

## Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen Penghasil Biosurfaktan dari *Staphylococcus epidermidis* Isolat Lokal

Irma Mardiah\*, Nur Asni Setiani, Umi Baroroh, Fatka Farah Mudita  
Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia

\*Corresponding author: imardiah2@gmail.com

### Abstract

Biosurfactants are surface active compounds produced by microbes that are biodegradable and use sources that can be recycle. Industrial-scale biosurfactant production is still not maximized due to low productivity. By knowing the genetics of producing biosurfactants from a microbe, it is expected that the production of biosurfactants can be increased. In this study, bioinformatics analysis was carried out to determine the type, location and primary design of selected biosurfactant genes in *Staphylococcus epidermidis* for amplification with PCR. Sequences of the bacterial genome and the biosurfactant gene were analyzed in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program to determine the degree of similarity between the two sequences. bacteria. In *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 there are biosurfactants surfactin with significant alignment results with the acquisition of an e-value of 0.0, query coverage above 100%, and % identity above 98,67%. The best result of the primary design using the Primer-BLAST program were selected. The couple primer (forward and reverse) have 20 bp in length. This primer can amplified in silico surfactin *S.epidermidis* in range area 10184-10521 bp, with product length 357 bp.

**Keywords:** Surfactin, Bioinformatics, Primer-BLAST

### Abstrak

Biosurfaktan adalah senyawa aktif penurun tegangan permukaan yang diproduksi oleh mikroba yang memiliki keunggulan mudah didegradasi alam dan dapat diperbaharui. Produksi biosurfaktan skala industri belum dapat dioptimalkan karena kendala rendahnya produktivitas bakteri lokal. Dengan mengetahui gen penghasil biosurfaktan dari mikroba, dapat diharapkan produksi biosurfaktan dapat ditingkatkan. Pada penelitian ini dilakukan analisis bioinformatika untuk menentukan tipe, lokasi dan desain primer gen biosurfaktan terpilih pada *Staphylococcus epidermidis* untuk diamplifikasi menggunakan PCR. Sekuence gen dan protein biosurfaktan di analisis menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk menentukan derajat kesamaan di antara dua sekuence bakteri. Terdapat surfaktin sebagai kandungan biosurfaktan terbaik berupa surfaktin pada bakteri *S.epidermidis* ATCC 12228 dengan hasil penyejajaran signifikan nilai e-value 0,0, nilai *query coverage* sebesar 100% dan % identity sebesar 98,67%. Pasangan desain primer terbaik terpilih dengan panjang primer sebesar 20 pb untuk masing-masingnya. Primer ini dapat mengamplifikasi gen surfaktin *S.epidermidis* secara in siliko pada range area 10184-10521 pb, dengan panjang produk sebesar 357 pb.

**Kata kunci:** Surfactin, Bioinformatika, Primer-BLAST

### PENDAHULUAN

Surfaktan merupakan molekul ampifatik yang terdiri dari gugus hidrofilik dan hidrofobik yang dapat mereduksi tegangan permukaan dan membentuk mikroemulsi antara dua fluida yang tidak saling bercampur (Yamin, 2012). Berdasarkan pada kemampuan memengaruhi sifat permukaan suatu bahan inilah surfaktan digunakan di berbagai bidang terutama industri farmasi yang digunakan untuk obat-obatan berbentuk suspensi dan emulsi (Elazzazy et al., 2015). Penggunaan surfaktan semakin

meningkat setiap tahunnya seiring dengan berkembangnya industri di Indonesia. Hal ini berbanding terbalik dengan keberadaan industri surfaktan yang masih sangat terbatas. Menurut Pusat Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), data kebutuhan penggunaan surfaktan di Indonesia sekitar 95.000 ton per tahun, sedangkan kapasitas produksi dalam negeri sekitar 55.000 ton per tahun (Furi & Coniwati, 2012). Jenis surfaktan yang selama ini digunakan adalah surfaktan sintetik yang diproduksi dari

petroleum. Surfaktan jenis ini bersifat *non biodegradable* yang tidak ramah lingkungan dan berpotensi menimbulkan pencemaran karena sulit untuk didegradasi oleh mikroorganisme. Seiring dengan peningkatan kesadaran masyarakat terhadap efek pencemaran yang disebabkan oleh surfaktan *nonbiodegradable*, maka perlu dilakukan pengembangan surfaktan yang bersifat biodegradable dengan toksisitas rendah (Reningtyas & Mahreni, 2015).

