

BIDANG ILMU*: Bioinformatika Kesehatan

**LAPORAN AKHIR TAHUN
HASIL PENELITIAN HIBAH INTERNAL**



**ANALISIS BIOINFORMATIKA GEN PENYANDI *HalichondrinB* DARI
BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS LAUT SEBAGAI
KANDIDAT ANTI KANKER**

TIM PENELITI

Seprianto, S.Pi, M.Si

(0309098702)

Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si

(0323029101)

Tahun Ke -1 dari Rencana 1 Tahun

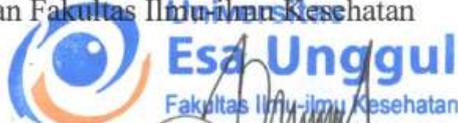
**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
FAKULTAS ILMU - ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Analisis Bioinformatika Gen Penyandi *HalichondrinB* dari Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker
2. Ketua Peneliti
- a. Nama lengkap dengan gelar : Seprianto, S.Pi, M.Si
 - b. Pangkat/Gol/NIDN : 0309098702
 - c. Jabatan Fungsional/Struktural : Asisten Ahli
 - d. Pengalaman penelitian : (terlampir dalam CV)
 - e. Program Studi/Jurusan : Bioteknologi
 - f. Fakultas : Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan
 - g. Alamat Rumah/HP : Jl. Ks Tubun Petamburan 3 Rt/Rw 001/03 No. 30 Kel. Petamburan Kec. Tanah Abang Jakarta Pusat/ 08568942269
 - i. E-mail : seprianto@esaunggul.ac.id
3. Anggota
- a. Nama lengkap : Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si
 - b. Pangkat/Gol/NIDN : Asisten Ahli/0323029101
 - c. Jabatan Fungsional : -
 - d. Program studi : Bioteknologi
 - e. Fakultas : Ilmu – Ilmu Kesehatan
4. Jumlah Tim : 2 orang
5. Lokasi Penelitian : -
6. Pelaksanaan Kegiatan : 10 bulan
7. Biaya Penelitian : Rp.25.000.000 (Dua puluh lima juta rupiah)

Jakarta, 4 November 2018

Mengetahui
Dekan Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan



(Dr. Aprillita Rina Yanti Eff., M.Biomed., Apt.)
NIK. 215020572

Ketua Peneliti

(Seprianto, S.Pi, M.Si)
NIK 217090707

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Esa Unggul



(Dr. Hasyim, SE., ME., M.Ed.)
NIK. 0201040164

RINGKASAN

SEPRIANTO, FEBRIANA DW. Analisis Bioinformatika Gen Penyandi *HalichondrinB* dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Laut sebagai Kandidat Anti Kanker

Pencarian senyawa bioaktif baru sebagai kandidat obat menjadi salah satu tujuan penting industri farmasi. Mikroba laut khususnya bakteri yang bersimbiosis dengan biota laut, menjadi sumber penting untuk mendapatkan senyawa baru dengan aktivitas farmakologis potensial. Beberapa hasil riset menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons ternyata dihasilkan oleh mikroba yang berasosiasi dengannya. Salah satu senyawa yang banyak ditemukan adalah senyawa bioaktif *Halichondrin B*. *Halichondrin B* merupakan senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada spons laut spesies *Halichondria* sp yang memiliki efek antitumor yang kuat secara *in vivo* terutama untuk melanoma dan leukemia. Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan kandidat primer yang baik dalam mengaplifikasi gen penyandi senyawa *HalichondrinB* dari spons laut *Halichondria* sp. Analisis bioinformatika yang dilakukan dalam mendesain primer *HalichondrinB*, sekuen gen tersebut diperoleh dari *GeneBank* dengan pendekatan gen yang sama yang telah dipublikasikan oleh penelitian sebelumnya. Analisis lebih lanjut menggunakan beberapa perangkat lunak seperti, BLAST, *Bioedit*, *Sequence Alignment*, *Primer 3Plus* dan primer BLAST pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Konstruksi filogenetik spesies *Halichondria* sp menggunakan software MEGA 7. Sepuluh kandidat primer berhasil diperoleh berdasarkan sekuen gen analog *Halichondrin B* yang disejajarkan dengan sekuen genom *Halichondria okadai* dan dipilih satu primer yang dapat mewakili sekuen gen *HalichondrinB* dengan panjang produk 817 bp dengan sekuen primer *forward* HalF 5'-ATTGCAGCCGATTGCAGATG-3' dan primer *reverse* HalR 5'-AGGCACTAGCACCACAAAGG-3'. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kemudahan dalam mengskrinng senyawa bioaktif *HalichondrinB* sebagai kandidat anti kanker pada bakteri simbion serta menentukan sekuen DNA yang belum diketahui yang berfungsi untuk sintesis gen *Halichondrin B* yang ditargetkan.

Kata kunci: Gen *Halichondrin B*, Perangkat lunak, Bioinformatika, Desain primer

PRAKARTA

Puji dan syukur penulis sampaikan kepada Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul “Analisis Bioinformatika Gen Penyandi *Halichondrin B* dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Laut sebagai Kandidat Anti Kanker”. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioinformatika dan Biologi Molekuler Laboratorium Terpadu Fakultas Ilmu – Ilmu Kesehatan Universitas Esa Unggul.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Ibu Febriana selaku peneliti kedua dalam penelitian ini yang telah banyak membantu baik pemikiran ataupun tenaga serta kepada semua pihak yang terlibat atas segala bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian ini. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan ini. Penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang bersifat membangun dan semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Jakarta, November 2018

Seprianto

DAFTAR ISI

Isi	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
PRAKARTA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan dan Sasaran.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Bioinformatika	4
2.2. Konstruksi Pohon Filogenetik	4
2.3. Bakteri yang Berasosiasi dengan Biota Laut	5
2.4. Senyawa Bioaktif <i>Halichondrin B</i> sebagai Anti Kanker.....	6
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	4
IV. METODE PENELITIAN	8
4.1. Waktu dan Tempat	8
4.2. Bahan dan Alat	8
4.3. Pembuatan Degenerate Primer Half dan HalR	8
4.4. Deteksi Gen <i>Halichondrin B</i> dengan Degenerate Primer.....	9
V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	10
5.1. Hasil dan Pembahasan	10
5.2. Hasil Luaran Penelitian.....	18
VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	19
VII. KESIMPULAN DAN SARAN	20
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sepuluh pasang kandidat primer untuk amplifikasi gen <i>HalichondrinB</i>	14

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil pensejajaran sekuen analog <i>HalichondrinB</i>	10
2. Anotasi gen <i>HalichondrinB</i> pada genom mitokondria <i>H.okadai</i>	11
3. Anotasi sekuen genom mitokondria <i>H.okadai</i> dengan software UGENE.....	11
4. Sekuen CDS sebagai prediksi gen <i>HalichondrinB</i>	12
5. Posisi relatif pasangan primer terhadap sekuen CDS <i>HalichondrinB</i>	13
6. Hasil PCR in silico primer 1 dengan software UGENE	15
7. Hasil PCR in silico primer 2 dengan software UGENE.....	16
8. Prediksi struktur protein <i>HalichondrinB</i>	17
9. Pohon filogenetik <i>Halichondria okadai</i> dengan beberapa spesies spons	18

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Curikulum Vitae peneliti.....	25

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Pencarian senyawa bioaktif baru sebagai kandidat obat menjadi salah satu tujuan penting industri farmasi. Berbagai penelitian telah membuktikan hipotesa bahwa produksi senyawa metabolit sekunder oleh suatu organisme tidak bersifat acak, namun sangat dipengaruhi oleh *niche* ekologis (habitat spesifik) (Holler et al, 2000). Dengan alasan tersebut, banyak peneliti di dunia menjadi lebih tertarik untuk meneliti biota laut dibandingkan organisme darat yang telah lama di eksplorasi dalam upaya untuk mendapatkan senyawa bioaktif baru (Schulz et al, 2008).

Mikroba laut khususnya bakteri yang bersimbiosis dengan biota laut, menjadi sumber penting untuk mendapatkan senyawa baru dengan aktivitas farmakologis potensial (Kjer et al, 2010). Beberapa hasil riset menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh biota laut ternyata dihasilkan oleh mikroba yang berasosiasi dengannya (Zhang dan Son, 2007). Kondisi lingkungan laut yang berbeda dan lebih bervariasi dibanding dengan lingkungan teresterial, ternyata mempengaruhi karakteristik biokimia yang dihasilkan oleh biota laut termasuk senyawa bioaktif sebagai kandidat antikanker, antitumor, dan antifungi yang sangat prospek dikembangkan dalam dunia industri obat - obatan.

