

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI PENGHASIL SIDEROFOR HASIL ISOLASI DARI AKAR NANAS SIMADU SUBANG

CUCU WIJAYANTI



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB 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 University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Siderofor Hasil Isolasi dari Akar Nanas Simadu Subang” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2024

Cucu Wijayanti
P0501211014



@Hak cipta milik IPB 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 University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

CUCU WIJAYANTI. Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Siderofor Hasil Isolasi dari Akar Nanas Simadu Subang. Dibimbing oleh PRAYOGA SURYADARMA dan NISA RACHMANIA MUBARIK.

Siderofor merupakan senyawa organik yang dapat disintesis oleh bakteri gram negatif maupun gram positif. Siderofor bertindak sebagai ligan pengikat besi untuk pelarutan dan pengangkutan besi di dalam sel. Kemampuan pengikatan yang kuat dari siderofor menawarkan manfaat signifikan di berbagai bidang penelitian dan aplikasi. Bakteri penghasil siderofor, isolat M7 yang diisolasi dari akar nanas varietas Simadu di Subang, Jawa Barat, Indonesia, telah diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis *Biosynthesis Gene Clusters* (BGCs) terkait biosintesis siderofor dari sekuen genom total isolat M7 dan menganalisis karakteristik siderofor yang dihasilkan. Sekuen genom total isolat M7 diperoleh melalui teknik *Whole Genome Sequencing* (WGS) menggunakan *Oxford Nanopore Technology* GridION dengan *assembly* dan *annotation* genom meliputi *quality control* menggunakan Quast, *de novo assembly* dengan Flye, *polishing* dengan MEDAKA, serta *annotation* gen menggunakan beberapa *webserver*. Selain itu, analisis kedekatan isolat M7 dengan spesies lain berdasarkan pada *Analysis Nucleotide Identity* (ANI). Identifikasi kemampuan hemolitik isolat M7 dilakukan dengan uji hemolisis isolat M7 menggunakan *blood agar*, serta prediksi sifat patogenitas dan keberadaan gen-gen virulensi menggunakan *webserver* PathogenFinder dan VirulenceFinder. Identifikasi BGCs yang terkait siderofor pada isolat ini dilakukan melalui *genome mining* menggunakan antiSMASH versi bakteri. Selain itu, identifikasi siderofor yang dihasilkan menggunakan *Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS).

Analisis genom mengungkapkan bahwa isolat M7 memiliki nilai *Guanine-Cytocine* (GC) yang serupa dengan strain *Providencia manganoxydans* LLDRA6, dengan panjang urutan yang lebih panjang yaitu 4.447.159 bp. Anotasi genom menggunakan *Rapid Annotation Subsystem Technology* (RAST), mengungkapkan bahwa terdapat 3 dari 12 gen akumulasi siderofor, dan semua gen tersebut adalah untuk akumulasi *aerobactin* yang termasuk dalam sistem akusisi dan metabolisme besi pada isolat M7. Selain itu, perbandingan genom menggunakan perhitungan ANI, menunjukkan bahwa spesies *P. manganoxydans* merupakan spesies terdekat dengan isolat M7 dengan nilai ANI sebesar 98,82%. *P. manganoxydans* ini merupakan spesies yang erat kaitannya dengan kemampuan pengikatan logam-logam berat dalam bioremediasi lingkungan. Isolat M7 mengandung BGCs yang bertanggung jawab terhadap biosintesis siderofor melalui jalur *Non-Ribosomal Peptide Synthase Independent Siderophore* (NIS). Meskipun genom isolat M7 menunjukkan kesamaan tertinggi dengan spesies *P. manganoxydans*, BGCs yang terkait siderofor pada isolat ini memiliki kesamaan tertinggi dengan *Providencia stuartii*. Kesamaan gen yang bertanggung jawab dengan biosintesis siderofor antara isolat M7 dengan *P. stuartii* lebih dari 99%. Akan tetapi, perbedaan penting antara isolat M7 dan *P. stuartii* adalah bahwa *P. stuartii* bersifat patogen dan dapat

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 University.

