dilakukan dalam 50 µl campuran reaksi yang mengandung GC bufer II, 400 µM campuran dNTP, 2.5 unit polimerase Takara LA Taq, 10 µM masing-masing primer (Phz1 dan Phz2), 20 ng DNA genom cetakan dan H₂O sampai dengan 50 µl. Program siklus PCR terdiri dari denaturasi awal 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer 56°C selama 45 detik, pemanjangan 72°C selama 1.75 menit dan pemanjangan akhir 72°C selama 10 menit.

Produk amplifikasi kemudian dielektroforesis dalam 1% gel agarose dengan bufer TBE 1x selama 30 menit, pada voltase 100 V. Selanjutnya, gel diwarnai dengan Mupid Blue. Gel yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan dipotong. DNA kemudian dipurifikasi dari gel menggunakan *gel extraction kit*. Untuk menentukan konsentrasinya, DNA dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer NanoDrop ND-1000.

DNA kloning. Fragmen gen target yang diinginkan selanjutnya dikloning. Kloning fragmen hasil PCR ke dalam vektor pGEM-T Easy dilakukan sesuai dengan protokol yang disediakan oleh perusahaannya (Promega, Amerika Serikat).

Ligasi. Reaksi ligasi dibuat seperti dijelaskan dalam Tabel 7 berikut ini:

Tabel 7 Reaksi ligasi dengan vektor pGEM-T Easy.

Reaksi ligasi	<i>Pseudomonas</i> CRB-80	<i>Pseudomonas</i> CRB-102
Bufer ligasi rapid 2x	5 µl	5 µl
Vektor pGEM-T Easy (50ng)	1 µl	1 µl
Produk PCR *	2 µl (58.6 ng/µl)	1 µl (122, 3 ng/µl)
DNA ligase T4	1 µl	1 µl
ddH ₂ O	1 µl	2 µl
Volume total	10 µl	10 µl

*Perbandingan molar produk PCR : vektor = 3:1, dihitung sebagai berikut:

$$\frac{\text{ng vektor} \times \text{kb ukuran insert}}{\text{kb ukuran vektor}} \times \frac{3}{1} = \frac{50 \times 1.6}{3.0} \times \frac{3}{1} = 80 \text{ ng}$$

Reaksi ligasi dicampur dengan cara diresuspensi dan selanjutnya diinkubasi semalaman pada suhu kamar.

Transformasi. Dua µl reaksi ligasi ditambahkan ke dalam suspensi sel elektrokompeten *E. coli* EPI 300. Campuran ini selanjutnya dipindahkan dengan hati-hati ke dalam kuvet dengan celah 2 mm dan dielektroporasi menggunakan protokol yang telah diatur untuk *E. coli* (2 mm; 2.5Kv), yaitu: voltase 2500v, *capacitance* 25µF, *resistance* 200Ω. Segera, 1 ml medium SOB (24-25°C) ditambahkan. Medium SOB yang mengandung sel *E. coli* yang telah ditransformasi tersebut digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 1 jam pada suhu 37°C, untuk membantu terekspresinya gen resisten antibiotik. Untuk setiap transformasi yang dilakukan, 300µl reaksi transformasi disebar di atas medium selektif agar LB yang mengandung ampisilin 50µg/ml, *Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside* (IPTG) 0.5 mM/ml, dan X-Gal 80µg/ml pada 3 cawan, masing-masing 100 µl dan diinkubasi semalaman pada suhu 37°C. Koloni putih beningnya mengandung sisipan.

PCR koloni. PCR koloni digunakan untuk menyeleksi dengan cepat plasmid yang mengandung sisipan, langsung dari koloni-koloni *E. coli* EPI 300.

Koloni-koloni bakteri yang dipilih di antaranya 7 koloni putih, 3 koloni biru muda dan 2 koloni biru masing-masing diambil dengan ujung tusuk gigi steril dari cawan dipindahkan ke cawan replika. Selanjutnya, ujung tusuk gigi tersebut dimasukkan ke dalam masing-masing 20µl air milliQ yang telah disteril. Bakteri yang ada di milliQ ini merupakan sumber DNA plasmid cetakan untuk PCR. Koloni positif yang mengandung sisipan yang benar selanjutnya dilakukan isolasi plasmid dan disekuencing.

Sekuensing DNA. DNA plasmid diisolasi dan dimurnikan dari sel transforman yang telah dikonfirmasi mengandung sisipan dengan QIAprep Spin Miniprep Kit dan selanjutnya disekuencing. Plasmid DNA disekuencing dengan menggunakan Applied Biosystems BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits (v1.1 and v3.1) dan primer M13 *Forward* dan M13 *Reverse*. Campuran reaksi untuk siklus sekuensing tertera pada Tabel 8. Reaksi siklus sekuensing dilakukan menurut kondisi siklus yang direkomendasikan oleh perusahaannya yaitu pra-denaturasi 96°C selama 1 menit, denaturasi 96°C selama 10 detik, penempelan primer 50°C selama 5 detik, pemanjangan 60°C selama 4 menit.

Tabel 8 Campuran reaksi untuk siklus sekuensing menggunakan ABI BigDye Terminator.