Biosurfaktan merupakan surfaktan biodegradable yang disintesis secara ekstraseluler oleh mikroorganisme yang memiliki aktivitas sebagai penurun tegangan permukaan dan emulsifikasi (Sari, et al., 2015). Beberapa keuntungan yang diperoleh dari biosurfaktan ini di antaranya mempunyai sifat fisika dan kimia yang stabil, tidak mencemari lingkungan, sangat mudah terurai, stabil pada temperatur tinggi, kadar asam dan garam tinggi, bahan baku dapat diperbaharui, lebih murah, dan memiliki toksisitas rendah (Ciccyliona & Nawfa, 2012).

Dalam upaya pengoptimalan produksi biosurfaktan, dilakukan penelitian isolat bakteri penghasil senyawa biosurfaktan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Octaviyani (Setiani, et al., 2019), bakteri *Staphylococcus epidermidis* berpotensi menghasilkan biosurfaktan golongan lipopeptida dengan indeks emulsifikasi sebesar 50,72% dan 48,28%.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis gen biosurfaktan yang terdapat pada bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Mendesain primer dari gen biosurfaktan terpilih secara *in silico* menggunakan Primer-BLAST.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah data genom bakteri *Staphylococcus epidermidis* serta sekuen nukleotida biosurfaktan yang diperoleh dari Gen Bank yang dapat diakses melalui <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah perangkat keras laptop dengan spesifikasi Operating System Windows® Home 64-bit, prosesor Intel® Intel Core i3-1005G1 dual-core (4 thread) 1,2GHz TurboBoost 3,4GHz, memori RAM 4GB DDR4, storage 512GB PCIe SSD, program BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool) meliputi Nucleotide BLAST dan Primer BLAST yang dapat diakses melalui <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> digunakan untuk membandingkan informasi sekuen biologi nukleotida bakteri dan biosurfaktan dan pembuatan primer.

## Metode

### Penelusuran sekuen gen biosurfaktan

Jenis biosurfaktan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Norine database yang memuat kumpulan nonribosomal peptide yang dapat diakses melalui <https://bioinfo.lifl.fr/norine/index.jsp>. Sekuen gen potensial penyandi biosurfaktan didapat dari Gen Bank yang dapat diakses melalui <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Jenis database yang digunakan dalam pencarian sekuen adalah nucleotide kemudian masukkan nama jenis biosurfaktan yang akan dicari pada kolom pencarian lalu pilih format FASTA.

### Penyelarasan sekuen protein dan gen biosurfaktan

Analisis penyelarasan dilakukan dengan membandingkan sekuen genom *Staphylococcus epidermidis* dengan sekuen protein dan gen biosurfaktan lipopeptida. Tahapan dalam analisis sekuen menggunakan BLAST adalah: Pada halaman awal program BLAST di situs NCBI pilih Nucleotide BLAST. Di fitur Enter Query Sequence masukkan sekuen nukleotida gen biosurfaktan dalam format FASTA ke dalam kolom. Di fitur Choose Search Set, organisme yang dipilih adalah *Staphylococcus epidermidis*. Klik BLAST, kemudian akan muncul tabel yang menampilkan sekuen yang mempunyai tingkat signifikansi penyelarasan yang sesuai (*Maximum Score, Total Score, Query Coverage, Expect Value, dan Identity*).

