

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
1. Latar Belakang	1
2. Permasalahan	2
3. Tujuan Penelitian	2
4. Manfaat Penelitian	2
I. TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI	4
1. Tinjauan Pustaka	4
2. Landasan Teori	7
2.1 Karakter dan Klasifikasi <i>Pectobacterium brasiliense</i>	7
2.2 Gejala Penyakit akibat <i>Pectobacterium brasiliense</i>	8
2.3 Gen Virulensi <i>Pectobacterium brasiliense</i>	10
2.4 Madu Manuka	11
2.5 Analisis Ekspresi Gen Berbasis Transkriptomik	13
2.4.1 Prinsip Semi-kuantitatif PCR dan Kuantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)	15
2.4.1 Jenis-jenis metode dalam Real-Time PCR	15
a. Metode non-sequence-specific probe	15
b. Metode sequence-specific probe	16
1) qRT-PCR berdasarkan TaqMan probe	16
2) Molecular beacons	16
3) Scorpion-PCR	16



3. Hipotesis.....	18
II. METODOLOGI PENELITIAN	19
A. Tempat dan Waktu Penelitian	19
B. Bahan	20
C. Alat	20
D. Prosedur Kerja.....	20
1. Kultur <i>Pectobacterium brasiliense</i>	20
2. Desain Primer Gen Virulensi	21
3. Isolasi RNA total	21
4. Sintesis cDNA	22
5. Analisis semi kuantitatif PCR	22
6. Amplifikasi Gen dengan teknik <i>quantitative Real-Time PCR</i> (qRT-PCR)	23
7. Analisis Data	23
III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	24
A. Analisis ekspresi gen virulensi <i>Pectobacterium brasiliense</i>	24
1. Ekspresi gen penyandi enzim ekstraseluler	24
2. Ekspresi gen penyandi motilitas bakteri	27
3. Ekspresi gen penyandi biofilm dan pelikel bakteri	31
4. Ekspresi gen penyandi <i>Hypersensitivity reaction and pathogenecity</i> (Hrp) dan Quorum sensing (QS)	34
IV. KESIMPULAN	40
I. SARAN	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi Reagen qRT-PCR	23
---	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Gejala penyakit disebabkan oleh *Pectobacterium brasiliense* pada kentang: (A) Gejala khas *blackleg* tanpa adanya klorosis pada kondisi basah dan dingin; (B) Pada kondisi basah dan lembab batang menjadi berair dan pucat, daun menjadi klorotik; (C) Infeksi parah pada tanaman kentang menjadi kering dan mati; (D) Busuk lunak kehitaman pada penyimpanan dalam kondisi lembab dan suhu tinggi (Merwe *et al.*, 2009). 10

Gambar 2. Gejala busuk lunak pada mentimun disebabkan oleh *Pectobacterium brasiliense*: A,B,C, mengeluarkan cairan kental berwarna putih pada permukaan batang, buah, dan daun; D,E,F, adalah gejala pada buah, daun, dan batang yang terinfeksi (Meng *et al.*, 2017). 10

Gambar 3. Gejala busuk lunak disebabkan oleh *Pectobacterium brasiliense* pada paprika: (a) dan (b) busuk pada buah; (c) busuk pada tangkai; (d) busuk pada buah yang dibelah (Choi dan Kim, 2013). 10

Gambar 4. Akuisisi senyawa antimikroba pada madu. (A) Senyawa polifenolik yang diderivasi dari tanaman ditransfer oleh lebah. (B) Sukrosa dari bunga dicerna oleh lebah dan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa oleh lebah. Glukosa dioksidasi oleh glukosa oksidase dengan penambahan oksigen, menghasilkan D-glucono- δ -lactone dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida memiliki aktivitas antibakteri. (C) *Bee defensin-1* ditambahkan ke madu oleh lebah. (D) Dihidroksiaseton diambil dari *Leptospermum* sp. dan dikonversi secara non-enzimatik menjadi methylglyoxal melalui reaksi dehidrasi. (Nolan *et al.*, 2019) 12

Gambar 5. Hasil elektroforesis gen pengkode enzim ekstraseluler pada *Pectobacterium brasiliense*. Perlakuan madu manuka (T) pada gen pengkode poligalakturonase (*pehA*), pektat liase (*peIA*, *peIB*, dan *peIC*), dan protease (*prtW*) menunjukkan ketebalan pita cDNA lebih tipis dibandingkan dengan tanpa perlakuan madu manuka (NT). Gen standar internal *recA* tidak menunjukkan perbedaan. 25