Campuran reaksi	Konsentrasi	volume (µl)
Primer M13 <i>Forward</i> / <i>Reverse</i>	1.6 pmol	1
Ready reaction premix (2.5x)	0.5x	2
Cetakan (rekombinan plasmid murni)	~200 ng/µl	3
Bufer sekuensing Big Dye (5x)	1x	2
Air		2
Volume total		10

Produk reaksi sekuensing dipurifikasi dengan presipitasi etanol dan dikeringkan dalam sentrifugasi vakum. Selanjutnya, DNA didenaturasi menjadi untai tunggal dengan cara diresuspensi dalam 10 µl formamid dan dipanaskan pada 95°C selama 2 menit. Sekuen DNA plasmid ditentukan dengan elektroforesis kapiler pada mesin sekuensing ABI 3130 DNA Analyzer yang menterjemahkan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

Bogor Agricultural University



sinyal fluoresen menjadi sekuen DNA yang sesuai. Data sekuen dikompilasi dan dianalisis dengan program BioEdit versi 7.0.9.0 (Hall 1999). Pencarian kemiripan sekuen nukleotida dan protein di pusat data *GenBank* dilakukan dengan program BLAST yang terdapat di NCBI.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hasil

Amplifikasi gen penyandi biosintesis anticendawan

Enam pasang primer yang digunakan berhasil mengamplifikasi gen target penyandi biosintesis senyawa anticendawan pada bakteri kontrol positif. Empat pasang primer menghasilkan pita tidak spesifik pada *Pseudomonas* sp. CRB (tabel 9).

Tabel 9 Produk amplifikasi gen penyandi biosintesis anticendawan dan primer yang digunakan pada *Pseudomonas* sp. CRB dan bakteri kontrol positif *Pseudomonas chlororaphis* DF190, DF202, *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, *Pseudomonas fluorescens* Q2-87, Q8-R1, Pf-5.

Anticendawan	Primer	<i>Pseudomonas</i> sp. CRB	Kontrol Positif
APG	Ph12a/Ph12b	teramplifikasi (1 kb) pada <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-80	Teramplifikasi (745 bp) Q2-87, Q8-R1, Pf-5
Fenazin	PHZX/PHZY	Tidak teramplifikasi	Teramplifikasi (1,1 kb) <i>P. aureofaciens</i> 30-84
	PHZ1/PHZ2	Pita tidak spesifik pada <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-16,17, 44, 80, 82, 102	Teramplifikasi (1,4 kb) DF190 dan DF202 <i>P. aureofaciens</i> 30-84
	Phen1/Phen2	Tidak teramplifikasi	Tidak teramplifikasi
Poluteorin	pltBf/pltBr	Pita tidak spesifik pada <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-16, 17, 44, 80, 82, 102	Teramplifikasi (800 bp) DF190 dan DF202 Pf-5
Nitrotrin	PRND1/PRND2	Tidak teramplifikasi	Teramplifikasi (800 bp) DF190 dan DF202
	PrnCf/PrnCr	Pita tidak spesifik pada <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-16, 17, 80, 102	Teramplifikasi (800 bp) Pf 5

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

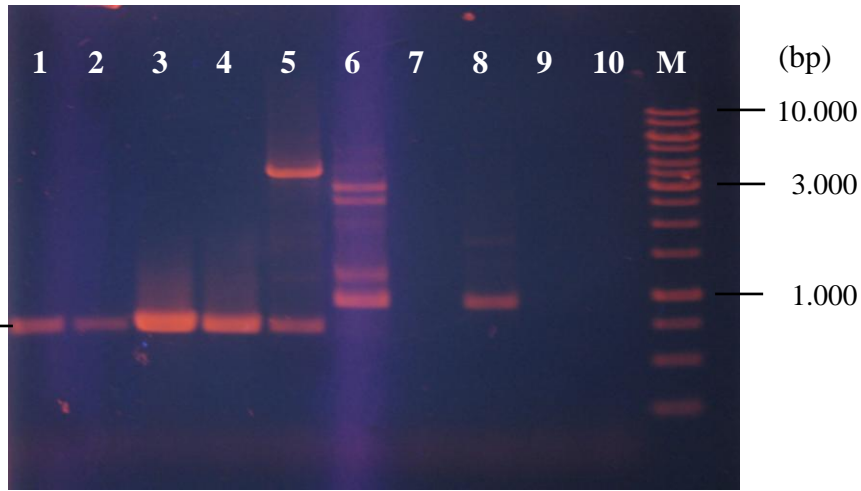
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Elektroforesis amplifikasi gen anticendawan dengan 6 pasang primer yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 7-12.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)



Gambar 7 Amplifikasi gen DAPG dengan primer *phl2a* dan *phl2b*, kontrol positif Pf5, Q2-87 dan Q8-R1 teramplifikasi (750 bp), *Pseudomonas* sp. CRB-80 teramplifikasi (900 bp). M = marker 1 kb ladder (Fermentas).