### Desain Primer Gen Biosurfaktan

Desain primer menggunakan program Primer-BLAST menggunakan template DNA target dari sekuen hasil penyelarasan yang signifikan. Tahapan dalam desain primer menggunakan Primer-BLAST adalah: Pada halaman awal program BLAST di situs NCBI pilih Primer-BLAST. Di fitur PCR Template masukkan *accession/gi/FASTA* sekuen nukleotida gen biosurfaktan ke dalam kolom. Di fitur Primer Pair Specificity Checking Parameters, database yang dipilih adalah *nr* dan organisme yang dipilih adalah *Staphylococcus*

*epidermidis*. Klik Get Primers, kemudian akan muncul tabel yang berisi kandidat primer yang sesuai. Analisis desain primer dilakukan menggunakan program oligoanalyzer.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis bioinformatika untuk mendapatkan desain primer gen biosurfaktan pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 melalui situs NCBI. *Alignment* protein dari gen fenD *Bacillus subtilis* (accession number: AJ011849.1) menggunakan program BLAST menghasilkan sekuen berupa protein *surfactin synthetase* dengan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Accession number: AAO03840) pada tabel 1. Dari table 1 diketahui bahwa hasil *alignment* protein pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* strain ATCC 12228 diperoleh nilai *query coverage* dan *E-value* yang masing-masing 79% dan 0,0 serta maximum identity 34,22%. Sangat penting untuk mempertimbangkan nilai *query coverage* untuk menentukan apakah hasil *alignment* signifikan. Hal ini karena hasil *alignment* seringkali hanya mencakup sebagian dari urutan selama proses BLAST. Selain itu, nilai *E-value* juga berpengaruh signifikan terhadap validitas hasil *alignment*. Nilai *E-value* yang lebih tinggi menunjukkan homologi yang lebih rendah antar urutan, dan nilai *E-value* yang lebih rendah menunjukkan homologi yang lebih tinggi antar urutan seperti nilai *E-value* 0,0 menunjukkan bahwa kedua sekuen identik, dan sangat tidak mungkin terjadi secara kebetulan. Sedangkan *maximum identity* mewakili seberapa mirip urutan query dengan urutan target. (NCBI News, 2006). Berdasarkan hasil *alignment* tersebut, bakteri *Staphylococcus epidermidis* strain ATCC 12228 diketahui memiliki gen yang terlibat dalam sintesis biosurfaktan yaitu *surfactin synthetase* dengan persentase kemiripan 34,22% dengan gen fen D dari *Bacillus subtilis* dengan panjang sebesar 2.400 asam amino (gambar 1).

Protein gen fen D dari *Bacillus subtilis* dapat sejajar dengan protein *surfactin synthetase* dari *Staphylococcus epidermidis* berdasarkan dari hasil BLAST protein karena kedua sequence tersebut memiliki kemiripan sekuence dan kemiripan fungsional. Gen fenD adalah bagian dari operon fen yang mengkodekan sintesa peptide nonribosomal (NRPS) yang terlibat dalam sintesis fengisin, sebuah lipopeptide dengan aktivitas antijamur (Théatre et al., 2021). *Surfactin synthetase* juga merupakan

suatu NRPS yang mengkatalis formasi surfaktan, lipopeptida biosurfaktan lainnya yang mengandung antimikroba (de Lima Ferreira, et al., 2022). Fengisin dan surfaktan, keduanya memiliki inti heptapeptide siklik yang terhubung dengan rantai asam lemak (Yasmin, et al., 2022).

Berdasarkan hasil BLAST protein, fen D dari *Bacillus subtilis* 168 (accession number: NP\_389985.1) memiliki % *identity* sebesar 32% dan 49% serupa dengan *surfactin synthetase* dari *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (accession number WP\_002481751.1) dengan Panjang 1.032 asam amino (Théatre et al., 2021). *Total Score* dari *alignment* adalah 1.198, yang mencerminkan kualitas *alignment*. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian yang didapat. Hasil ini menunjukkan bahwa gen fen D *surfactin synthetase* memiliki hubungan fungsional dan evolusioner eberapa derajat, meskipun mereka termasuk spesies bakteri yang berbeda dan menghasilkan lipopeptide yang berbeda. Mereka mungkin berasal dari nenek moyang yang sama atau mengalami transfer gen horizontal pada titik tertentu dalam sejarahnya (de Lima Ferreira, 2022).