Penapisan senyawa bioaktif dari alam secara konvensional dapat dilakukan dengan serangkaian uji dan kultivasi mikroba menjadi lebih tidak efisien karena menghabiskan biaya dan tenaga untuk membuktikan senyawa tersebut memiliki potensial dalam hal yang menjadi tujuan dalam penelitian, sehingga memerlukan waktu yang lama. Metode yang berkembang saat ini dalam melakukan penapisan terhadap kandidat-kandidat mikroorganisme yang memiliki potensial dalam menghasilkan senyawa bioaktif dengan pendekatan secara molekular yaitu mencari gen penyandi *Halichondrin B* sebagai senyawa bioaktif antikanker dari bakteri yang bersimbiosis dengan biota laut dengan analisis bioinformatika. Senyawa *Halichondrin B* dapat menghambat pertumbuhan mikrotubulus sel kanker payudara karena mampu membentuk struktur analog keton makrosiklik eribulin mesylate yang digunakan sebagai obat kanker payudara (*breast cancer*) (Swami et al, 2015)

Saat ini bioinformatika sangat mudah dilakukan karena sudah bisa diakses melalui sistem jaringan *World Wide Web* secara gratis di internet. Beberapa *website* yang penting antara lain adalah <http://www.ebi.ac.uk> dari European Bioinformatics Institute (EBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dari National Center for Biotechnology Information (NCBI),

serta <http://www.ddbj.nig.ac.jp> dari DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Ketiga *website* tersebut saling berintegrasi dalam menggabungkan, memaparkan, maupun memperbaiki informasi tentang sekuen DNA atau protein dari suatu organisme (Claverie dan Notredame, 2003)

Desain primer merupakan bagian dari bioinformatika yang menjadi faktor yang paling penting/langkah-langkah menentukan sekuen DNA yang belum diketahui. Berbagai program bioinformatika yang tersedia untuk pemilihan pasangan primer dari urutan template. Program kebanyakan untuk desain primer PCR mencerminkan peran sentral PCR dalam biologi molekuler modern. Desain Primer merupakan salah satu bahan yang digunakan dalam proses perbanyakan untai DNA dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction*

Primer adalah oligonukleotida spesifik yang komplemen dengan daerah yang ditentukan pada DNA target sebagai tempat dimulainya sintesis DNA baru dengan metode PCR (Glick dan Pasternak, 2003). Untuk mendapatkan daerah tertentu pada DNA target diperlukan desain primer *forward* dan *reverse* dari daerah tersebut. Khusus untuk primer *reverse* diperoleh dari sekuen antisensnya. Jadi nukleotida yang didapat dari sekuen ujung 3 daerah DNA target merupakan komplemen dari sekuen DNA baru kemudian dibalik. Disain primer spesifik merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi DNA dengan PCR. Komposisi, ukuran, dan homolog primer terhadap DNA target harus ditentukan dengan baik agar diperoleh produk amplifikasi yang diinginkan saat melakukan PCR.

Penelitian bioinformatika berbasis web ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi terhadap bakteri simbion pada biota laut yang potensial menghasilkan senyawa bioaktif sebagai antikanker dengan menggunakan potongan sekuen DNA yang menyandi gen senyawa aktif sebagai kandidat primer yang baik dalam mengamplifikasi gen tersebut. Analisis yang dilakukan adalah untuk mencari tahu apakah sekuen tersebut telah ada di Gene Bank atau merupakan strain baru khas Indonesia yang belum terpublikasi. Diharapkan hasil penelitian ini dapat membantu memberikan kemudahan dalam melakukan penapisan serta berguna dalam penelitian lanjutan untuk menentukan karakteristik molekular bakteri terpilih dan senyawa bioaktif yang dihasilkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bioinformatika

Bioinformatika didefinisikan sebagai cabang komputasi dari biologi molekuler yang merupakan teknologi pengumpulan, penyimpanan, analisa, interpretasi, penyebaran, dan aplikasi dari informasi biologi. Bioinformatika menggunakan program komputer maupun *website* untuk analisa data biologi dan penyimpanan sejumlah data biologiyang dihasilkan oleh proyek genom. Bioinformatika banyak berhubungan dengan sekuen nukleotida termasuk desain primer, struktur, fungsi, perbandingan seluruh genom dan gen, struktur tiga dimensi protein, dan manajemen data. Melalui bioinformatik kita juga dapat melakukan berbagai desain eksperimen untuk mengetahui penyakit manusia dan pembuatan peta genom (Claverie dan Notredame, 2003).

Kemajuan teknik biologi molekuler dalam mengungkap sekuens biologis dari protein (sejak awal 1950-an) dan asam nukleat (sejak 1960-an) mengawali perkembangan basis data dan teknik analisis sekuens biologis. Basis data sekuens protein mulai dikembangkan pada tahun 1960-an di Amerika Serikat, sementara basis data sekuens DNA dikembangkan pada akhir 1970-an di Amerika Serikat dan Jerman di *European Molecular Biology Laboratory*. Penemuan teknik sekuensing DNA yang lebih cepat pada pertengahan 1970-an menjadi landasan terjadinya ledakan jumlah sekuens DNA yang berhasil diungkapkan pada 1980-an dan 1990-an, menjadi salah satu pembuka jalan bagi proyek-proyek pemetaan genom dari beberapa spesies. Akibatnya terjadi peningkatan kebutuhan akan pengelolaan dan analisis sekuens, dan melahirkan keilmuan baru bioinformatika (Krane dan Raymer, 2003).

Perkembangan internet juga mendukung berkembangnya bioinformatika. Basis data bioinformatika yang terhubung melalui Internet memudahkan para ilmuwan dan peneliti mengumpulkan hasil sekuensing ke dalam basis data tersebut atau memperoleh data sekuens biologis sebagai bahan penelitian. Selain itu, pengembangan dan penemuan program terbaru dari aplikasi bioinformatika melalui Internet memudahkan para peneliti mengakses program-program tersebut dan kemudian memudahkan dalam penerapan program tersebut dan mengembangkannya (Mount, 2001).

2.2 Kontruksi Pohon Filogenetik

Filogenetik merupakan kajian mengenai hubungan evolusi diantara organisme atau gen dari segi taksonomi, dianalisis dengan menggunakan kombinasi antara biologi, molekuler

dan teknik statistik. Dasar klasifikasi tersebut adalah persamaan dan perbedaan sifat morfologi, anatomi dan molekuler. Sistem tersebut mencerminkan urutan perkembangan serta jauh dekatnya kekerabatan antartakson, serta menggambarkan persamaan dan perbedaan sifat berupa morfologi dan anatomi. Taksonomi filogenetik merupakan pengelompokan spesies atau jenis baru dengan cara analisis molekuler dan morfologi. Klasifikasi sistem filogenetik disusun berdasarkan persamaan fenotip yang mengacu pada sifat-sifat bentuk luar, faal, tingkah laku yang dapat diamati, dan pewarisan keturunan yang mengacu pada hubungan evolusioner jenis nenek moyang hingga cabang-cabang keturunannya (Dharmayanti, 2011).

Filogenetik berdasarkan perbandingan genom dengan pemisahan ke dalam hubungan evolusioner (*clades*), kemungkinan akan menggantikan phenotypical (*phenetic*) taksonomi. Pengelompokan organisme terdiri dari *phenetic* sistem yaitu pengelompokan organisme berdasarkan kesamaan sifat karakteristik fenotipik (fisik dan kimia). Pengelompokan *phenetic*, mungkin atau tidak mungkin berkorelasi dengan hubungan evolusi. Filogenetik sistem merupakan pengelompokan organisme berdasarkan pada kesamaan warisan evolusi. Teknik sekuensing DNA dan RNA dianggap memberikan filogeni paling berarti untuk menentukan nenek moyang dan evolusi yang terjadi. Oleh karena itu tujuan dari sistematika ini adalah untuk menciptakan suatu klasifikasi yang mencerminkan sejarah evolusi organisme. Maka, diperlukan pengelompokan spesies ke dalam taksa :

1. Monofiletik yaitu jika nenek moyang tunggalnya menghasilkan semua spesies turunan yang berasal dari takson tersebut, bukan spesies pada takson lain.
2. Polifiletik yaitu jika anggotanya diturunkan dari dua atau lebih bentuk nenek moyang yang tidak sama bagi semua anggotanya.
3. Parafiletik yaitu jika takson itu tidak meliputi spesies yang memiliki nenek moyang yang sama yang menurunkan spesies yang termasuk dalam takson tersebut. (Kumar *et al*, 2016)

2.3 Bakteri yang berasosiasi dengan Biota Laut (Bakteri Simbion)

Laut memiliki biodiversitas lebih besar dibandingkan dengan tanah, seperti diketahui jenis mikroorganismenya juga akan bervariasi dibandingkan mikroba tanah (Das *et al*, 2006). Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki bentangan laut yang luas, yaitu kurang lebih 3,1 juta km² atau hampir dua kali lipat dibanding luas daratan. Karakteristik laut yang bermacam-macam mengidentifikasi biodiversitas hayati yang sangat besar, khususnya biodiversitas mikroorganisme laut. Namun demikian potensi ini belum banyak dimanfaatkan. Spons merupakan salah satu biota laut sebagai penghasil produk alami yang menghasilkan

senyawa-senyawa baru dengan struktur unik dan memiliki aktivitas farmakologis. Hampir 5.000 senyawa telah berhasil diisolasi dari spons dengan berbagai aktivitas seperti antimikroba, antijamur, antivirus dan antikanker (Holler et al, 2000). Spons memiliki potensi dijadikan bahan eksplorasi pencarian senyawa baru antikanker karena menghasilkan senyawa bioaktif antiviral maupun senyawa sitotoksik (Garson, 1994).