Lajur 1, 2: Pf5

Lajur 7: CRB 17

M: Marker 1kb

Lajur 3, 4: Q2-87

Lajur 8: CRB 80

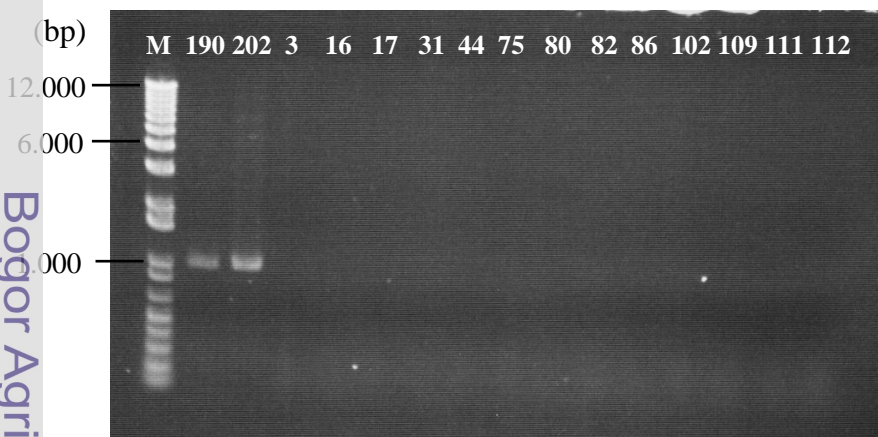
Lajur 5: Q8-R1

Lajur 9: CRB 82

Lajur 6: 30-84

Lajur 10: CRB 102

Bogor Agricultural University

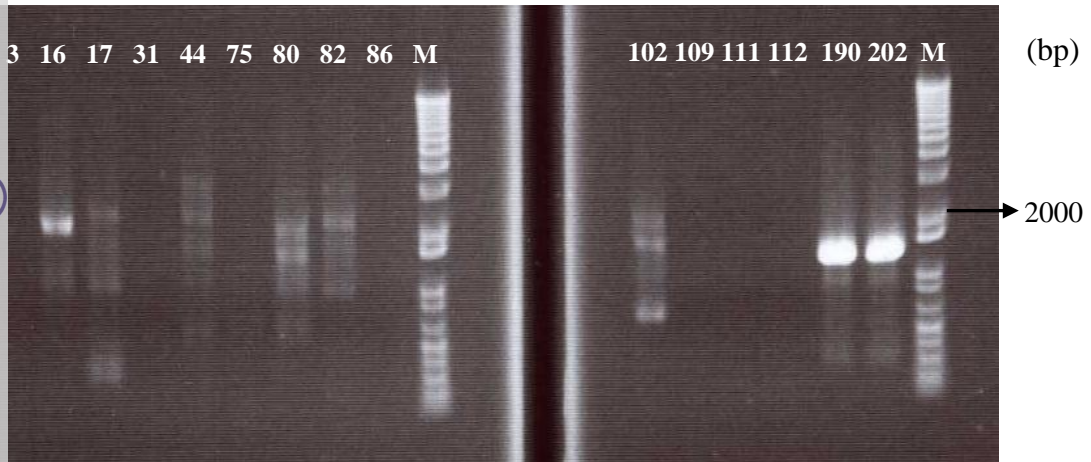


Gambar 8 Amplifikasi gen fenazin dengan primer PHZX/PHZY, kontrol positif DF190 dan DF202 teramplifikasi (1.1 kb); tetapi tidak teramplifikasi pada *Pseudomonas* sp. CRB. M = marker 1 kb ladder (Invitrogen).

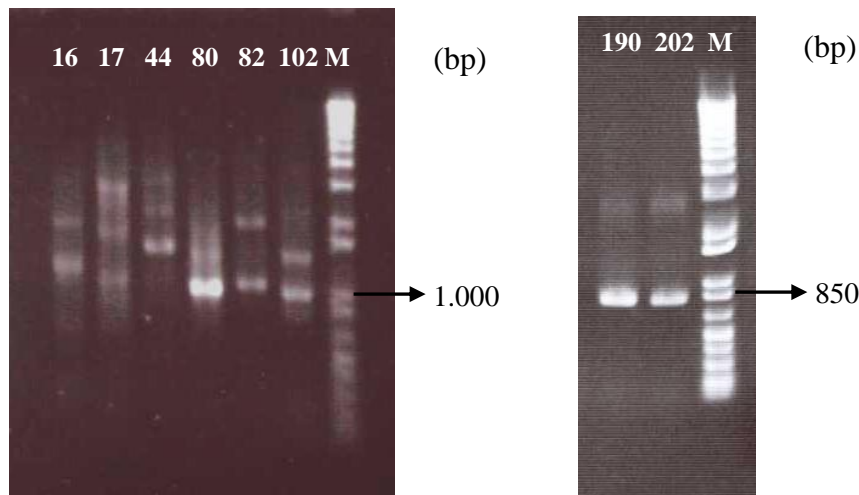
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

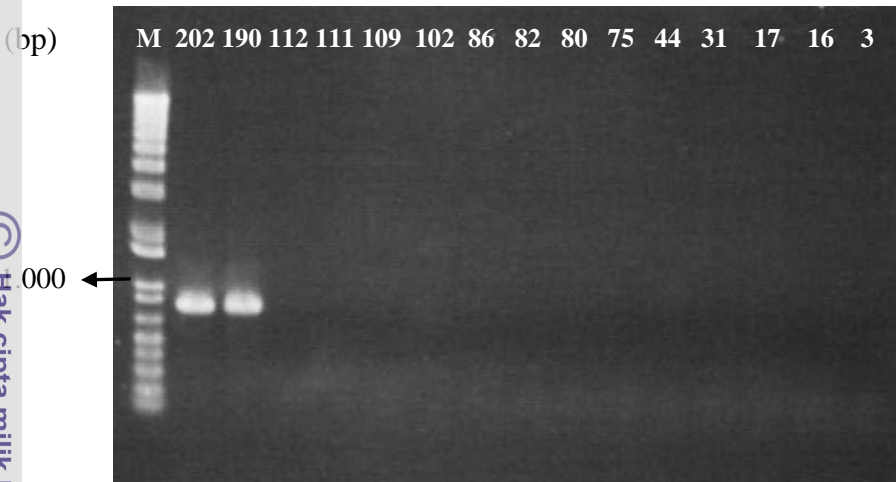


Gambar 9 Amplifikasi gen fenazin dengan primer PHZ1/PHZ2, kontrol positif DF190 dan DF202 teramplifikasi (1.4 kb), pada *Pseudomonas* sp. CRB (16, 17, 44, 80, 82 dan 102) teramplifikasi menghasilkan pita-pita yang tidak spesifik. M = marker 1 kb ladder (Invitrogen).