Sekuen hasil *alignment* digunakan untuk mendesain primer menggunakan program primer-BLAST di situs NCBI dan menghasilkan sepuluh pasang kandidat primer gen *surfactin* yang dapat dilihat pada table 2. Berdasarkan hasil analisis kriteria primer yang diperoleh menggunakan oligoanalyzer diketahui bahwa primer 1 lebih baik dari 10 primer lainnya. Primer 1 juga mengandung Guanin dan Sitosin masing-masing sebanyak 55% yang memenuhi persyaratan. Nilai  $\Delta G$  *hairpin* primer *forward* sebesar 1,58 kcal/mol dan primer *reverse* sebesar 0,96 kcal/mol sedangkan  $\Delta G$  *self dimer* primer *forward* dan primer *reverse* masing-masing sebesar -0,96 kcal/mol. Nilai  $\Delta G$  *hairpin*, *self dimer*, dan hetero dimer ini memungkinkan primer untuk memecah struktur sekunder pengganggu pada saat proses *annealing* berlangsung (Pradnyaniti dkk., 2013; Saraswati, dkk., 2019).

Dari hasil primer BLAST pada gambar 2 diketahui bahwa pasangan desain primer terbaik terpilih (primer 1) dengan panjang primer sebesar 20 pb untuk masing-masingnya. Primer ini dapat mengamplifikasi

gen surfaktin *S.epidermidis* secara in siliko pada range area 10184-10521 pb, dengan panjang produk sebesar 357 pb.

**Tabel 1.** Hasil *alignment* gen fen D *Bacillus subtilis* dengan protein biosurfaktan (*surfactin synthetase*) bakteri *Staphylococcus epidermidis* strain ATCC 12228

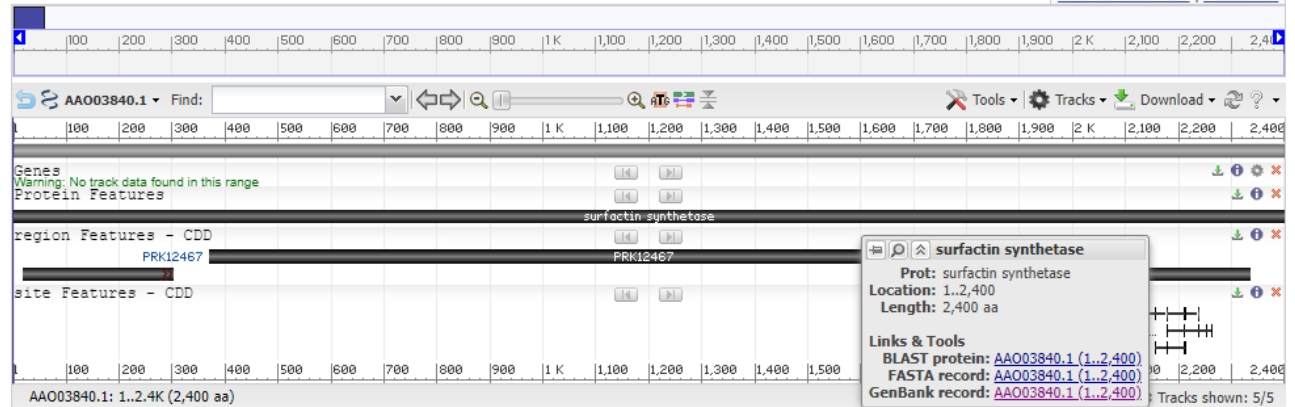
Biosurfaktan	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	% Identity
<i>Surfactin synthetase</i> (Accession Number: AAO03840.1)	924	1336	79%	0,0	34,22%

### surfactin synthetase [Staphylococcus epidermidis ATCC 12228]

GenBank: AAO03840.1

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [FASTA](#)

[Link To This View](#) | [Feedback](#)