Interaksi biota laut dalam suatu ekosistem berjalan sangat kompleks dan dinamis. Salah satu upaya biota laut untuk mempertahankan hidupnya dengan memproduksi senyawa metabolit sekunder yang berguna sebagai perisai untuk melindungi diri dari musuh. Senyawa metabolit sekunder tersebut umumnya bermanfaat bagi manusia sebagai senyawa aktif yang bernilai tinggi. Dalam upaya pencarian produk alami laut untuk bahan obat, spons menjadi filum yang paling banyak dieksplorasi (Nursid et al, 2005). Terdapat sekitar 7000 jenis spons yang telah dipublikasi dan berdasarkan perkiraan sekitar 15.000 jenis hidup diperairan laut dan danau. Suatu wilayah yang terletak di antara Indonesia dan Australia merupakan daerah yang paling banyak ditemukan jenis spons *Demospongiae*. Sekitar 830 jenis spons yang telah diidentifikasi hidup tersebar di wilayah laut Indonesia (Sumaryanto et al, 2005)

2.4 Senyawa Bioaktif *Halichondrin B* Sebagai Kandidat Anti Kanker

Pengobatan kanker secara konvensional sampai sekarang masih dilakukan melalui pembedahan, radiasi dan kemoterapi (Leica dan Apantaku, 2002). Pembedahan berhasil pada beberapa tumor yang telah berkembang, tetapi sulit mengobati pada stadium awal metastasis. Pengobatan dengan radiasi mampu membunuh tumor lokal namun radiasi juga akan membunuh sel normal disekitarnya. Sedangkan penyembuhan dengan kemoterapi pada umumnya belum memberikan hasil yang memuaskan terutama untuk kanker yang telah mengalami metastasis, karena selektivitas dan spesifisitas obat kanker sangat rendah bahkan dapat menimbulkan efek samping yang serius (Kintoko et al, 2008). Sebagian besar obat-obatan sintesis tidak hanya membunuh sel kanker, tetapi juga membunuh sel normal (Cragget al, 1997). Pengobatan secara medis juga memerlukan biaya yang tinggi. Oleh karena itu, diperlukan obat-obatan alternatif dari bahan alam. Senyawa bahan alam yang digunakan dengan tepat akan menghasilkan efektivitas pengobatan yang tinggi dan efek samping yang rendah karena obat dari bahan alam bersifat alami sehingga dapat dimetabolisme oleh tubuh. Agen antikanker dari bahan alam mampu mengobati pada sumber penyakit dengan memperbaiki sel-sel, jaringan, dan organ tubuh yang rusak serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Kamuhabwa et al., 2000).

Halichondrin B merupakan senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada spons laut yang memiliki efek antitumor yang kuat secara *in vivo* terutama untuk melanoma dan leukemia. Tikus yang diobati dengan ekstrak senyawa aktif *Halichondrin B* dengan leukemia B-16 atau leukemia P388 menunjukkan peningkatan harapan hidup sebesar 30% dibandingkan tahun sebelumnya. Secara kimiawi senyawa *halichondrin B* analog (E7389) Disintesis saat ini dalam uji coba klinis fase I oleh perusahaan Jepang Eisai di Indonesia bersama dengan *American National Cancer Institute*(Cragg and Newman, 2004). *Isohomohalichondrin B* diperoleh dari alam dan budidaya laut. Pengujian lebih lanjut tentang uji klinis senyawa *halichondrin B* atau *isohomohalichondrin B* berhasil dijadikan sebagai komersial dalam obat-obatan.

Penelitian sebelumnya tentang senyawa aktif *Halichondrin B* dihasilkan oleh biota laut dari spons genus *Halichonasp.* Alluri (2012) melaporkan ekstrak metanol dan diklorometana yang berasal dari spons spesies *Halicon* lunak dapat menghambat kelangsungan hidup sel HeLa. *Halichondrin B* yang diisolasi dari spons *Halichondria okadai* terbukti aktif melawan leukemia (Faulkner, 2002)



BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan dan sasaran

Penelitian ini memiliki tujuan antara lain : 1) untuk mendapatkan kandidat primer yang tepat dalam mendeteksi gen penyandi *Halichondrin B* dari bakteri yang berasosiasi dengan biota laut. 2) mengetahui cara mendesain primer spesifik gen dan spesifik species berdasarkan sekuens yang telah didapatkan dari website Gene Bank, dan (3) mengetahui cara membuat pohon filogenetik dan multiple alignment dari kekerabatan terdekat

3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan pada penelitian lanjutan sebagai primer untuk mengskrinings gen *HalicondrinB* dari spons *Halichondria* sp secara molekuler

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli –November 2018 bertempat di Laboratorium Terpadu FIKES Universitas Esa Unggul

4.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Komputer yang telah terprogram dengan software bioinformatika seperti Bioedit, Clustal W, SnepGene, MEGA 7 dan beberapa software yang terhubung dengan internet. Alat intrumen laboratorium seperti *thermocycler* PCR, elektroforesis chamber, Gel Doc, mikrosentrifus, mikropipet dan mikrotub. Sedangkan bahan yang digunakan satu pasang primer gen penyandi *Halichondrin B* (HalF dan HalR), DNA spons laut (penelitian sebelumnya), PCR mastermixs, Aquabides, Agarose dan TAE buffer 1x.

4.3. Pembuatan Gegenerate Primer *HalF* dan *HalR*

1. Penelusuran sekuen gen penyandi *Halichondrin B* pada situs NCBI

Sekuen gen penyandi *HalichondrinB* didapatkan dari GenBank (www.nlm.nih.gov). Sekuen yang digunakan hasil dari pensejajaran gen yang memiliki kemiripan sekuens dari spesien lain. Proses pensejajaran dilakukan dengan perangkat lunak Bioedit dan UGENE.

2. Analisis sekuens gen *Halichondrin B*

Sekuen gen *Halichondrin B* pada bakteri simbiosis dengan kerabat terdekat, dengan menggunakan *toolsBLAST* (*Basic Local Alignment Search Tools*) untuk menemukan dari organisme apa sekuens itu berasal, dan apa fungsinya serta homologi terbesar dengan sekuens lain di database Genbank yang kekerabatannya dekat.

3. Anotasi Gen – gen fungsional dalam sekuen genom mitokondria *Halichondria okadae* sebagai model dalam menentukan daerah CDS menggunakan software UGENE
4. Analisis desain primer dengan menggunakan software Primer BLAST dari sekuens gen yang memiliki similaritas tinggi (pada daerah basa domain cds) dengan keunikan basa untuk dibuat desain primer dan melakukan PCR insilico

untuk menentukan daerah penempelan primer pada template DNA, Untuk menghindari hairpin pilih sekuen hasil desain primer software *PerlPrimer*.

5. Analisis struktur 3D

Analisis struktur 3D senyawa *Halichondrin B* dengan menggunakan situs Protein Data Bank, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/> menu PSIPRED dan 3D protein menggunakan situs <http://www.pdb.org> menu Swiss Model

6. Kontruksi pohon filogenetik *Halichondria* sp dengan beberapa kerabat terdekat spons laut dengan menggunakan software MEGA6 (Tamura et al, 2013)

7. Primer siap digunakan untuk amplifikasi Gen *HalichondrinB* dari konsorsia bakteri spons *Halichondria ssp*

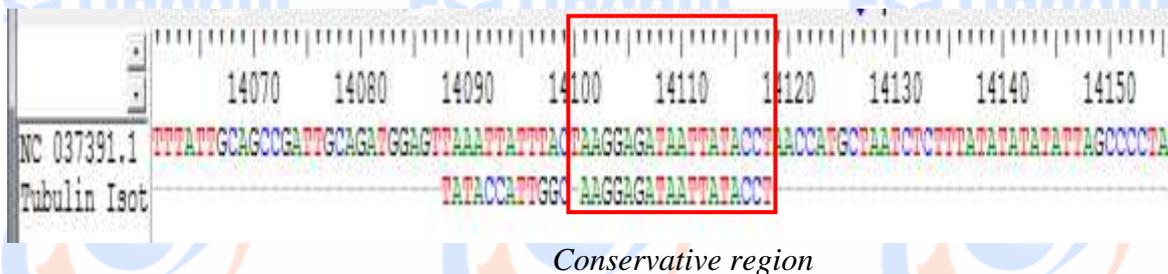
BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil dan Pembahasan

5.1.1. Pencarian Database Gen *Halichondrin*B di GenBank

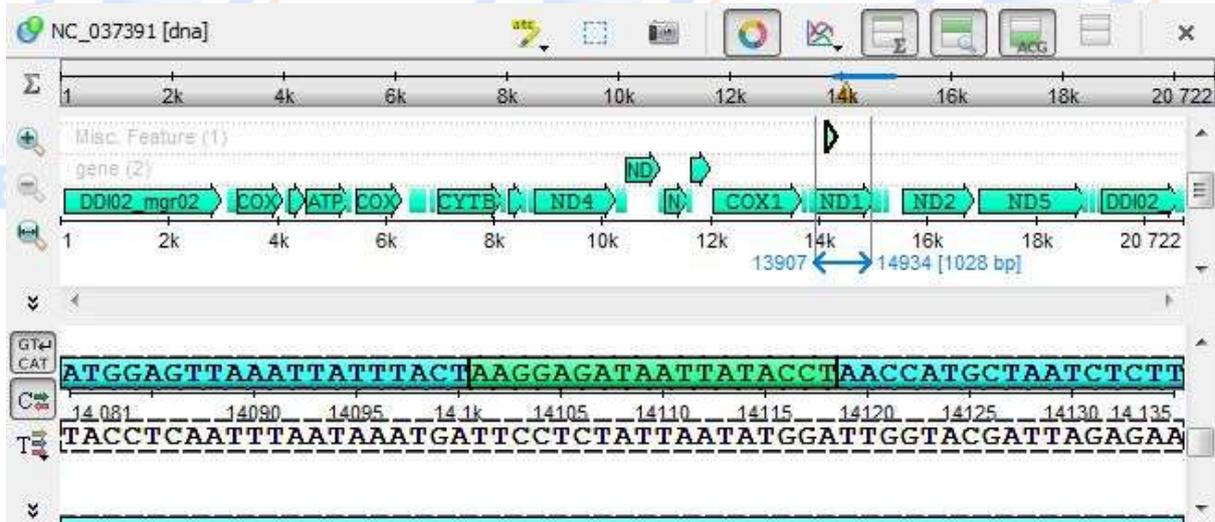
Senyawa *Halichondrin* B merupakan senyawa makrolida polieter yang dihasilkan oleh spons *Halicondria Okadai*. Spons ini umumnya hidup didaerah *tidal zone* diperairan Poso Peninsula, Jepang (Abe et al, 2014) dan di perairan laut Korea (Kim et al, 2017). Senyawa ini sangat memiliki efek antitumor yang kuat secara *in vivo* terutama untuk melanoma dan leukemia. Penelurusan sekuen gen *Halichondrin* B yang ada di GenBank melalui situs NCBI menggunakan sekuen gen analog *Halichondrin* B yang digunakan untuk mengskrinng *Tubulin isotype* pada pasien terapi kanker leukimia (Agoulnik et al, 2008). Sekuen gen analog *Halichondrin* B ini hanya berukuran 32 bp nukleotida dengan urutan sekuens TATACCATTGGCAAGGAGATAATTATACCT (DM024987.1). Sekuen utuh dari gen *Halichondrin* B sendiri belum pernah dipublikasikan sebelumnya, sehingga dalam pencariannya tidak ditemukan sekuen yang sama atau identik. Prediksi sekuen gen *Halichondrin* B berdasarkan hasil pensejajaran gen *Halichondrin*B analog dengan sekuen genom *Halichondria okadai*(NC_037391.1) menggunakan software *Bioedit*(Gambar 1).



