



**DESAIN PRIMER SPESIFIK UNTUK MENGAMPLIFIKASI
SEKUENSI GEN *cfl* (*coronafacate ligase*) PADA PATOGEN
HAWAR BAKTERI YANG MENGINFEKSI KEDELAI**

SKRIPSI

Oleh :

**Riska Susilawati
NIM. 081510501173**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2013**



**DESAIN PRIMER SPESIFIK UNTUK MENGAMPLIFIKASI
SEKUENSI GEN *cfl* (*coronafacate ligase*) PADA PATOGEN
HAWAR BAKTERI YANG MENGINFEKSI KEDELAI**

SKRIPSI

**diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi
Fakultas Pertanian Universitas Jember**

Oleh :

**Riska Susilawati
NIM. 081510501173**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2013**

SKRIPSI

DESAIN PRIMER SPESIFIK UNTUK MENGAMPLIFIKASI SEKUENSI GEN *cfl* (*coronafacate ligase*) PADA PATOGEN HAWAR BAKTERI YANG MENGINFEKSI KEDELAI

Oleh:

Riska Susilawati
NIM. 081510501173

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, SP., MP. Ph.D
NIP. 19801109 200501 1 001

Dosen Pembimbing Anggota : Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS. Ph.D
NIP. 19521217 198003 2 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Desain Primer Spesifik untuk Mengamplifikasi Sekuensi Gen *cfl* (*coronafacate ligase*) Pada Patogen Hawar Bakteri yang Menginfeksi Kedelai” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 23 Mei 2013

tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji:
Ketua

Hardian Susilo Addy, SP., MP. Ph.D
NIP. 198011092005011001

Anggota I,

Anggota II,

Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS. Ph.D
NIP. 19500903 198003 1 001

Ir. Abdul Majid, MP.
NIP. 19670906 199203 1 004

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, MT
NIP. 19590102 198803 1 002

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riska Susilawati

NIM : 081510501173

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: **Desain Primer Spesifik untuk Mengamplifikasi Sekuensi Gen *cfl* (*coronafacate ligase*) Pada Patogen Hawar Bakteri yang Menginfeksi Kedelai**, adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta, bersedia mendapat sanksi akademik jika di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,
Yang menyatakan,

Riska Susilawati
NIM. 081510501173

RINGKASAN

Desain Primer Spesifik untuk Mengamplifikasi Sekuensi Gen *cfl* (*coronafacate ligase*) Pada Patogen Hawar Bakteri yang Menginfeksi Kedelai. Riska Susilawati. 081510501173. Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Penyakit hawar bakteri (*bacterial blight*) merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman kedelai dan dapat menyebabkan kerugian mencapai 11-20%. Identifikasi penyebab penyakit perlu dilakukan secara dini agar pengendalian penyakit lebih mengena sasaran. Identifikasi penyebab penyakit hawar bakteri dilakukan yaitu dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pada PCR, kespesifikan primer merupakan salah satu kunci keberhasilan PCR. Patogen penyebab penyakit hawar bakteri diketahui memiliki gen spesifik yaitu gen *coronafacate ligase* (*cfl*) yang membedakannya dari spesies lain. Kekhususan gen pada bakteri target yang diidentifikasi dapat dijadikan dasar sebagai pembeda antar spesies. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer yang spesifik terhadap gen *cfl* dan mengamplifikasi sekuensi gen *cfl* dengan PCR menggunakan primer spesifik yang di desain.

Tahap pertama dalam desain primer dilakukan eksplorasi sekuensi gen *cfl* dari gen Bank NCBI dan diperoleh lima jenis bakteri dari patovar *P. syringae* dan dua jenis bakteri lain yang memiliki gen *cfl*. Perbedaan urutan sekuensi nukleotida dari masing-masing jenis bakteri selanjutnya di uji multiple alignment dengan software ClustalX, dan diperoleh lima patovar *P. syringae* yang memiliki area homologi yang tinggi. Dari lima kandidat patovar *P. syringae* yang diketahui area homologi tertinggi, selanjutnya dipilih satu sekuensi spesifik *P. syringae* pv. *glycinea*. Urutan nukleotida gen *cfl* dari *P. syringae* pv. *glycinea* didesain primernya dengan tool bioinformatika Primer3 dan diperoleh lima kandidat primer. Lima kandidat primer tersebut di uji kembali dengan software AmplifX dan dipilih satu pasang primer yang sesuai dengan kriteria primer spesifik. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuensi gen *cfl* yaitu primer PSG_ *cfl*2-F dengan sekuensi 5' TTCCTACGGTACGACGGAGTCT 3' dan PSG_ *cfl*2-R dengan sekuensi 3' CCCACTGGTAGTACGCAACAGA 5'. Hasil amplifikasi