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



menyebabkan penyakit pada manusia, sedangkan isolat M7 tidak menunjukkan sifat patogenik terhadap manusia.

Analisis BGCs pada isolat M7 mengungkapkan adanya daerah yang mengandung dua gen utama yang bertanggung jawab untuk biosintesis siderofor. Gen-gen ini memiliki urutan nukleotida yang berbeda, tetapi mengkodekan protein yang sama yakni *IucA/IucC family of siderophore biosynthesis protein* yang bertanggung jawab untuk biosintesis *aerobactin*. Duplikasi gen-gen ini merupakan redundansi genetik yang memungkinkan mengekspresikan proteinnya secara bersamaan. Hal ini berpotensi meningkatkan akumulasi siderofor pada isolat M7 dibandingkan dengan strain *P. manganoxydans* dan *P. stuartii* yang hanya memiliki satu gen utama yang bertanggung jawab dalam biosintesis siderofor. Identifikasi siderofor yang dihasilkan oleh isolat M7 menggunakan LC-MS/MS mendeteksi adanya senyawa *N6-acetyl-N6-hydroxy-L-lysine* (ahLys) dan *N2-citryl-N6-acetyl-N6-hydroxy-L-lysine* (citryl-ahLys) sebagai senyawa prekursor yang penting bagi biosintesis *aerobactin*. Temuan ini berpotensi memiliki dampak yang signifikan pada aplikasi yang membutuhkan sistem akusisi besi yang efisien.

Kata kunci: klaster gen biosintesis, *Providencia manganoxydans*, *Providencia stuartii*, sekuensing genom, siderofor penghasil siderofor.

SUMMARY

CUCU WIJAYANTI. *Molecular Identification of Siderophore Producing Bacteria Isolated from Simadu Pineapple Roots*. Supervised by PRAYOGA SURYADARMA and NISA RACHMANIA MUBARIK.

Siderophores are organic compounds synthesized by both Gram-negative and Gram-positive bacteria. They act as iron-chelating ligands, facilitating the solubilization and transport of iron into the cell. The strong iron-binding capabilities of siderophores offer significant benefits across various fields of research and application. A siderophore-producing bacteria, M7 isolate, was studied after being isolated from Simadu pineapple roots in West Java, Indonesia. This study aimed to analyze the siderophore Biosynthesis Gene Cluster (BGC) from the total genome sequence of M7 isolate and characterize the produced siderophores. The total genome sequence of isolate M7 was obtained through Whole Genome Sequencing (WGS) using Oxford Nanopore Technology GridION. Genome assembly and annotation included quality control using Quast, de novo assembly with Flye, polishing with MEDAKA, and gene annotation using various web servers. Additionally, the similarity of the M7 isolate to other species was analyzed using Average Nucleotide Identity (ANI). The hemolytic capability of the M7 isolate was identified through hemolysis testing on blood agar, while its pathogenicity potential and the presence of virulence genes were predicted using the PathogenFinder and VirulenceFinder web servers. BGCs related to siderophore production in this isolate were identified through genome mining using antiSMASH bacterial version. The characteristics of the siderophores produced were identified using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Genomic analysis revealed that the M7 isolate has a Guanine-Cytosine (GC) content similar to that of *Providencia manganoxydans* LLDRA6, with a longer sequence length of 4,447,159 bp. Genome annotation using Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) revealed the presence of an aerobactin siderophore gene within the iron acquisition and metabolism system of the M7 isolate. Furthermore, genome comparison using ANI calculations showed that *P. manganoxydans* is the closest species to the M7 isolate, with an ANI value of 98.82%. *P. manganoxydans* is closely associated with the ability to bind heavy metals in environmental bioremediation. The M7 isolate contains BGCs responsible for siderophore biosynthesis through the Non-Ribosomal Peptide Synthase Independent Siderophore (NIS) pathway. Although the genome of isolate M7 shows the highest similarity to *P. manganoxydans*, the siderophore-related biosynthesis gene clusters (BGCs) in this isolate are most like those in *Providencia stuartii*. The gene similarity responsible for siderophore biosynthesis between isolate M7 and *P. stuartii* exceeds 99%. However, a significant difference is that *P. stuartii* is pathogenic and can cause diseases in humans, whereas isolate M7 does not exhibit pathogenic properties toward humans.