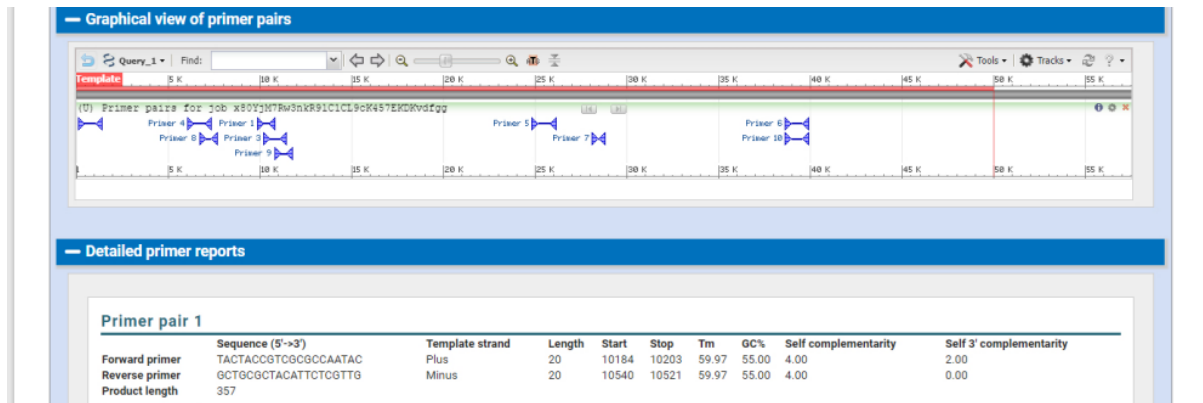
**Gambar 1.** Grafik Panjang protein *surfactin synthase* pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

**Tabel 2.** Desain primer gen surfactin bakteri *Staphylococcus epidermidis* strain ATCC 12228

	Sequence (5'-3')	BP	T <sub>m</sub> (°C)	GC (%)	Self complementary	3'self
*1F	TACTACCGTCGCGCCAATAC	20	59,97	55	4	2
*1R	GCTGCGCTAC ATTCTCGTTG	20	59,97	55	4	0
2F	GCGAGTTGGCTTAATCAGCG	20	59,97	55	5	3
2R	AAAACGAGAGCGAAGACGGT	20	59,97	50	3	3
3F	CAACGAGAATGTAGCGCAGC	20	59,97	55	4	3
3R	TGGTGTCCCGCTTCTACAAC	20	59,97	55	4	2
4F	GATGCCGATGTTGATGGTGC	20	59,97	55	2	2
4R	ACCCATGACATCCCCGACTA	20	60,03	55	5	2
5F	GCACGTGTGAAAGCGAACTT	20	59,97	50	6	3
5R	CCACGGTTAGACTGCTTGGT	20	59,97	55	3	0
6F	ATCCCGAAATTCGCGCTGTT	20	60,03	50	6	0
6R	GAGGAAGGACGCTGGATAGC	20	59,97	60	3	2
7F	AGACGGACGTCACACTGAAC	20	59,97	55	6	1
7R	TAATGCAGAACGCACGGACT	20	60,04	50	4	2
8F	TAGTCGGGGATGTCATGGGT	20	60,03	55	5	0
8R	TTCCTGCCGCACCATTTACT	20	59,96	50	5	1
9F	GTTGTAGAAGCGGGACACCA	20	59,97	55	4	0
9R	CCACATCCAGACAAGGGAC	20	60,04	50	4	0

10F	AATCCGAAATTCCGCCTGT	20	60,03	50	6	1
10R	AAACTGAGGAAGGACGCTGG	20	59,96	55	3	0

\*pasangan primer 1F dan 1R terpilih berdasarkan hasil yang menunjukkan parameter primer terbaik untuk digunakan dalam reaksi PCR selanjutnya



**Gambar 2.** Grafik pasangan primer gen surfaktin pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 serta parameter pasangan primer terpilih (primer 1).

## KESIMPULAN

Terdapat surfaktin sebagai kandungan biosurfaktan terbaik berupa surfaktin pada bakteri *S.epidermidis* ATCC 12228 dengan hasil penyejajaran signifikan nilai *e-value* 0,0, nilai *query coverage* sebesar 100% dan % *identity* sebesar 98,67%.

Pasangan desain primer terbaik terpilih dengan panjang primer sebesar 20 pb untuk masing-masingnya yaitu primer forward 5'-TACTACCGTCGCGCCAATAC-3', primer reverse 5'-GCTGCGCTACATTCTCGTTG-3'. Primer ini dapat mengamplifikasi gen surfaktin *S.epidermidis* secara in silico pada range area 10184-10521 pb, dengan panjang produk sebesar 357 pb.