Gambar 6. Level ekspresi semi kuantitatif gen pengkode enzim ekstraseluler pada *Pectobacterium brasiliense*. Ekspresi poligalakturonase (*pehA*), pektat liase (*peIA*, *peIB*, dan *peIC*), dan protease (*prtW*) dengan perlakuan madu manuka bersifat down-regulated. Keterangan : 5%=perlakuan madu manuka; 0%=tanpa perlakuan madu manuka. 26

Gambar 7. Hasil elektroforesis gen pengkode motilitas pada *Pectobacterium brasiliense*. Perlakuan madu manuka (T) pada gen sigma faktor σ^{28} (*fliA*), flagellar basal body P-ring (*flgA*), dan flagellar motor (*motA*) menunjukkan ketebalan pita cDNA lebih tipis dibandingkan dengan tanpa perlakuan madu manuka (NT). Gen standar internal *recA* tidak menunjukkan perbedaan. 28

Gambar 8. Analisis ekspresi semi kuantitatif pada gen motilitas *P. brasiliense*. Ekspresi gen flagellar motor (*motA*), sigma faktor σ^{28} (*fliA*), dan flagellar basal body P-ring (*flgA*) dengan perlakuan madu manuka bersifat down-regulated. Keterangan : 5%=perlakuan madu manuka; 0%=tanpa perlakuan madu manuka. 29

Gambar 9. Tingkat ekspresi relatif gen motilitas pada *Pectobacterium brasiliense*. Ekspresi gen sigma faktor σ^{28} (*fliA*), flagellar basal body P-ring (*flgA*), dan flagellar motor (*motA*) dengan perlakuan madu manuka bersifat down-regulated. Keterangan : 5%=perlakuan madu manuka; 0%=tanpa perlakuan madu manuka. 30

Gambar 10. Hasil elektroforesis gen pengkode biofilm dan pelikel pada *Pectobacterium brasiliense*. Perlakuan madu manuka (T) pada gen cellulose synthase (*bcsA*), dan DNA-binding protein (*fis*) menunjukkan ketebalan pita cDNA lebih tipis dibandingkan dengan tanpa perlakuan madu manuka (NT). Gen standar internal *recA* tidak menunjukkan perbedaan. 32

Gambar 11. Analisis ekspresi semi kuantitatif pada gen biofilm dan pelikel *P. brasiliense*. Ekspresi gen cellulose synthase (*bcsA*), dan DNA-binding protein (*fis*) dengan perlakuan madu manuka bersifat down-regulated. Keterangan : 5%=perlakuan madu manuka; 0%=tanpa perlakuan madu manuka. 33

Gambar 12. Tingkat ekspresi relatif gen biofilm dan pelikel pada *Pectobacterium brasiliense*. Ekspresi gen cellulose synthase (*bcsA*), dan DNA-binding protein (*fis*) dengan perlakuan madu manuka bersifat down-regulated. Keterangan : 5%=perlakuan madu manuka; 0%=tanpa perlakuan madu manuka. 34

Gambar 13. Hasil elektroforesis gen pengkode Hypersensitivity reaction and pathogenecity (Hrp) pada *Pectobacterium brasiliense*. Perlakuan madu manuka (T) pada gen pengkode alternative sigma factor (*hrpL*) menunjukkan ketebalan pita cDNA lebih tipis dibandingkan dengan tanpa perlakuan madu manuka (NT). Gen standar internal *recA* tidak menunjukkan perbedaan. .. 35

Gambar 14. Analisis ekspresi semi kuantitatif pada gen Hypersensitivity reaction and pathogenecity (Hrp) pada *P. brasiliense*. Ekspresi gen pengkode alternative sigma factor (*hrpL*) dengan perlakuan madu manuka bersifat down-regulated. Keterangan : 5%=perlakuan madu manuka; 0%=tanpa perlakuan madu manuka. 36

Gambar 15. Tingkat ekspresi relatif gen pengkode Hypersensitivity reaction and pathogenecity (Hrp) dan Quorum sensing (QS) pada *Pectobacterium brasiliense*. Ekspresi gen alternative



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

Ekspresi Gen Virulensi *Pectobacterium brasiliense* Dengan Perlakuan Madu Manuka
SHEILA AVA, Dr. Tri Joko, S.P., M.Sc., 2. Prof. Dr. Ir. Siti Subandiyah, M. Agr.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2020 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

sigma factor (*hrpL*) dan AHL-synthase (*expI*) dengan perlakuan madu manuka bersifat down-regulated. Keterangan : 5%=perlakuan madu manuka; 0%=tanpa perlakuan madu manuka.37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Sekuens primer virulensi *Pectobacterium brasiliense* 52

Lampiran 2 Lampiran 1. Data Analisis Relatif Gen Virulensi *Pectobacterium brasiliense* 53