Gambar 1. Hasil pensejajaran sekuen *Halichondrin* B analog dengan sekuen genom *Halichondria okadai*

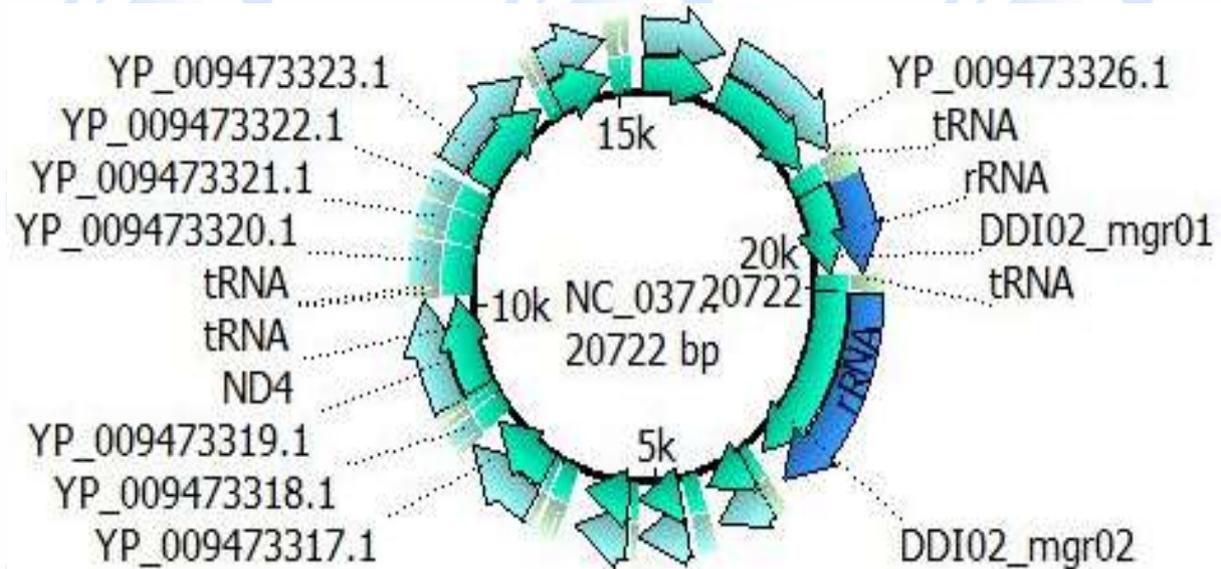
Hasil pensejajaran dari Gambar 1 menunjukkan daerah lestari (konservatif) dari kedua sekuen tersebut terletak pada basa ke 14100 sampai basa 14118 dari sekuen genom mitokondria spons *Halichondria okadai*. Hasil ini juga diperkuat dengan letak dari sekuen konservatif tersebut berada pada daerah sekuen CDS (*coding sequence*) genom mikondria *Halichondria okadai* yang terletak pada urutan basa 13924 sampai 14925 (Kim et al, 2017). Hasil anotasi gen fungsional dari genom mitokondria menggunakan software UGENE dengan sekuen analog gen *Halichondrin*B menunjukkan bahwa gen ini merupakan bagian dari cluster

gen MT-ND1 (*Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1*) sebagai gen yang menginduksi pembentukan protein NADH dehydrogenase (Gambar 2).



Gambar 2. Anotasi Gen *HalinchondrinB* pada genom mitokondria *Halichondria okadai*

Hasil anotasi gen fungsioal dalam genom mitokondria *Halichondria okadai* menggunakan software UGENE (Gambar 3)



Gambar 3. Anotasi sekuen genom mitokondria *Halichondria okadai*

Gambar 3 menunjukkan daerah CDS tersebar pada seluruh genom (tanda panah). Sekuen CDS atau ORF (*open reading frame*) merupakan bagian gen yang mengkode asam amino dalam menghasilkan protein. Dipilih sekuen basa daerah CDS karena memiliki sekuen homolog dengan spesies lainnya namun memiliki basa yang unik. Sekuen ini juga sangat penting dalam menentukan letak gen – gen fungsional dalam sebuah genom (Furuno et al,

2003). Prediksi sekuen CDS sebagai gen penyandi *HalichondrinB* untuk mendapatkan kandidat primer yang tepat untuk mengamplifikasi gen tersebut secara utuh (Gambar 4).

```

TAGGGGGTGTGGTAAAACATGGGTGATAAGATTAATAAAAAATATTAACATATATTAGT
13 907      13915      13920      13925      13930      13935      13940      13945      13950      13955      13 961
ATCCCCACACCATTCTCTACCACATTTCTAATTATTTTTTATAATTGATATAAATCA

CCCTTTACTTATTTCAATAGCATATTTAACATTAGCGGAACGAAAAGTATTAGGT
13 962      13970      13975      13980      13985      13990      13995      14k      14005      14010      14 016
GGGAAATGAATAAAGTTATCGTATAAATTGTAATCGCCTTGCTTTTCATAAATCCA

TATATACAATGTAGAAAAGGTCCAAATGTGGTAGGTATATACGGTTTATTGTCAGC
14 017      14025      14030      14035      14040      14045      14050      14055      14060      14065      14 071
ATATATGTTACATCTTTTCCAGGTTTACACCATTCCATATATGCCAAATAACGTCG

CGAATTGCAGATGGAGTTAAATTAATTACTAAGGAGATAAATTATACCTAACCATGC
14 072      14080      14085      14090      14095      14.1k      14105      14110      14115      14120      14 126
GCTAACGTCCTACCTCAATTTAATAAATGATTCTCTATTAAATATGGATTGGTACG

TAATCTCTTTATATATATATTAGCCCTATTTTGTCTGTTAACATTGCTTTTATA
14 127      14135      14140      14145      14150      14155      14160      14165      14170      14175      14 181
ATTAGAGAAATATATATATAAATCGGGGATAAAAACAGCAATTGTAACAGAAAATAT

CGGTGGGGGGSTAATACCTTATAGTGAGGGGTGTAGTGTAAAGTGATTAGGTATTG
14 182      14190      14195      14.2k      14205      14210      14215      14220      14225      14230      14 236
CGCACCCCCATTATGGAATATCACTCCACATCACAAATTCACATAAATCCATAAC

GGGTCTTTTATTTATTTGCCGTTTCTTCGATTAGTGTATTATGCCGATATTAATGTC
14 237      14245      14250      14255      14260      14265      14270      14275      14280      14285      14 291
CCCAAGAAATAAATAAACGGCAAAGAAGCTAATCACAAATACGGCTATAAATTACAG

GGGATGAGGCAGTAATTCCTAAGTATGCTTTTTTTAGGGGGCGATAAAGGGCAGCAGCC
14 292      14.3k      14305      14310      14315      14320      14325      14330      14335      14340      14 346
CCCTACTCCGTCATTAAGATTTCATACGAAAAAATCCCCGCTATTCCCGTCGTCGC

CAAATGATAAGCTACGAGGTGCTTATTGGGCTAATAATCATTCTGTGGTTTTAT
14 347      14355      14360      14365      14370      14375      14380      14385      14390      14395      14 401
GTTTACTATTCGATGCTCCACAGATAACCCGATTATTAGTAAAGACACCAAATA

GTGTTGGTTCTTTAAATTTAAGCCAAATAGTTTTAACTCAGACTATGGTATGGTT
14 402      14410      14415      14420      14425      14430      14435      14440      14445      14450      14 456
CACAAACCAAGAAATTTAAATTCGGTTTTATCAAATTTGAGTCTGTATACCACAA

TATTTTACCATTGTTTCTTATTGCTTTCATGTTTTTTGTTTTCTGCTTTAGCAGAA
14 457      14465      14470      14475      14480      14485      14490      14495      14.5k      14505      14 511
ATAAAATGGTAACAAGGATAACGGGAAGTACAAAAAACAAAGACGAAATCGTCTT

ACAAACAGAGTGCCTTTTTGATTTAACAGAAAGGGGAATCAGAATTAGTATCGGGGT
14 512      14520      14525      14530      14535      14540      14545      14550      14555      14560      14 566
TGTTTTGTCTCACGGAAAACATAAATTTGTCTTCCCCTTAGTCTTAATCATAGCCCCA

TTAATGTAGAGTATTCAAGTATGTCATTGCTTTGTTCTTTTTTAGCGGAGTATTG
14 567      14575      14580      14585      14590      14595      14.6k      14605      14610      14615      14 621
AATTACATCTCATAAGTTCATACAGTAAACGAACAAAGAAAAATCGCCTCATAAC

TCATATAAATTTTGATGCTGCTCTTTGGGGTTCTTTTTATTTTTTTGGGGGATGATTG
14 622      14630      14635      14640      14645      14650      14655      14660      14665      14670      14 676
AGTATATTAAAAACACAGACAGAAAACCCCAAGAAATAAAAAACCCCTACTAACC

TGCCCATTTGAGGGCCCTTTTTAGTTATATCTTATTAGACGGAAATTGAGCACATT
14 677      14685      14690      14695      14.7k      14705      14710      14715      14720      14725      14 731
ACGGGTAAACTCCCGGAAAAATCAATATAGAATAAATCTGCCTTTAACTCGTGTAA

TTTTGGTGATTAGGGCGGGAAAGTGGTTTTTTCTTATTTATTTGTTTATTTGAATAAC
14 732      14740      14745      14750      14755      14760      14765      14770      14775      14780      14 786
AAACCACTAATCCGCCCTTTCACCAAAAAGAATAAATAAACAAATAAACTTATTC

AGGGACTTACCCTAGAATAAGGTACGACCAACTAATGGCTCTATTGTGAAAATCT
14 787      14795      14.8k      14805      14810      14815      14820      14825      14830      14835      14 841
TCCCTGAATGGGATCTTATTCCATGCTGGTTGATTACCGAGATAACACTTTTAGA

TATTTACCCTTAAGCTTACCCTTTGTGGTGGCTAGTGCCTGGGCTTGTAATAGGTT
14 842      14850      14855      14860      14865      14870      14875      14880      14885      14890      14 896
ATAAATGGGAATTTCGAATCGGAAACACCACGATCACGGACCCGAACATTATCCAA

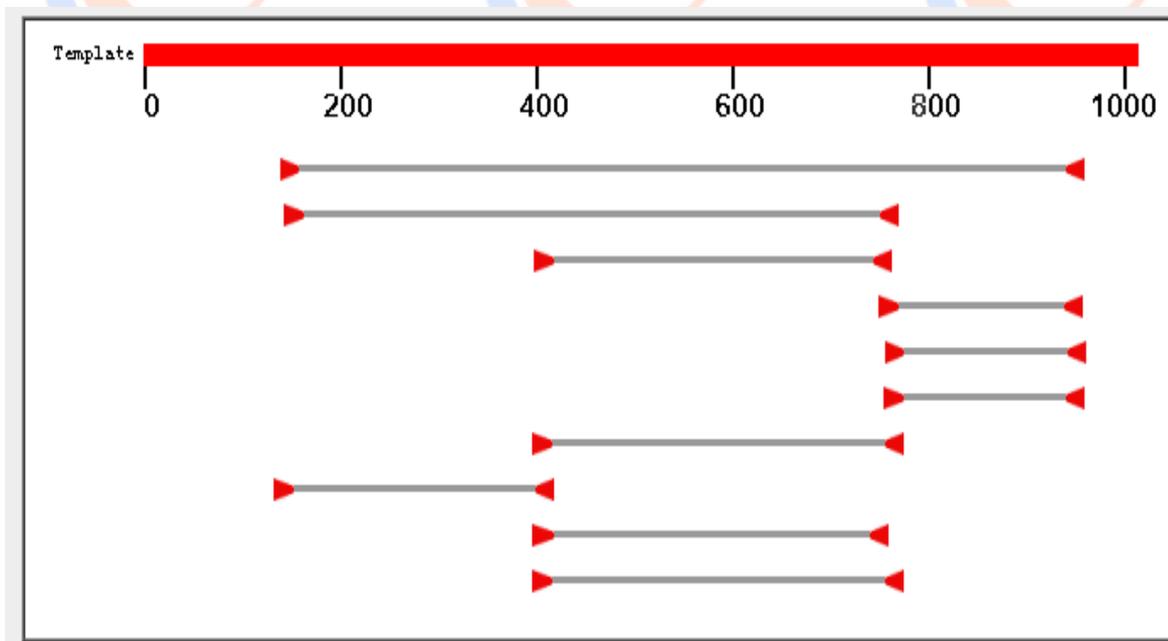
TTGATATATTACCGCCCTTTGGGTTATAAATCTAGGTAT
14 897      14905      14910      14915      14920      14925      14 934
AACTATATAATGGCGGGAAACCAATATTAGATCCATA
    
```