BGC analysis in the M7 isolate revealed a region containing two core genes responsible for siderophore biosynthesis. These genes have different nucleotide sequences but encode the same protein family, namely the *IucA/IucC* family of siderophore biosynthesis proteins, which are responsible for aerobactin

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 University.

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

biosynthesis. The duplication of these genes represents genetic redundancy that enables simultaneous protein expression. This redundancy may potentially increase siderophore accumulation in the M7 isolate compared to strains *P. manganoxydans* and *P. stuartii*, which only possess a single core gene responsible for siderophore biosynthesis. Identification of siderophores produced by the M7 isolate using LC-MS/MS detected the presence of N6-acetyl-N6-hydroxy-L-lysine (ahLys) and N2-citryl-N6-acetyl-N6-hydroxy-L-lysine (citryl-ahLys), which are crucial precursor for aerobactin biosynthesis. These findings could have significant implications for applications requiring an efficient iron acquisition system.

Keywords: biosynthesis gene cluster, genome sequencing, *Providencia manganoxydans*, *Providencia stuartii*, siderophore-producing bacteria.



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

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2024
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

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



@Hak cipta milik IPB 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 University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI PENGHASIL SIDEROFOR HASIL ISOLASI DARI AKAR NANAS SIMADU SUBANG

CUCU WIJAYANTI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Bioteknologi

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB 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 University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

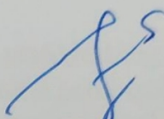


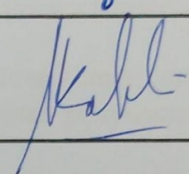
Judul Tesis : Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Siderofor Hasil Isolasi
dari Akar Nanas Simadu Subang
Nama : Cucu Wijayanti
NIM : P0501211014

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Dr. Prayoga Suryadarma, S.T.P., M.T.

Pembimbing 2:
Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si.

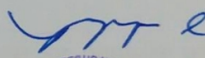


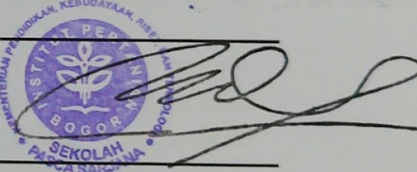


Diketahui oleh

Ketua Program Studi Bioteknologi:
Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.
NIP 196204191989031001

Dekan Sekolah Pascasarjana:
Prof. Dr. Ir. Dodik Ridho Nurrochmat, M.Sc.F.Trop.IPU
NIP 197003291996081001





Tanggal Ujian: 15 Agustus 2024

Tanggal Lulus:



@Hak cipta milik IPB 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 University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Judul yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Maret 2023 sampai bulan Februari 2024 ini ialah "Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Siderofor Hasil Isolasi dari Akar Nanas Simadu Subang".