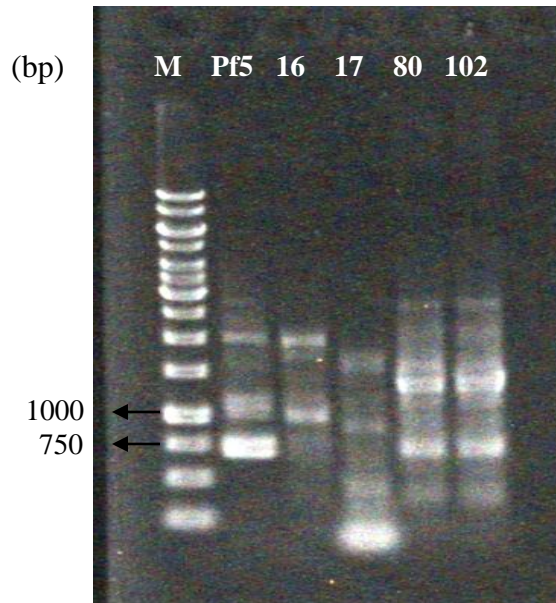


Gambar 10 Amplifikasi gen pioluteorin dengan primer pltBf/pltBr, kontrol positif DF190 dan DF202 teramplifikasi (773 bp), pada *Pseudomonas* sp. CRB (16, 17, 44, 80, 82 dan 102) teramplifikasi menghasilkan pita-pita yang tidak spesifik. M = marker 1 kb ladder (Invitrogen).

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



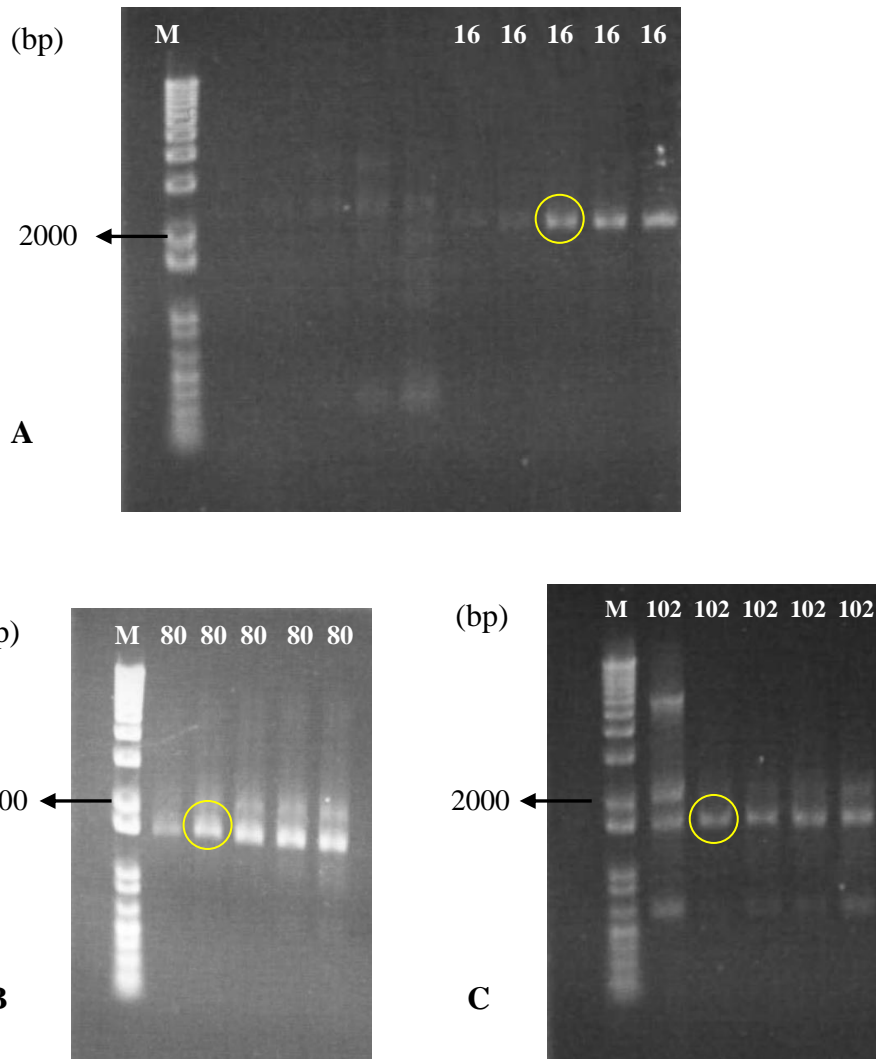
Gambar 11 Amplifikasi gen pirolnitritin dengan primer PRND1/PRND2, kontrol positif DF190 dan DF202 teramplifikasi (800 bp); tetapi tidak teramplifikasi pada *Pseudomonas* sp. CRB. M = marker 1 kb ladder (Invitrogen).



Gambar 12 Amplifikasi gen pirolnitritin dengan primer prnCf/prnCr, *Pseudomonas* sp. CRB (16, 17, 80 dan 102) menghasilkan pita-pita tidak spesifik. Gen target dari Pf5 teramplifikasi menghasilkan 719 bp. M = Marker 1 kb ladder (Fermentas).

Optimasi PCR gen fenazin

Optimasi suhu penempelan primer dilakukan untuk meningkatkan spesifikasinya sehingga menghasilkan satu pita yang spesifik. Optimasi suhu penempelan pada primer PHZ1/PHZ2 menghasilkan pita tunggal (~2000 bp) pada 56°C untuk *Pseudomonas* sp. CRB 16, (~1600 bp) pada 58°C untuk *Pseudomonas* sp. CRB 80 dan pada 57°C untuk *Pseudomonas* sp. CRB 102 (Gambar 13).