## DAFTAR PUSTAKA

Ciccyliona DY, Nawfa R. 2012. Pengaruh pH Terhadap Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Lokal. *J. Sains Dan Seni Pomits* 1: 1-6.

de Lima Ferreira, J.K., de Mello Varani, A., Tótola, M.R. Almeida, M.F., Melo, D.S., Batista, C.F.S., Junior, A.C., Oliveira, K.K.P., Roesch, L.F.W., Pylro, V.S. 2022. Phylogenomic characterization and pangenomic insights into the surfactin-producing bacteria *Bacillus subtilis* strain RI4914. *Braz J Microbiol* 53, 2051–2063. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00815-0>

Elazzazy AM, Abdelmoneim TS., Almaghrabi OA. 2015. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental condition by alkali-halophilic bacteria from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Science*. V22 (4): p466-475 (DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.11.018).

Furi, T. A., and P. Coniwanti. 2012. Pengaruh Perbedaan Ukuran Partikel dari Ampas Tebu dan Konsentrasi Natrium Bisulfit (NaHSO<sub>3</sub>) pada Proses Pembuatan Surfaktan. *Jurnal Teknik Kimia No.4* 18:49 – 58 (<https://www.e-jurnal.com/2015/03/pengaruh-perbedaan-ukuran-partikel-dari.html>).

NCBI News. 2006. New Database and View Options for Nucleotide BLAST Services. *NCBI News*. Fall/Winter 2006/7 Vol. 15, No. 2. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html>)

Pradnyaniti, D., Wirajana, I., & Yowani, S.. 2013. "Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)." *Skripsi*. Universitas Udayana. Hal 124-130 (<https://ojs.unud.ac.id/index.php/jfu/article/view/7387>).

- Reningtyas, R. & Mahreni 2015. "Biosurfaktan." Eksergi, XII(2): 12–22 (<https://eprints.upnyk.ac.id/13394/>).
- Saraswati, H., Seprianto, S. & Dwi Wahyuni, F. 2019. "Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal." *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity* 3(1): 33-38 ([https://digilib.esaunggul.ac.id/public/UEU-Journal-17178-11\\_0540.pdf](https://digilib.esaunggul.ac.id/public/UEU-Journal-17178-11_0540.pdf)).
- Sari M, Afati F, Kusharyoto W. 2015. Potency of Oil Sludge Bacteria as a Producer of Biosurfactant and Antimicrobial Agents. *Pros. Semin. Nas. Masy. Biodiversitas Indones.* 1(1): 85-88 (DOI <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010113>).
- Setiani, NA., Octaviani, W., Hamdani, S., Mardiah, I. 2019. "Studies On Biosurfactant Produced using *Exiguobacterium profundum*". *Acta Biochimica Indonesiana*. Vol 2, Ed 2. Bandung: *Indonesia Society for Biochemistry and Molecular Biology*. Hal. 39 (DOI: 10.32889/actabioina.v2i2.37).
- Théatre A, Cano-Prieto C, Bartolini M, Laurin Y, Deleu M, Niehren J, Fida T, Gerbinet S, Alanjary M, Medema MH, Léonard A, Lins L, Arabolaza A, Gramajo H, Gross H and Jacques P. 2021. The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:623701. doi: 10.3389/fbioe.2021.623701
- Yamin, A. 2012. Ekstraksi Asbuton Dengan Mikroba (Isolasi Mikroba Asbuton). Bandung: *Penerbit Informatika*. Hal. 41-42. (<https://binamarga.pu.go.id/bintekjatan/repositori/system/files/1.%20Ekstraksi%20Asbuton%20dg%20Mikroba%20-%20Anwar%20Yamin.pdf>)
- Yasmin A, Aslam F and Fariq A. 2022 Genetic Evidences of Biosurfactant Production in Two *Bacillus subtilis* Strains MB415 and MB418 Isolated From Oil Contaminated Soil. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10:855762. doi: 10.3389/fbioe.2022.855762