Gambar 4. Sekuen CDS sebagai prediksi Gen *Halichondrin B*

Gambar 4 menunjukkan sekuen CDS diawali dengan kodon awal dengan kode ATG dengan panjang nukleotida 1010 pasang basa dengan total 330 asam amino. Dalam sekuen asam amino start kodon diawali dengan asam amino metionin (UAG). Hal ini dapat memberikan informasi gen utuh dalam sebuah genom, indikasi ini harus dibuktikan dengan mengekspresikan gen tersebut kedalam *Escherichia coli* BL21 sebagai strain yang umum digunakan pada tingkat ekspresi gen. Pembuktian gen penyandi *HalichondrinB* pada tingkat molekuler lebih memudahkan dalam proses penapisan (skrining) terhadap kandidat spons laut yang potensial menghasilkan senyawa *HalichondrinB* terutama dari genus *Holichondria* spp.

5.1.2. Desain Primer Gen penyandi *HalichondrinB*

Primer merupakan salah satu bagian terpenting dalam reaksi PCR, *Polymerase Chain Reaction* merupakan teknik perbanyakan sample DNA secara in vitro. Sekuen dasar dalam mendesain primer yang dapat mengaplifikasi gen *HalichondrinB* berdasarkan sekuen CDS yang terdapat dalam sekuen genom spons *Halichondria ocadai*. Hasil desain primer menggunakan primer BLAST pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Terdapat 10 pasang primer yang memiliki daerah target masing – masing dengan ukuran yang berbeda -beda. Posisi pasang primer *forward* dan *reverse* dapat dilihat pada Gambar 5



Gambar 5. Posisi relatif pasangan – pasangan primer terhadap gen *HalichondrinB*

Gambar 5 menunjukkan daerah amplifikasi masing – masing primer pada template DNA sekuen. Selain itu, terbentuknya ikatan yang terlalu kuat antar template DNA dan primer akan mengakibatkan produk PCR yang dihasilkan rendah. Panjang primer berkisar 18-

30 basa, didasarkan pada pertimbangan kombinasi acak yang mungkin ditemukan pada satu urutan genom. Untuk lebih jelas detail sekuen masing – masing primer, posisi relatif primer, nilai Tm, konten GC dan karakteristik lainnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sepuluh pasang kandidat primer untuk aplikasi gen *HalichondrinB*

Primer		Start	BP	(Tm) ^o C	GC	3'Self	Nukleotida	Product Size
1	Forward	141	20	55.34	50.00	2	ATTGCAGCCGATTGCAGATG	817
	Reverse	957	20	54.20	55.00	0	AGGCACTAGCACCACAAAGG	
2	Forward	145	20	55.66	55.00	2	CAGCCGATTGCAGATGGAGT	624
	Reverse	768	20	52.77	55.00	2	GCCCTCAAATGGGCACAATC	
3	Forward	399	20	54.41	55.00	1	TTTAGGGGCGATAAGGGCAG	363
	Reverse	761	20	52.27	55.00	2	AATGGGCACAATCATCCCC	
4	Forward	749	20	52.77	55.00	3	GATTGTGCCCATTTGAGGGC	207
	Reverse	955	20	54.85	55.00	3	GCACTAGCACCACAAAGGCT	
5	Forward	755	20	52.36	50.00	0	GCCCATTTGAGGGCCTTTTT	205
	Reverse	959	20	54.19	55.00	0	CCAGGCACTAGCACCACAAA	
6	Forward	754	20	53.44	50.00	0	TGCCCATTTGAGGGCCTTTTT	205
	Reverse	958	20	53.94	55.00	0	CAGGCACTAGCACCACAAAG	
7	Forward	398	20	53.31	50.00	2	TTTTAGGGGCGATAAGGGCA	376
	Reverse	773	20	53.44	50.00	2	AAAAGGCCCTCAAATGGGCA	
8	Forward	134	21	54.78	47.62	2	ACGGTTTATTGCAGCCGATTG	285
	Reverse	418	20	54.41	55.00	1	CTGCCCTTATCGCCCCTAAA	
9	Forward	398	21	55.14	52.38	1	TTTTAGGGGCGATAAGGGCAG	361
	Reverse	758	20	52.43	55.00	0	GGGCACAATCATCCCCAAA	
10	Forward	397	21	54.09	47.62	0	TTTTTAGGGGCGATAAGGGCA	378
	Reverse	774	20	52.36	50.00	3	AAAAGGCCCTCAAATGGGC	

Tabel 1 menunjukkan sepuluh kandidat primer rata – rata memiliki suhu Tm (*temperature melting*) antara 50 – 60 °C. Dalam mendesain primer yang baik suhu Tm yang baik berkisar antara 40 – 60 °C. Primer dengan Tm terlalu tinggi melebihi 70°C akan mudah mengalami *mispriming* pada temperatur rendah. Pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu Tm yang tinggi antara *forward* dan *reverse*. Pasangan primer dengan selisih suhu leleh yang lebih dari 5°C menyebabkan penurunan proses amplifikasi, atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi (Borah, 2011). Sedangkan untuk persentasi GC dari kesepuluh primer berkisar antara 50–60%. GC Content berperan dalam meningkatkan stabilitas primer. Ikatan hidrogen yang kuat pada pasangan basa G dan C menyebabkan primer lebih stabil untuk menempel pada template, sehingga GC Content disarankan berkisar antara 40% hingga 60% (Lin et al, 2005). Kesepuluh primer tersebut dapat mengamplifikasi gen *HalichondrinB* dengan ukuran yang berbeda. Dari sepuluh kandidat primer tersebut, primer 1 dan 2 lebih dapat mewakili untuk mengamplifikasi gen *HalichondrinB* dengan ukuran produk yang lebih besar dari pada yang lain yaitu 817 bp dan