Gambar 13 Optimasi suhu penempelan primer PHZ1/PHZ2 pada 54, 55, 56, 57, 58°C untuk *Pseudomonas* sp. CRB 16 (A), 80 (B), dan 102 (C). *Pseudomonas* sp. CRB 16 menunjukkan pita tunggal (~2000 bp) pada 56°C, 80 (~1600 bp) pada 58°C dan 102 pada 57°C. M = marker 1 kb ladder (Invitrogen).

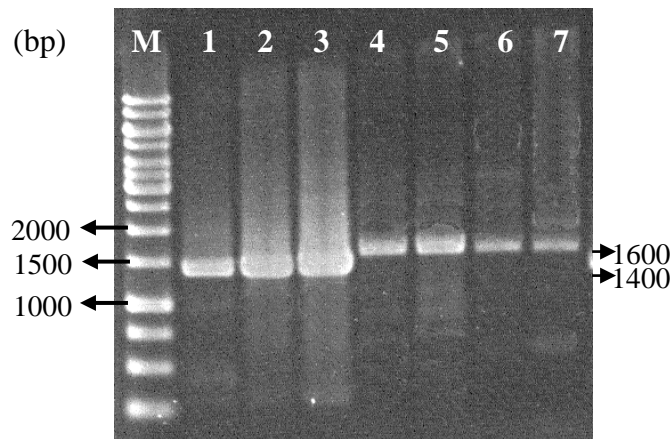
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Selanjutnya, optimasi kondisi PCR dengan primer PHZ1/PHZ2 menghasilkan pita spesifik 1.6 kb pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102, lebih besar dibandingkan dengan ukuran yang seharusnya 1.4 kb pada bakteri kontrol positif *P. chlororaphis* DF190 dan DF202 (Gambar 14).

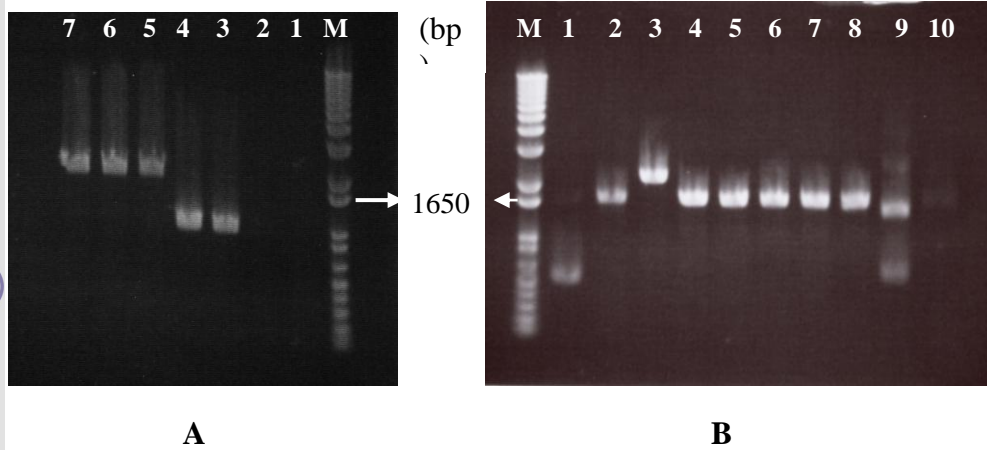


Gambar 14 Amplifikasi gen fenazin dengan primer PHZ1/PHZ2, lajur 1 bakteri kontrol positif *P. aureofaciens* 30-84, lajur 2 *P. chlororaphis* DF190, lajur 3 DF202 masing-masing teramplifikasi (1.4 kb), lajur 4, 5 *Pseudomonas* sp. CRB-80, lajur 6, 7 CRB-102 teramplifikasi (1.6 kb). M = marker 1 kb ladder (Fermentas).

Kloning fragmen gen fenazin

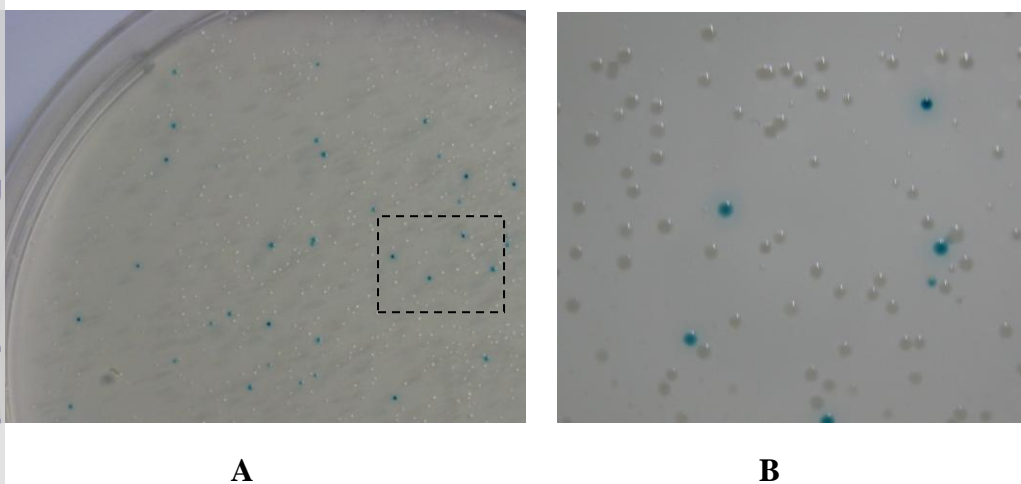
Tujuh klon tumbuh pada medium selektif LB setelah dilakukan kloning dengan *Zero Blunt TOPO PCR Cloning for Sequencing* untuk *Pseudomonas* sp. CRB-16. Analisis transforman dengan koloni PCR langsung menunjukkan tiga klon adalah transforman positif yang mengandung sisipan 2 kb, dua klon mengandung sisipan 1 kb dan dua klon tidak mengandung sisipan (Gambar 15A). Selanjutnya, klon 3, 4, 5 dan 6 adalah klon yang disekuens. Pada *Pseudomonas* sp. CRB-16, tiga klon adalah transforman positif yang mengandung sisipan 1.6 kb, 1 klon mengandung sisipan 600 bp dan satu klon mengandung sisipan 2 kb (Gambar 15B, lajur 1-5). Sisipan yang benar adalah 1.6 kb. Pada *Pseudomonas* sp. CRB-102, empat klon mengandung sisipan 1.6 kb dan satu klon mengandung sisipan 1.5 kb (Gambar 15B, lajur 6-10). Selanjutnya, klon 4, 5, 6 dan 7 adalah klon yang disekuens.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



