

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Bakteri sebagai agen biokontrol memproduksi senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan jamur patogen. Salah satu jenis senyawa yang diproduksi bakteri untuk menghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman adalah enzim hidrolitik. Enzim hidrolitik (protease, selulase, kitinase, dan glukonase) berkontribusi langsung terhadap kemampuan antagonisme terhadap jamur patogen melalui aktivitas penghambatan pertumbuhan miselia dan degradasi dinding sel jamur (Ann, 2012).

Sebagai salah satu enzim hidrolitik, protease merupakan enzim yang paling efektif untuk dimanfaatkan sebagai biofungisida dalam mengendalikan penyakit tanaman (Dunne *et al.*, 1997). Eksplorasi bakteri-bakteri penghasil enzim protease untuk penghambatan jamur patogen telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Spesies-spesies seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, dan *Bacillus vallismortis* diketahui menghasilkan enzim hidrolitik (protease dan selulase) yang mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium solani*, dan *Septobasidium spp* (Ann, 2012). Palaniyandi *et al.*, (2013) menyatakan bahwa bakteri *Streptomyces phaeopurepureus* ExPro138 menghasilkan protease yang bersifat antagonis terhadap jamur *C. coccodes*, penyebab penyakit antraknosa pada tanaman tomat. *Paenibacillus polymyxa* APEC128 dapat menekan penyakit antraknosa pada apel yang disebabkan oleh *C. gloeosporioides* dan *C. acutatum* melalui peningkatan produksi protease dan amylase (Kim *et al.*, 2016).

Syafriani *et al.* (2016) berhasil mengidentifikasi bakteri *Serratia plymuthica* strain UBCR_12 yang telah terbukti secara *in vitro* menghasilkan protease dan kitinase yang mampu menghambat pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides*. Persentase penghambatan bakteri terhadap *C. gloeosporioides* yaitu sebesar 33,48 % untuk ekstrak kasar protease dan 26,82% untuk ekstrak kasar kitinase. Mempertimbangkan besarnya persentase daya hambat yang dihasilkan melalui

protease daripada kitinase, maka penelitian lanjutan terhadap protease yang dihasilkan bakteri tersebut menjadi menarik untuk dilakukan.

Berdasarkan sifat kimia dari sisi aktifnya, protease dibagi atas empat yaitu protease serin, protease sulfidril, protease metal, dan protease asam (Suhartono, 1991 dalam Winarwi 2006). Protease metal atau *metalloprotease* dari bakteri *S. marcescens* HR3 diketahui dapat menekan serangan hama belalang (Tao *et al.*, 2007). Ekstraseluler *metalloprotease* dari *Xenohabdus indica* berperan penting dalam mengontrol *Helicoverpa armigera* pada tanaman kapas. Bahkan ekstraseluler *metalloprotease* dari *X. indica* diketahui mampu membunuh serangga *H. armigera* dengan persentase 67,9% dalam waktu tujuh hari. Jenis protease ini sangat potensial untuk dimanfaatkan dalam bidang pertanian sebagai insektisida alami (Pranaw *et al.*, 2013). Namun sejauh ini belum ditemukan laporan bahwa enzim tersebut mampu menekan pertumbuhan jamur patogen.

Untuk mengetahui apakah *metalloprotease* juga dapat digunakan sebagai biofungisida terhadap jamur patogen, maka perlu dilakukan penelitian isolasi dan ekspresi gen pengkode enzim *metalloprotease* tersebut terhadap beberapa jamur patogen. Namun sebelum jauh gen tersebut digunakan untuk ekspresi dan produksi massalnya, maka penelitian pendahuluan berupa kloning gen *metalloprotease* sebagai stok gen, penting untuk dilakukan. Genom DNA dari ketiga isolat bakteri *Serratia plymuthica* (UBCR_12, UBCF_01 dan UBCF_13) dapat digunakan sebagai *template* dalam mengisolasi dan mengamplifikasi gen *metalloprotease*. Lebih lanjut, gen yang berhasil diisolasi dan diamplifikasi melalui PCR tersebut dapat dikloning ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α (*PCR-based cloning*).

Strategi kloning melalui PCR bisa digunakan untuk mendapatkan gen yang murni atau seragam, karena bagian DNA yang diamplifikasi dalam reaksi PCR hanya daerah yang dibatasi oleh posisi penempelan dua oligonukleotida (Brooker, 2012). Kloning berbasis PCR merupakan metode isolasi gen target yang memiliki keunggulan seperti sensitifitas tinggi, kemudahan dan kecepatan dalam analisis molekuler dan rekayasa genetik, dengan persyaratan tingkatan homologi dan kesamaan struktur antar sekuen gen-gen yang dimiliki oleh organisme. Tingkat kelestarian struktur sekuen antara gen-gen *ortolog* dari berbagai organisme akan

menentukan seberapa besar tingkat keberhasilan proses kloning gen menggunakan teknik berbasis PCR (Jamsari, 2013).

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkloning gen pengkode *metalloprotease* dari isolat UBCR-12, UBCF_01 dan UBCF_13 ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5a.