624 bp. Adapun primer 1 dengan sekuen *forward* HalF 5'ATTGCAGCCGATTGCAGATG-3' dan primer *reverse* HalR 5'-AGGCACTAGCACCACAAAGG-3'. Sedangkan primer 2 dengan sekuen *forward* HalF 5'-CAGCCGATTGCAGATGGAGT-3' dan primer *reverse* HalR 5'-GCCCTCAAATGGGCACAATC-3'. Hal ini juga didukung dengan karakteristik lainnya yang sesuai sebagai syarat untuk mendesain primer yang baik. Pemilihan primer 1 dan 2 diperkuat dengan analisis PCR *in silico* menggunakan software UGENE dengan daerah amplifikasi yang dapat menempel pada template sekuen CDS gen *HalichondrinB* (Gambar 6 dan 7)

```

ATTGCAGCCGATTGCAGATGAGGTTAAATTATTTACTAAGGAGATAATTATACCTAACCATGCTAATCTCTTTATATA
12 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78
TAACGTCTGGCTAACGTCTACCTCAATTTAATAAATGATTCCTCTATTAATATGGATTGGTACGATTAGAGAAAATATAT

TATATTAGCCCCCTATTTTGTCTGTTAACATTGTCTTTTATAGCGTGGGGGTAATACCTTATAGTGAGGGTGTAGTGT
79 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 156
ATATAATCGGGGATAAACAGCAATTGTAACAGAAAATATCGCACCCCCATTATGGAATATCACTCCCACATCACAA

AAGTGATTTAGGTATTGGGGTCTTTATTTATTTGCCGTTTCTTCGATTAGTGTATGCGATATTAATGTCGGGGATG
157 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 234
TTCATAAATCCATAACCCCAAGAAATAAATAAACGGCAAAGAAGCTAATCACAAATACGCTATAATTACAGCCCTAC

AGGCAGTAATTCTAAGTATGCTTTTTTAGGGGCGATAAGGGCAGCAGCGCAAATGATAAGCTACGAGGTGTCTATTGG
235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 312
TCCGTCTAATAAGATTCCATACGAAAAAATCCCGCTATTCCTCGTCTCGGTTTACTATTTCGATGCTCCACAGATAACC

GCTAATAATCATTCTGTGGTTTTATGTGTTGGTTCTTTAAATTTAAGCCAAATAGTTTTAACTCAGACTATGGTATG
313 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390
CGATTATTAGTAAAGACACCAAAATACACAACCAAGAAATTTAAATTCGGTTTATCAAATTTGAGTCTGATACCATA

GTTTTATTTTACCATTGTTTCTTATTGCCTTCATGTTTTTTTTGTTTCTGCTTTAGCAGAAACAAACAGAGTGCCTTTTGA
391 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 468
CAAATAAATGGTAACAAAGGATAACGGAAGTACAAAAACAAAGACGAAATCGTCTTTGTTTGTCTCACGGAAACT

TTAACAGAAGGGGAATCAGAATTAGTATCGGGGTTAATGTAGAGTATCAAGTATGTCATTTGCTTTGTTCTTTTT
469 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 546
AAATTGTCTTCCCTTAGTCTTAATCATAGCCCCAAATTACATCTCATAAGTTCATACAGTAAACGAAACAAGAAAA

AGCGGAGTATTGTCATATAATTTTGATGTCTGTCTTTGGGGTCTTTTTATTTTTTGGGGGATGATTGTGCCCATTTGA
547 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 624
TCGCCTCATAACAGTATATTAAACTACAGACAGAAACCCCAAGAAATAAAAAACCCCTACTAACACGGGTAAC

GGGCCTTTTTAGTTATATCTTATTAGACGAAATTGAGCACATTTTTGGTGATTAGGCGGGAAAGTGGTTTTTCTTAT
625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 702
CCCGGAAAAATCAATATAGAATAATCTGCCTTTAACTCGTGTA AAAACCACTAATCCGCCCTTTCACAAAAAGAATA

TTATTTGTTTATTTGAATAAGAGGGACTTACCCTAGAATAAGGTACGACCAACTAATGGCTCTATTGTGAAATCTTA
703 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780
AATAACAATAAATCTTATCTCCCTGAATGGGATCTTATTCATGCTGGTTGATTACCGAGATAACACTTTTAGAAT

TTTACCCTTAAGCTTAGCCTTTGTGGTGCTAGTGCCT
781 785 790 795 800 805 810 817
AAATGGGAATTCGAATCGGAAACACCCAGATCACGGGA
    
```

Gambar 6. Hasil PCR *in silico* Primer 1 menggunakan software UGENE

```
CAGCCGATTGCAGATGGAGTTAAATTATTTACTAAGGAGATAATTATACCTAACCATGCTAATCTCTTTATATATATA
12 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78
GTCGGCTAACGTCTACCTCAATTAAATAAATGATTCCTCTATTAATATGGATTGGTACGATTAGAGAAAATATATATATAT

TTAGCCCTATTTTTGTCGTTAACATTTGCTTTTTATAGCGTGGGGGTAATACCTTATAGTGAGGGTGTAGTGTAAAGT
79 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 156
AATCGGGGATAAAACAGCAATTGTAACAGAAAATATCGCACCCCCATTATGGAATATCACTCCCACATCACAATTCA

GATTTAGGTATTGGGGTCTTTATTTATTTGCCGTTTCTTCGATTAGTGTATTATGCGATATTAATGTCGGGATGAGGC
157 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 234
CTAAATCCATAACCCCAAGAAATAAATAAACGGCAAAGAAGCTAATCACAAATACGCTATAATTACAGCCCTACTCCG

AGTAATCTAAGTATGCTTTTTTAGGGCGATAAGGGCAGCAGCGCAAATGATAAGCTACGAGGTGTCTATTGGGCTA
235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 312
TCATTAAGATTCATACGAAAAATCCCGCTATTCCCGTCGTCGCGTTTACTATTCGATGCTCCACAGATAACCCGAT

ATAATCATTTCTGTGGTTTTATGTGTTGGTTCTTTAAATTTAAGCCAAATAGTTTTAACTCAGACTATGGTATGGTTT
313 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390
TATTAGTAAAGACACCAAATACACAACCAAGAAATTTAAATTCGGTTTATCAAAATTGAGTCTGTATACCATACCAA

ATTTTACCATTGTTTCTTATTCCTATTGCCTTCATGTTTTTTGTTTCTGCTTTAGCAGAAACAAACAGAGTGCCTTTTGATTTA
391 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 468
TAAAATGGTAACAAAGGATAACGGAAGTACAAAAACAAAGACGAAATCGTCTTTGTTTGTCTCACGGAAACTAAAT

ACAGAAGGGGAATCAGAATTAGTATCGGGGTTTAAATGTAGAGTATTCAAGTATGTCATTTGCTTTGTTCTTTTTAGCC
469 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 546
TGCTTTCCCTTAGTCTTAATCATAGCCCCAAATTACATCTCATAAGTTCATACAGTAAACGAAACAAGAAAAATCGC

GAGTATTGTCATATAATTTTGATGTCTGTCTTTGGGGTCTTTTATTTTTGGGGATGATTGTGCCCATTTGAGGGC
547 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 624
CTCATAACAGTATATTAAACTACAGACAGAAACCCCAAGAAAATAAAAAACCCCTACTAACACGGGTAAACTCCC
```

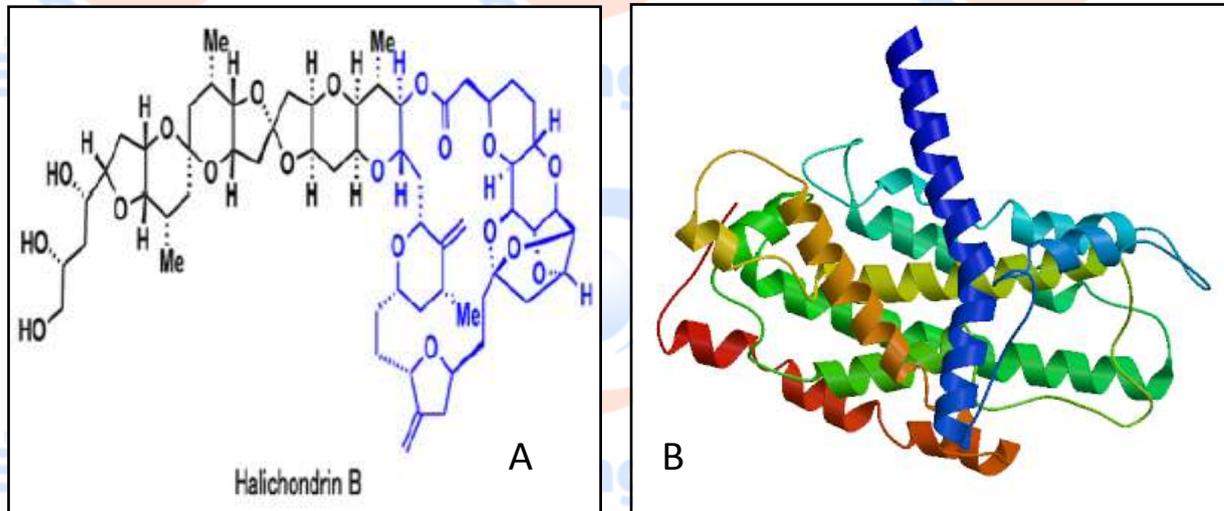
Gambar 7. Hasil PCR in silico Primer 2 menggunakan software UGENE

5.1.3 Permodelan Struktur 3 Dimensi Protein *HalichondrinB*

Struktur 3 dimensi protein *HalichondrinB* dapat diprediksi permodelannya menggunakan software Swiss Model. Penggunaan software ini dapat mewakili prediksi permodelan yang disesuaikan dengan template protein yang sudah dipublikasikan sebelumnya. Swiss Model akan mencari struktur yang mirip dengan protein template dan membangun protein template sesuai dengan protein model (Gambar 8B). Permodelan protein ini dibangun berdasarkan struktur dasar dari senyawa *HalichondrinB* (Gambar 8A). Permodelan protein dapat menggunakan beberapa software yaitu Swiss Model, I-TASSER, QUARK, Phyre 2 dan analisis akhir menggunakan PyMol.