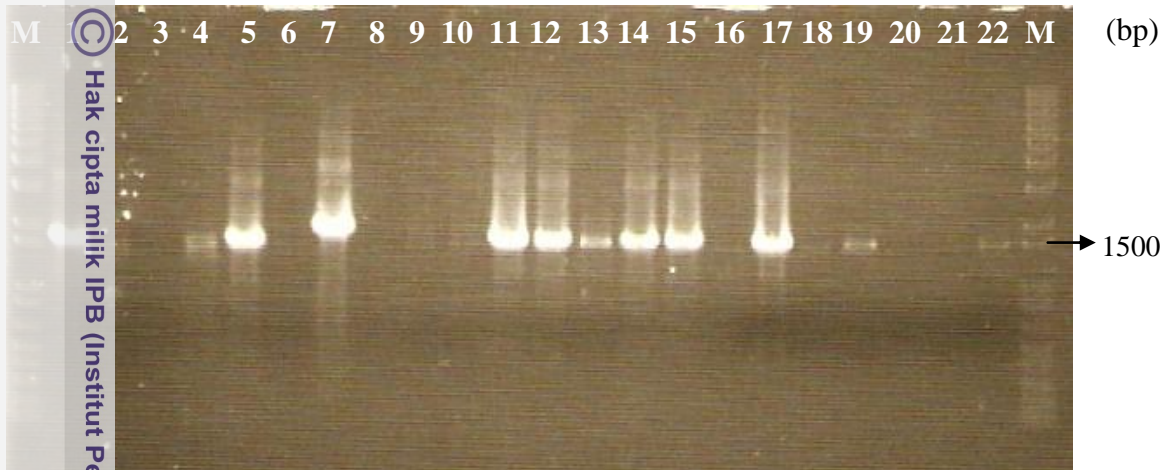
Gambar 15 PCR koloni langsung amplifikasi DNA sisipan PHZ1/PHZ2 (~1 kb) dan (~2 kb) pada *Pseudomonas* sp. CRB-16 (A). Amplifikasi DNA sisipan PHZ1/PHZ2 (1.6 kb) pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 (B, lajur 1-5), pada *Pseudomonas* sp. CRB-102 (B, lajur 6-10) M = marker 1kb ladder (Invitrogen).

Kloning fragmen PHZ1/PHZ2 dengan pGEMT-Easy dalam EPI 300 berhasil dilakukan. Banyak koloni putih dan lebih sedikit koloni biru tumbuh di atas medium selektif LA ampicilin/IPTG/X-Gal (Gambar 16). Pada medium seleksi ini, koloni putih adalah transforman yang diduga mengandung sisipan, koloni biru adalah transforman yang tidak mengandung sisipan.



Gambar 16 Koloni putih biru sel transforman EPI 300 di medium selektif LA ampicilin/IPTG/X-Gal (A). Gambar yang diperbesar (B).

Selanjutnya, PCR koloni langsung mengkonfirmasi adanya sisipan DNA PHZ1/PHZ2 pada beberapa koloni putih yang diambil dari *Pseudomonas* sp. CRB-80 (Gambar 17, lajur 1 dan 5) dan CRB-102 (Gambar 17, lajur 11-15 dan 17). Enam klon yang mengandung sisipan yang sesuai (1.6 kb) selanjutnya disekuon (Gambar 17; lajur 1, 5, 11, 12, 15, 17)



Gambar 17 Koloni PCR: amplifikasi DNA sisipan PHZ1/PHZ2 (~1.6 kb) pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 (lajur 1-10) dan CRB-102 (lajur 11-22). M = Marker 1 kb ladder (Invitrogen).

- Lajur 1 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 1 (koloni putih)
- Lajur 2 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 2 (koloni putih)
- Lajur 3 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 3 (koloni putih)
- Lajur 4 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 6 (koloni putih)
- Lajur 5 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 7 (koloni putih)
- Lajur 6 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 8 (koloni putih/biru)
- Lajur 7 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 9 (koloni putih/biru)
- Lajur 8 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 10 (koloni putih/biru)
- Lajur 9 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 11 (koloni biru)
- Lajur 10 = *Pseudomonas* sp. 80, klon 12 (koloni biru)
- Lajur 11 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 1 (koloni putih)
- Lajur 12 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 2 (koloni putih)
- Lajur 13 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 3 (koloni putih)
- Lajur 14 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 4 (koloni putih)
- Lajur 15 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 5 (koloni putih)
- Lajur 16 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 6 (koloni putih)
- Lajur 17 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 7 (koloni putih)
- Lajur 18 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 8 (koloni putih/biru)
- Lajur 19 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 9 (koloni putih/biru)
- Lajur 20 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 10 (koloni putih/biru)
- Lajur 21 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 11 (koloni biru)
- Lajur 22 = *Pseudomonas* sp. 102, klon 12 (koloni biru)

Lajur 1, 5, 11, 12, 15, 17 klon-klon yang disekuon

Sekuen fragmen gen fenazin

Elektroforegram sekuen dengan puncak-puncak yang jelas dapat diperoleh dari reaksi sekuen dan primer yang digunakan. Sekuen fragmen gen PHZ1/PHZ2 yang berukuran 1 kb dapat diperoleh secara lengkap dengan menggunakan primer TOPO Seq hulu dan hilir. Sekuen gen PHZ1/PHZ2 yang berukuran 2 kb dapat diperoleh dengan membuat satu pasang primer internal dari sekuen yang sudah dapat dari primer TOPO seq hulu dan hilir. Sementara, sekuen fragmen gen PHZ1/PHZ2 yang berukuran 1.6 kb belum disekuen secara lengkap, hanya mendapatkan 400 basa dari primer hulu dan 400 basa dari primer hilir.