sekuensi gen *cfl* terhadap *P. syringae* pv. *glycinea* dengan menggunakan primer PSG_*cfl*2 adalah negatif, hal ini ditunjukkan dengan ketidakhadiran pita DNA pada gel elektroforesis. Ketidakhadiran pita DNA hasil amplifikasi gen *cfl* kemungkinan disebabkan karena bakteri target tidak memiliki gen *cfl*. Hal ini sesuai dengan temuan yang menyatakan bahwa tidak semua *P. syringae* pv. *glycinea* memiliki gen *cfl*. Untuk membuktikan ketiadaan gen *cfl* pada *P. syringae* pv. *glycinea* maka dilakukan uji pendekatan induksi hipertropi pada jaringan kentang. Pengujian tersebut juga memberikan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya hipertropi pada jaringan kentang yang ditetesi dengan suspensi *P. syringae* pv. *glycinea*. Berdasarkan pada nekrosis yang lemah pada uji virulensi dan patogenitas, tidak terbentuknya hipertropi pada jaringan kentang dan tidak adanya pita gen *cfl* pada elektroforesis produk PCR disimpulkan bahwa *P. syringae* pv. *glycinea* tidak memiliki gen *cfl*.

SUMMARY

Design Specific Primers to Amplify Sequences of *cfl* Genes (*coronafacate ligase*) In Bacterial Blight Pathogens Infected Soybean. Riska Susilawati. 081510501173. Agrotechnology Study Program; Faculty of Agriculture, University of Jember.

Bacterial blight is one of the important disease of soybean. This disease can cause losses of 11-12%. So it is necessary to identify the causal agent in earlier stage. One of the common identification technique is by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). This technique requires a specific primer. If the causal agent was suspected as *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* which has the specific gene namely *coronafacate ligase* (*cfl*), this gene is able to differentiate it from other species. The aims of the study was to identify the causal agent of bacterial blight earlier by this designing the specific primers to the *cfl* gene for PCR.

Exploration *cfl* gene was accessed from gene Bank NCBI and it was found five pathovars of *P. syringae* and two other bacterial genus that have *cfl* gene. The differences nucleotide sequence of each those bacterial was tested with software ClustalX, and resulted five pathovars with the high area homology sequence. One pathovar with specific sequence to *cfl* gene of *P. syringae* pv. *glycinea* was chosen from those five pathovars. Then this primer sequence was designed using tool bioinformatic Primer3 and it was found five candidates primers that where tested again using software AmplifX. One of the candidate PSG_*cfl2* was used as specific primer which the sequence of PSG_*cfl2*-F gene is 5' TTCCTACGGTACGACGGAGTCT 3' and PSG_*cfl2*-R is 3' CCCACTGGTAGTACGCAACAGA 5'. The *cfl* gene sequence the *P. syringae* pv. *glycinea* by using primers PSG_*cfl2* was negative, as shown by the disappearance of the *cfl* gene band on the gel electrophoresis. This means that *P. syringae* pv. *glycinea* isolate did not have the *cfl* gene. This was supported by the uncapability this isolate to induce hypertrophy on potato tissues. It was concluded that based on the mild necrosis on virulence and pathogenesis tests, the uncapability to induce hypertrophy and the absence of *cfl* gene band on

electrophoresis PCR product, this *P. syringae* pv. *glycinea* does not has the *cfl* gene.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT., karena atas berkat dan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Desain Primer Spesifik untuk Mengamplifikasi Gen *cfl* (*coronafacate ligase*) Pada Patogen Hawar Bakteri yang Menginfeksi Kedelai”**. Penulisan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi syarat bahwa telah menyelesaikan pendidikan strata satu (S1), Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Terselesainya penelitian dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Melalui kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada:

1. Hardian Susilo Addy, SP., MP. Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama dan, Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS. Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota, Ir. Abdul Majid, MP., selaku Dosen Penguji III yang memberikan perhatian, meluangkan waktu, dan pikiran serta bimbingannya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
2. Ir. Slamet Haryanto, MP (Alm.), dan Ir. Syaifudin Hasyim, MP., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
3. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr. Ph.D., selaku Kepala Laboratorium Analisis Tanaman yang telah membantu dan memberikan ijin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium Analisis Tanaman;
4. Ayahanda Mochammad, Ibunda Titin Sugiarti, serta Kakakku Rita Susilarini, ST., Adikku Risqi Siti Aisyah dan Kekasihku Akhmad Yugo Hutomo, SE., yang menjadi suri tauladan untuk terus berjuang, dengan senantiasa memberikan semangat, do'a, saran dan inspirasi demi terselesainya penelitian dan penulisan skripsi ini;
5. Teknisi Laboratorium dan Staff Administrasi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Jember, terima kasih atas bantuannya selama ini;
6. Direktorat Pendidikan Tinggi (DIKTI), yang mendanai Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian (PKM-P);

7. Teman-temanku di Laboratorium Virologi dan Laboratorium Analisis Tanaman yang senantiasa menemani selama penelitian;
8. Rekan-rekan seperjuangan Agroteknologi angkatan 2008 yang telah mendukung dalam terselesainya penulisan skripsi ini;
9. Dan semua pihak yang telah banyak membantu selama penyusunan skripsi ini.