Penulisan dan penyusunan tesis ini tidak lepas dari arahan dan bantuan banyak pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Prayoga Suryadarma, S.T.P., M.T. selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. Dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si. selaku anggota komisi pembimbing yang telah membimbing dan banyak memberi saran selama proses penelitian dan penulisan tesis ini.
2. Dr. Popi Asri Kurniatin, S.Si., Apt., M.Si. selaku penguji luar komisi yang telah memberikan kritik dan saran agar meningkatkan kualitas penyusunan tesis.
3. Prof. Dr. Ir. Miftahudin sebagai ketua Program Studi Bioteknologi yang telah memberikan arahnya selama perkuliahan hingga akhir penulisan tesis.
4. Keluarga tercinta terkhusus kedua orangtua, bapak Mustofa dan mama Murasih, kakak Ardian, kakak Baiti, dan adik Dinda yang selalu mendukung, memberikan semangat, dan kiriman do'a yang tiada henti dalam kelancaran proses setiap kegiatan dan perkuliahan.
5. Teman-teman seperbimbingan Atika dan Nana serta staf Laboratorium Rekayasa Bioproses IPB yang telah membantu selama pengumpulan data selama penelitian.
6. Rezki Perdana yang memberikan motivasi dan dukungan ke penulis untuk selalu semangat dalam menyelesaikan pendidikan S-2.
7. Khaerunissa, Kurnia Yati, Mutia Anika, Ni Putu Eka, dan semua teman-teman Bioteknologi angkatan 2021 ganjil lainnya, serta teman-teman mahasiswa program studi Bioteknologi IPB yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan S-2 di program studi Bioteknologi.

Meskipun penulis telah berusaha menyelesaikan karya ilmiah ini dengan baik, tetapi penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih bisa dikembangkan. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2024

Cucu Wijayanti



@Hak cipta milik IPB 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 University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB 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 University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
II METODE	5
2.1 Tahapan Penelitian	5
2.2 Waktu dan Tempat Penelitian	5
2.3 Alat dan Bahan	5
2.4 Prosedur Kerja	6
2.4.1 Strain Bakteri	6
2.4.2 Isolasi DNA Bakteri	6
2.4.3 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif DNA	6
2.4.4 <i>Whole Genome Sequencing</i>	6
2.4.5 Analisis Perbandingan Genom Isolat M7	7
2.4.6 Uji Hemolisis Isolat M7	7
2.4.7 Analisis <i>Biosynthesis Gene Clusters</i>	7
2.4.8 Identifikasi Siderofor pada Isolat M7	7
III HASIL DAN PEMBAHASAN	9
3.1 Karakteristik Genom Isolat M7	9
3.2 Anotasi Genom Isolat M7	10
3.3 Perbandingan Genom Isolat M7	11
3.4 Aktivitas Hemolitik Isolat M7	13
3.5 Klaster Gen Biosintesis Siderofor pada Isolat M7	13
3.6 Perbandingan Klaster Gen Biosintesis Siderofor	16
3.7 Senyawa Siderofor pada Isolat M7	16
IV SIMPULAN DAN SARAN	18
4.1 Simpulan	18
4.2 Saran	18
DAFTAR PUSTAKA	18
LAMPIRAN	22



DAFTAR TABEL

1	Karakteristik genom isolat M7	9
2	Perbandingan klaster gen biosintesis metabolit sekunder pada isolat M7 dengan strain terdekat	14
3	Prediksi ORF klaster 4 yang bertanggung jawab dalam biosintesis siderofor	15

DAFTAR GAMBAR

1	Diagram alir penelitian	5
2	Anotasi genom isolat M7 dengan RAST	10
3	Anotasi peta sirkular seluruh genom isolat M7	11
4	Perbandingan ANI yang diidentifikasi dari isolat M7 dengan genom <i>Providencia</i> lainnya menggunakan program OAT	12
5	Prediksi ORF klaster 4 pada genom isolat M7 menggunakan <i>software</i> antiSMASH	15
6	Perbandingan klaster biosintesis siderofor pada isolat M7 dengan <i>P. stuartii</i> dan <i>P. manganoxydans</i>	16
7	Kromatogram senyawa siderofor pada isolat M7	17

DAFTAR LAMPIRAN

1	Elektroforegram <i>g</i> DNA isolat M7	25
2	Kualitas dan kuantitas <i>g</i> DNA isolat M7	25
3	Pengujian hemolisis pada isolat M7	25
4	Hasil prediksi sifat patogenitas genom isolat M7	26
5	Hasil prediksi faktor virulensi pada isolat M7	27
6	Jalur biosintesis <i>aerobactin</i>	27