Kemiripan sekuen nukleotida fragmen gen PHZ1/PHZ2 dengan pusat data *GenBank* terlihat pada Tabel 10. Sekuen fragmen DNA dengan primer PHZ1/PHZ2 yang berukuran 1 kb dan 2 kb tidak terkonfirmasi sebagai bagian dari gen yang menyandi biosintesis senyawa anticendawan fenazin. Akan tetapi, sekuen yang belum lengkap sekitar 400 basa dari primer *reverse*, bagian dari fragmen gen PHZ1/PHZ2 yang berukuran 1.6 kb terkonfirmasi sebagai *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* dengan kemiripan 86%. Protein dari sekuen nukleotida yang ditraslasi juga menunjukkan kemiripan dengan protein *Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* yaitu 89% (Tabel 11). *Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* adalah gen *phzF*.

Tabel 10 Kemiripan nukleotida fragmen gen PHZ1/PHZ2 dengan pusat data di *GenBank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide* (BLASTN).

Nama klon	Sekuen nukleotida paling mirip	Identitas	Nomer akses
PHZ1/PHZ2 (1 kb) <i>Pseudomonas</i> sp. RB-16	<i>Acetolactate synthase, small subunit, acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type</i> [<i>Pseudomonas putida</i> KT2440]	97%	AE015451.1
PHZ1/PHZ2 (2 kb) <i>Pseudomonas</i> sp. RB-16	<i>Probable binding protein, component of ABC transporter,</i> [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7]	83%	CP000744.1

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Hypothetical protein 84% CP000744.1
[*Pseudomonas aeruginosa* PA7]

PHZ1/PHZ2 (1.6 kb) *Major facilitator superfamily MFS1* 92% CP000926.1
Pseudomonas sp. [Pseudomonas putida GB-1]
CRB-80, CRB-102 400 basa (forward)

Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase * 86% CP000926.1
[Pseudomonas putida GB1]
400 basa (reverse)

* phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase = *phzF*

Tabel 1 Kemiripan protein fragmen gen PHZ1/PHZ2 dengan pusat data di GenBank menggunakan Basic Local Alignment Search Tool for Protein, using translated nucleotide (BLASTX).

Nama klon	Sekuen protein paling mirip	Identitas	Nomer akses
PHZ1/PHZ2 (1 kb) <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-16	<i>Acetolactate synthase 3 catalytic subunit</i> [Pseudomonas putida KT2440]	98%	NP_746789.1
PHZ1/PHZ2 (2 kb) <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-16	<i>Dipeptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein</i> [Pseudomonas entomophila L48]	85%	YP_606774.1
	<i>Hypothetical protein PSPA7_5109</i> [Pseudomonas aeruginosa PA7]	80%	YP_001350445.1
PHZ1/PHZ2 (1.6 kb) <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-80, CRB-102	<i>Major facilitator transporter</i> [Pseudomonas putida GB-1] 400 basa (forward)	92%	YP_001669013.1
	<i>Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase</i> * [Pseudomonas putida GB1] 400 basa (reverse)	87%	YP_001669016.1

* phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase = PhzF

Kloning dilakukan sekali lagi dengan pGEMT-Easy untuk mendapatkan sekuen lengkap fragmen gen PHZ1/PHZ2 yang berukuran 1.6 kb. Elektroforegram sekuen dengan puncak-puncak yang jelas dapat diperoleh dari reaksi sekuen dan primer M13 yang digunakan.

Sekuen fragmen gen PHZ1/PHZ2 yang berukuran 1.6 kb menunjukkan 829 basa mirip dengan *membrane protein, putative* dan 785 basa mirip dengan *Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, class I* dari *Pseudomonas putida* KT2440 (Tabel 12). Hasil pensejajaran BlastN sekuen 1.6 kb dengan sekuen yang paling mirip dapat dilihat di Lampiran. Protein dari nukleotida yang ditranslasi menunjukkan kemiripan 392 asam amino dengan *major fasilitator transporter* dan 12 asam amino dengan *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, class I* dari *Pseudomonas putida* GB-1 (Tabel 13). *Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* adalah gen *phzF*. *PhzF* adalah bagian dari 7 gen yang menyandi biosintesis fenazin pada *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. Hasil ini menunjukkan bahwa bagian gen penyandi biosintesis fenazin, *phzF* dapat terdeteksi dan dikonfirmasi pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102.

Tabel 12 Kemiripan nukleotida sekuen lengkap 1.6 kb fragmen gen PHZ1/PHZ2 dengan pusat data di GenBank menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide* (BLASTN).

Nama klon	Sekuen nukleotida paling mirip	Identitas	Nomer akses
Semua klon dari <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-80 dan CRB-102	<i>Membrane protein, putative</i> [<i>Pseudomonas putida</i> KT2440] Basa ke-4 sampai ke-833 = 829	84%	AE015451.1
	<i>Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, class I</i> * [<i>Pseudomonas putida</i> KT2440] Basa ke-849 sampai ke-1634 = 785	93%	AE015451.1

*phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase = *phzF*



Tabel 13 Kemiripan protein sekuen lengkap 1.6 kb fragmen gen PHZ1/PHZ2 dengan pusat data di *GenBank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool for Protein, using translated nucleotide* (BLASTX).