Prediksi struktur 3D protein *HalichondrinB* terdapat tiga molekul identik berikatan satu sama lain dengan membentuk sebuah cincin homotrimer yang akan melingkari DNA double helix. Molekul *loops* (koil) membentuk lipatan yang mana struktur ini mudah mengalami mutasi. Permukaan dalam dari lingkaran tersebut berbentuk α heliks dan bermuatan positif sehingga dapat berinteraksi dengan DNA. Permukaan luar dari lingkaran ini

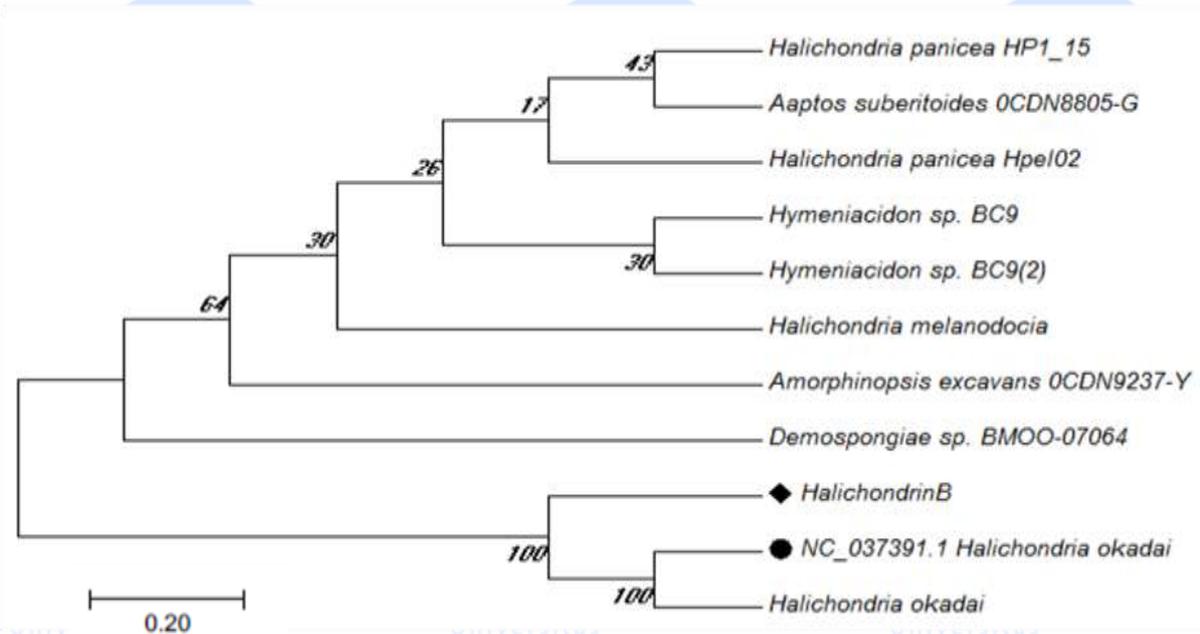
berbentuk β sheet dan bermuatan negatif. Struktur tersier 3D protein mengacu pada hubungan spasial antara struktur sekunder dan struktur tersier. Struktur ini distabilkan oleh empat macam ikatan, yakni ikatan hidrogen, ikatan ionik, ikatan kovalen, dan ikatan hidrofobik (Febriana dan Seprianto, 2018)



Gambar 8. Prediksi struktur protein *HalichondrinB*, A. Struktur Kimia *HalichondrinB*(B).
Struktur 3D *HalichondrinB*

5.1.4. Analisis Filogenetik *HalichondrinB* dengan beberapa spesies spons laut

Pembuatan filogenetik menggunakan software MEGA6 dari gen *HalichondrinB* yang dihasilkan oleh *Halichondria okadai* dengan beberapa spesies *Halichondria* ssp dan spesies lain yang memiliki kekerabatan terdekat berdasarkan hasil *multiple alignment* (Gambar 9). Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining* yaitu pasangan nukleotida yang mengalami perubahan terkecil diantara sekuen yang telah dibandingkan. Nilai jarak dilambangkan oleh garis skala yang menunjukkan jumlah substitusi nukleotida untuk tiap posisi sekuen (Tamura et al, 2013). Nilai jarak sebesar 0.2 pada hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan rendahnya substitusi nukleotida pada sekuen pada masing-masing pengelompokan berdasarkan tingkat genus dan spesies. Gambar 9 menunjukkan hasil pengelompokan ini untuk melihat seberapa jauh dan dekatnya hubungan kekerabatan masing-masing spesies. Metode *Bootstrap* digunakan untuk menguji keakuratan suatu titik cabang pohon filogenetik. Stabilitas pengelompokan (*robustness*) diperhitungkan menggunakan bootstrap dengan 1000 kali ulangan. Nilai bootstrap sebesar 100 dari 100 kali pengulangan untuk titik percabangan memiliki kemiripan yang identik antara spesies *Halichondria okadai* dengan *HalichondrinB*. Hal ini menunjukkan sekuen gen *HalichondrinB* merupakan bagian genom dari spesies *Halichondria* ssp.



Gambar 9. Pohon filogenetik *Halichondria okadai* dengan beberapa spesies spons

5.3 Hasil Luaran Penelitian

Luaran penelitian ini adalah publikasi jurnal ilmiah nasional tidak terakreditasi. Luaran lainnya dari penelitian ini adalah menemukan kandidat primer yang baik dalam mengamplifikasi gen penyandi *Halichondrin* sebagai Hak Kekayaan Intelektual (HKI) sebagai temuan terbaru yang sebelumnya belum pernah diteliti dan dipublikasikan

BAB VI RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahapan penelitian berikutnya adalah:

- Pengambilan sampel spons laut *Halichondrina* sp di Taman Nasional Kepulauan Seribu
- Isolasi DNA Genom bakteri dengan teknik Metagenom
- Analisis Metabarcoding konsorsia bakteri dengan teknik *Next Generation Sequencing*
- Deteksi Gen penyandi *HalichondrinB* menggunakan primer spesifik HalF dan HalR dengan metode PCR
- Mengkloning gen penyandi *HalichondrinB* ke dalam vektor kloning dan mengekspresikannya ke dalam *Escherichia coli*

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

Analisis bioinformatika gen penyandi *HalichondrinB* dari sekuen mitokondria *Halichondria okadai*(NC_037391.1) berdasarkan penelusuran sekuen analog *HalichondrinB* didapatkan sekuen CDS dengan 1010pasang basa nukleotida dengan total 330 asam amino. Sepuluh kandidat primer berhasil diperoleh berdasarkan sekuen CDS *HalichondrinB*. Satu primer dipilih yang dapat mewakili sekuen gen *HalichondrinB* memiliki panjang produk 817 bp (*basepair*) dengan sekuen primer *forward* HalF 5'-ATTGCAGCCGATTGCAGATG-3' dan primer *reverse* HalR 5'-AGGCACTAGCACCACAAAGG-3'. Hasil analisis filogenetik gen *HalichondrinB* memiliki kemiripan yang identik dengan spesies *Halichondria okadai* dan berkerabat dekat dengan beberapa spesies spons dengan spesies *Halichondria* ssp.



DAFTAR PUSTAKA

- Abe T, Sahin FP, Akiyama K, Naito T, Kishogami M, Miyamoto K, Sakakibara Y, Uemura D. 2014. Construction of a Metagenomic Library for the Marine Sponge *Halichondria okadai*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76:4, 633-639, <https://doi.org/10.1271/bbb.110533>
- Alluri N, Thameemulansari LH, Reddy CV. 2012. Cytotoxic activity of methanol and dichloromethane extracts soft Halicona species. *IJPSR*. Vol.3 (6) 1782 – 1784
- Agoulnik S, Kuznetsov G and Littlefield BA. 2008. Tubulin Isotype Screening in Cancer Therapy using Halichondrin B. Patent: JP 2008522623-A 29
- Borah P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision*, vol. 11(3):134-136
- Claverie, JM. and C. Notredame. 2003. *Bioinformatics For Dummies*. 2nd ed. Wiley Publishing, Inc. New York. p10-68. p215-338.
- Cragg GM, Newman DJ. 2004. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 100:72–79
- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod*.60:52–60
- Das S, Lyla PS, and Khan SA. 2006. Marine Microbial diversity and ecology: importance and future perspective. *Curr sci*. 90: 1325 -1335
- Dharmayanti INLP. 2011. Filogenetika molekuler: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*. Vol. (21):1
- Faulkner DJ. 2002. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 19:1–48.
- Febriana dan Seprianto. 2018. *Candida antarctica* Lipase B Synthetic Gene: A Bioinformatics Analysis. *Bioscience*. Vol.(2):2, 1412-9760. Doi: 10.24036/0201822100216-0-00
- [Furuno M](#), [Kasukawa T](#), [Saito R](#), [Adachi J](#), [Suzuki H](#), [Baldarelli R](#), [Hayashizaki Y](#), and [Okazaki Y](#). 2003. CDS Annotation in Full-Length cDNA Sequence. *Genome Res*. 13(6b): 1478–1487. doi: 10.1101/gr.1060303
- Garson M. 1994. The biosynthesis of sponge secondary metabolites: why it is important. In: van soest RWM, van kempen TMG, Breakman JC, editors. *Sponges in time and space*. Rotterdam: AA Balkema p. 427 -40
- Glick BR. and J.J. Pasternak. 2003. *Molecular Biology: Principles and Application of Recombinant DNA*. ASM Press. Washington, D.C.
- Holler U, Wright AD, Matthee GF, Konig GM, Draeger S. Aust, H, and Sculz B. 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycol. Res*. 104 (11): 1354 – 1365
- Kintoko, Azimhato, Pihie HL. 2008. Morphological study on opoptoxic HeLa cells induced by petroleum ether extract from leaves of phateria macrocorpa (Scheff). *Proceeding of The International Seminar on Chemistry* pp 299 ISBN 978 . 979. 18962.7
- Kim H, Kim HJ, Jung YH, Yu C, Rock Y, Han D, Kang DW. 2017. The complete mitochondrial genome of sponge *Halichondria okadai* (Demospongiae, Suberitida, Halichondriidae) from Korea water. *Mitochondrial Dna Part B: Resources*. Vol. 2:2, 873–874 <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1407693>