Saya sebagai penyusun dan penulis skripsi menyadari dalam penulisan masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran atau kritik yang bersifat membangun. Akhir kata, semoga hasil penulisan skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 23 Mei 2013

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL PERTAMA	i
HALAMAN JUDUL KEDUA	ii
HALAMAN PEMBIMBING	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERNYATAAN	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Manfaat.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Penyakit - Penyakit Pada Kedelai	3
2.2 Penyakit Hawar Pada Kedelai.....	3
2.2.1 Hawar Daun.....	3
2.2.2 Hawar Bakteri.....	4
2.3 Toksin yang Dihasilkan oleh <i>P. Syringae</i>	5
2.4 Amplifikasi DNA dengan <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	5
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	8
3.1 Tempat dan Waktu	8
3.2 Peralatan dan Bahan Penelitian	8
3.3 Metode Penelitian.....	8

3.3.1 Isolasi Bakteri	8
3.3.2 Uji Patogenesitas dan Virulensi Bakteri.....	9
3.3.3 Isolasi DNA	9
3.3.4 Amplifikasi Sekuensi Gen <i>cfl</i> dengan Teknik PCR.....	10
1. Cetakan DNA	10
2. Desain dan Penentuan Primer untuk PCR.....	10
3. Pelaksanaan PCR	11
4. Elektroforesis Hasil PCR	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	12
4.1 Isolat Patogen Hawar Bakteri Kedelai	12
4.2 Uji Patogenesitas dan Virulensi Bakteri.....	13
4.3 Desain Primer Spesifik DNA Bakteri	15
4.4 Amplifikasi Sekuensi Gen <i>cfl</i> Pada Sampel Bakteri Patogen Hawar...	21
BAB 5. PENUTUP	23
5.1 Kesimpulan	23
5.2 Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	24

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
1.	Data Sekuensi Fragmen Gen <i>cfl</i> Pada Beberapa Spesies Bakteri	16
2.	Karakteristik Oligonukleotida Pasangan Primer untuk Mengamplifikasi gen <i>cfl</i>	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
4.1	Daun kedelai yang tidak bergejala (A) dan yang menunjukkan gejala hawar bakteri (B). Gejala berwarna coklat kehitaman pada batang, dan tulang daun (gejala ditunjukkan dengan busur panah).....	12
4.2	Goresan koloni patogen hawar bakteri pada media Kings'B. (A) Tidak disinari UV, dan (B) Berpendarfluor ketika disinari UV.....	13
4.3	Reaksi hipersensitif pada daun tembakau yang diinfiltrasi dengan suspensi isolat patogen hawar bakteri kedelai pada kerapatan sel 10^8 cfu/ml. (A) Kontrol adalah perlakuan infiltrasi daun tembakau dengan air steril, (B) Reaksi hipersensitif pada daun tembakau yang ditunjukkan dengan nekrosis lemah, dan (C dan D) Gejala hipersensitif yang diperbesar 5x. Pada 24 jam setelah infiltrasi.....	14
4.4	Uji virulensi pada daun kedelai yang diinfiltrasi dengan suspensi isolat patogen hawar bakteri kedelai pada kerapatan sel 10^8 cfu/ml. (A) Gejala nekrosis lemah (area yang ditunjukkan dengan busur panah), (B) Kontrol adalah perlakuan infiltrasi daun kedelai dengan air steril, (C) Gejala virulensi yang diperbesar 5x, dan (D) Kontrol yang diperbesar 5x. Pada 48 jam setelah infiltrasi.....	14
4.5	Multiple alignment atau persejajaran berganda dari beberapa strain bakteri yang tertera pada tabel 4.1 dengan menggunakan software ClustalX. (A) Multiple alignment dari tujuh strain bakteri, dan (B) Multiple alignment dari lima strain bakteri	17
4.6	Simulasi kompatibilitas dari strain bakteri <i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (PSG) digunakan software AmplifX. (1) PSG_cfl1, (2) PSG_cfl2, (3) PSG_cfl3, (4) PSG_cfl4, dan (5) PSG_cfl5	20
4.7	Pola asam nukleat pada hasil elektroforesis sampel total genom (TG) dan hasil reaksi PCR (PR) bakteri patogen hawar bakteri kedelai (1) dan isolat <i>Pseudomonas</i> pendarfluor PF-5 (2) pada gel agarose dengan konsentrasi 1% (50 V, 1 jam). M- ladder DNA	21
4.8	Uji terbentuknya hipertropi pada jaringan kentang setelah 5 hari ditetesi $\pm 4 \mu\text{l}$ suspensi <i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> . (A) Irisan kentang nampak dari atas (huruf a, b, c, dan d merupakan daerah yang ditetesi suspensi <i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>), dan (B) Irisan kentang nampak dari samping	22