Nama klon	Sekuen protein paling mirip	Identitas	Nomer akses
Semua klon dari <i>Pseudomonas</i> sp. CRB-80 dan CRB-102	<i>Major facilitator transporter</i> [<i>Pseudomonas putida</i> GB-1] Asam amino ke 6-398 = 392	95%	YP_00166901 3.1
	<i>Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, class I</i> * [<i>Pseudomonas putida</i> GB-1] Asam amino ke 1393-1635= 242	89%	YP_00166901 6.1

* phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase = PhzF

Pembahasan

Deteksi gen menggunakan primer yang telah dikenal diharapkan dapat mempercepat deteksi apakah isolat *Pseudomonas* sp. CRB mempunyai gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan pirolnitritin, pioluteorin, fenazin, diasetilfluoroglusinol atau tidak. Hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan primer yang telah dipilih menghasilkan pita tidak spesifik dan ukuran fragmen DNA yang tidak sama dengan gen target yang diamplifikasi dengan primer spesifik. Untuk mendapatkan pita DNA dengan ukuran spesifik dilakukan optimasi PCR dengan peningkatan suhu *annealing*. Amplifikasi yang tidak terjadi atau hasil amplifikasi yang tidak menunjukkan ukuran yang sesuai dengan ukuran ampikon gen dengan primer yang digunakan, akan tetapi isolat kontrol positif teramplifikasi dengan ukuran yang benar mengindikasikan bahwa gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan tidak terdeteksi pada isolat tersebut.

Primer oligonukleotida PHZ1/PHZ2 mengamplifikasi 1.4 kb fragmen gen *phzF* dan *phzA* pada *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, homolog dengan *phzC* dan *phzD* pada *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (Delaney *et al.* 2001). Primer ini akan mengamplifikasi 810 basa dari *phzF* dan 584 basa dari *phzA* sehingga semuanya akan teramplifikasi sekitar 1.4 kb. Meskipun ukuran fragmen yang teramplifikasi dengan PHZ1/PHZ2 pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



sedikit lebih besar dari yang seharusnya 1.4 kb, yaitu menjadi sekitar 1.6 kb, 785 sekuen nukleotidanya mempunyai kemiripan 93% dengan *phzF*. Demikian juga dengan protein dari nukleotida yang ditranslasi menunjukkan kemiripan 89% dengan PhzF. Hasil ini menunjukkan bahwa bagian dari gen biosintesis fenazin, *phzF* terdeteksi pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102 dengan primer yang digunakan. Gen *phzF* telah berhasil diidentifikasi pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102.

3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase dan sinonimnya *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* (UniProtKB/Swiss-Prot; P80574) adalah protein *phzF*. Protein *phzF* pada *P. aureofaciens* 30-84 memiliki kemiripan dengan *3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthases* pada tanaman famili solanaceae (Pierson *et al.* 1995). AroF, AroG, AroH merupakan isoenzim dari *3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase*. Protein ini berperan dalam jalur biosintesis korismat dan sikimat. Biosintesis fenazin merupakan cabang dari jalur asam sikimat pada titik menuju ke asam korismat. Dua molekul *intermediate* dari derivat korismat kemudian dibawa bersama dengan cara katalisis kovalen dengan enzim yang memiliki simetri katalitik yang katalisis kovalen simetris untuk membentuk struktur fenazin dasar. Modifikasi selanjutnya menjadi untuk mengarah ke berbagai macam fenazin dengan aktivitas biologi yang beragam.

Banyak senyawa fenazin ditemukan di alam dan dihasilkan oleh bakteri seperti *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. dan *Pantoea agglomerans*. Senyawa fenazin terlibat dalam sifat virulensi dan kompetitif bagi bakteri penghasilnya. Fenazin 1-asam karboksilat yang dihasilkan oleh sejumlah *Pseudomonas* telah diketahui berperan penting dalam aktivitas biokontrol terhadap beberapa patogen.

Deteksi gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan dengan primer spesifik yang digunakan tidak menunjukkan hasil pada sembilan *Pseudomonas* sp. CRB yang lain. Biosintesis senyawa anticendawan lain diperkirakan terlibat dalam antibiosis. *Pseudomonas* sp. CRB selain CRB-80 dan CRB-102 diperkirakan menghasilkan senyawa anticendawan selain pioluteorin, pirolnitrin, fenazin maupun diasetilfloroglusinol. Pendekatan penelitian yang lain diperlukan untuk mengetahui senyawa anticendawan yang dihasilkan oleh isolat-isolat tersebut atau gen yang terlibat dalam biosintesis senyawa anticendawan lain.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Simpulan

1. Bagian gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan fenazin, *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase* yaitu *phzF* dapat dideteksi dan terkonfirmasi dengan sekuen fragmen yang telah diklon pada *Pseudomonas* sp. CRB-80 dan CRB-102. Gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan pioluteorin, pirolnitritin dan diasetilfluroglusinol tidak berhasil terdeteksi pada isolat *Pseudomonas* sp. CRB.
2. Gen penyandi biosintesis senyawa anticendawan yang lain selain pioluteorin, pirolnitritin, fenazin dan diasetilfluroglusinol diperkirakan terlibat dalam antibiosis pada *Pseudomonas* sp CRB-3, CRB-16, CRB-17, CRB-31, CRB-44, CRB-75, CRB-86, CRB-109 dan CRB-112.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.