- Kjer J, Debbab A, Aly H, and Prokch P. 2010. Methods for isolation of marine – derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature protocols*. 5(3): 479-490
- Krane, DE an Raymer ML. 2003. *Fundamental concepts og bioinformatics*. San Francisco. CA: Benjamin Cummings
- Kamuhabwa A, Nashimo C, De Witte P. 2000. Cytotoxicity of samo medical plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 143-149
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:187-1874
- Leica M, and Apantaku, MD. 2002. Breast-conserving surgery for breast cancer. *Am Fam Phys* 66(12):2271-8
- Lin, FM, Huang HD, Huang HY, and Horng JT. 2005. Primer design for multiplex PCR using a genetic algorithm. *Conf. Genet. Evol. Comput. - GECCO '05*, p. 475.
- Lee YK, Lee JH, Lee HK. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol*; 29: 254 - 64
- Mount, D.W. 2001. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nursid M, Munifah I. dan Januar HI. 2005. Skrining senyawa bioaktif ekstrak metanol dari karang lunak Alcyonidae. *J. Penel. Perikanan. Indo*. 11(4): 33-38
- Schulz B, Draeger S, Dela cruz, TE, Rheinheimer KS, Loesgen S, and Krohn. 2008. Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitat. *Botanica marina*. 51: 219 -234
- Sumaryanto W, Wibowo AE dan Chaidir. 2005. Isolasi dan eludasi struktur senyawa utama dari spons *Axynissa aplysinoides*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 16 (4): 186-191
- Swami U, Shah U and Sanjay Goel. 2015. Eribulin in Cancer Treatment. *Marine Drugs*, 13. 5016-5058; ISSN:1660-3397 doi:10.3390/md13085016
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Zhang D, And Son BW. 2007. Chemical studies on the bioactive metabolites from marine derived fungi MFB604 and MFC353. *Natural Products Chemistry Laboratory*. Pukyong National University. Busan, Korea

Biodata Peneliti

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Seprianto, S.Pi, M.Si
2	Jenis Kelamin	L
3	Jabatan Fungsional	Asisten Ahli
4	NIP/NIK/No. identitas lainnya	1471020909870022
5	NIDN	0309098702
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Duku, 09 September 1987
7	E-mail	seprianto@esaunggul.ac.id
8	Nomor Telepon/HP	081211884434
9	Nama Institusi	Universitas Esa Unggul
9	Alamat Kantor	Jl Raya Arjuna no. 9 Kebun Jeruk Jakarta Barat
10	Nomor Telepon/Faks	021-5674223

B. Riwayat Pendidikan

Program:	S-1	S-2	S-3
Nama PT	Universitas Riau	Institut Pertanian Bogor	-
Bidang Ilmu	Ilmu Kelautan	Bioteknologi	-
Tahun Masuk-Lulus	2005-2010	2013-2016	-
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari usus udang windu (<i>Peneus monodon</i>) dengan teknik sekuens 16S rDNA	Penapisan <i>Streptomyces</i> sp penghasil <i>Microbial Transglutaminase</i> dan pengklonan DNA penyandinya melalui konstruksi pustaka genom	
Nama Pembimbingan/Promotor	Prof. Dr. Feliatra, DEA	Prof. Dr. Suharsono, DEA	

C. Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Terakhir

(Bukan Skripsi, Tesis, maupun Disertasi)

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2016			
2	2017	Isolasi dan Penapisan Bakteri selulolitik dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase	Internal	24.000.000,-
3	2018			

*Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema penelitian DIKTI maupun dari sumber lainnya

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2013			
2	2014			

No.	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
3	2015			
4	2016			
5	2017	Pemberian Wawasan dan Pengarahan tentang Keilmuan Bioteknologi pada Sekolah Tingkat SMA atau Sederajat di Jakarta dan Tangerang	Internal	1.500.000

*Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema pengabdian kepada masyarakat DIKTI maupun dari sumber lainnya

E. Publikasi Artikel Ilmiah Dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
1	2016	Cloning of a Transglutaminase Gene from <i>Streptomyces thioluteus</i> TTA 02 SDS 14	Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest Biotechnology (P3DSPBKP-KKP)	11/I/2016
2	2016	Screening of Indonesian <i>Streptomyces</i> sp. Capable of Secreting Transglutaminase (MTGase) and Optimization of MTGase Prodction Using Different Growth Media.	Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest Biotechnology (P3DSPBKP-KKP)	11/I/2016
3	2017	Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik Dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase	Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity	I/II/2017
4	2018	Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik Dari Usus Udang Windu (<i>Panaeus monodon</i>) Berdasarkan Sekuens Gen 16S rDNA	Biogenesies	V/II/2018
5	2018	Candida antarctica Lipase B Synthetic Gene:A Bioinformatics Analysis	BioScience	II/II/2018

F. Pemakalah Seminar Ilmiah (Oral Presentation) dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Jurnal Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	Seminar Nasional : Genetic Engineering of Biotechnology	Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik Dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil	Universitas Esa Unggul

No.	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Jurnal Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
		Enzim Selulase	
2			
3			
Dst			

G. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1				
2				
3				
Dst				

H. Perolehan HKI dalam 5-10 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1				
2				
3				
Dst				

I. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/Rekayasa Sosial Lainnya dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang Telah Diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat

J. Penghargaan dalam 10 Tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)

No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1			
2			
3			
Dst			

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi
Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan penugasan penelitian dosen pemula.

Jakarta, 04 November 2017

Ketua Pengusul

(Seprianto, S.Pi, M.Si)



A. Identitas Diri Anggota Peneliti

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd., M.Si.
2	Jenis Kelamin	Perempuan
3	NIP/NIK/identitas lainnya	3574016302910002
4	NIDN (jika ada)	0323029101
5	Jabatan Fungsional	Asisten Ahli
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Probolinggo, 23 Februari 1991
7	E-mail	febriana@esaunggul.ac.id
8	Nomor telepon/HP	081291789560
9	Nama Institusi Tempat Kerja	Universitas Esa Unggul
10	Alamat Kantor	Jalan Arjuna Utara No. 9, RT 1/ RW 2, Duri Kepa, Kebon Jeruk, Jakarta Barat
11	Nomor telepon/Faks	(021) 5674223

B. Riwayat Pendidikan

	S-1	S-2
Nama Perguruan Tinggi	Universitas Jember	Institut Pertanian Bogor
Bidang Ilmu	Biologi	Bioteknologi
Tahun masuk-lulus	2009-2013	2013-2016
Judul Skripsi/Tesis	Pengaruh Ekstrak n-Heksan Daging Buah Delima Putih (<i>Punica granatum</i>) terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Darah pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i> L.) dan Pemanfaatannya sebagai Buku Suplemen	Konstruksi Vektor dan Ekspresi Protein Rekombinan Lipase <i>Candida antarctica</i> (CaLB) dengan <i>Cellulose Binding Module</i> (CBM) pada <i>Pichia pastoris</i>
Nama Pembimbing	1. Dr. Iis Nurasyiah, S.P.,M.P 2. Slamet Hariyadi, M.Si	1. Prof. Dr. Suharsono, DEA 2. Dr. Asrul Muhamad Fuad

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

(buka skripsi, tesis, dan disertasi)

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah
1	2012	SABU <i>Punica granatum</i> – Sari Buah Delima sebagai Minuman Antikolesterol Tanpa Efek Samping	DIKTI	10.566.000
2	2015	Ekspresi Konstitutif Protein Rekombinan <i>Candida antarctica</i> Lipase B pada <i>Pichia pastoris</i>	DIPA	30.000.000

D. Publikasi Artikel Ilmiah dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/Nomor/Tahun
1.	Pengaruh Ekstrak n-Heksan Daging Buah Delima Putih (<i>Punica granatum</i>) terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Darah pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i> L.) dan Pemanfaatannya sebagai Buku Suplemen	Pancaran Pendidikan	2 (4): 89-99/2013
2.	Constitutive Expression of <i>Candida antarctica</i> Lipase B (Calb) in <i>Pichia pastoris</i> Using pGAPZ α Vector	Annales Bogoriense	20 (1): 31-38/2016
3	<i>Candida antarctica</i> Lipase B Synthetic Gene:A Bioinformatics Analysis	BioScience	II/II/2018

E. Pemakalah Seminar Ilmiah (Oral Presentation) dalam 5 tahun terakhir

No	Nama Temu Ilmiah/ Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat

F. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit

G. Perolehan HKI dalam 10 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID

H. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/Rekayasa Sosial Lainnya dalam 10 Tahun Terakhir

No	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang telah Diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat

I. Penghargaan dalam 10 tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)

No	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun

--	--	--	--

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan penugasan penelitian dosen pemula.

Jakarta, 04 November 2018

Anggota

(Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si)

