

## Identifikasi Isolat Bakteri Endofit A1 dan B1 dari Akar Tanaman Ubi Jalar Berdasarkan Sekuens 16S rDNA

### *Identification Isolate Endophytic Bacteria A1 and B1 from Sweet Potatoe's Root Based On 16S rDNA*

Anggi Maulia Arista\*, Yuliani, dan Lisa Lisdiana

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

\* e-mail: anggimaulia@gmail.com

#### ABSTRAK

Bakteri endofit merupakan bakteri yang secara alami berada dalam jaringan tumbuhan serta memiliki banyak manfaat terutama sebagai *Plant Growth Promotion* (PGP) dan sebagai agen biokontrol pada tanaman. Salah satu syarat bakteri endofit yang akan diaplikasikan adalah harus teridentifikasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies isolat bakteri endofit A1 dan B1, serta mengetahui urutan basa yang lestari dan beragam dari isolat bakteri endofit A1 dan B1. Isolat bakteri endofit yang digunakan adalah A1 dan B1. Metode penelitian yang digunakan yaitu isolasi DNA menggunakan metode CTAB/NaCl yang dimodifikasi, amplifikasi sekuens 16S rDNA, dan sekuensing 16S rDNA untuk mengetahui urutan basa nitrogennya. Hasil sekuensing kemudian diolah dengan *ClustalX*, *Phylip*, dan *Phydit* untuk diketahui nama spesiesnya. Berdasarkan hasil penelitian maka berdasarkan sekuens 16S rDNA diidentifikasi isolat A1 sebagai *Bacillus cereus* strain CRh 25, dan isolat B1 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* strain LT15-MRL. Isolat bakteri A1 memiliki urutan basa yang beragam sebanyak 1 dan basa yang lestari sebanyak 1120. Isolat B1 memiliki urutan basa yang beragam sebanyak 0 dan basa yang lestari sebanyak 1085.

**Kata kunci:** identifikasi; isolat bakteri endofit A1 dan B; sekuens 16S rDNA

#### ABSTRACT

*Endophytic bacteria is bacteria which is naturally present in plant tissue and has many benefits for plant, especially as Plant Growth Promotion (PGP) and as biocontrol agents. Endophytic bacteria can be applied it had been identified. Therefore this study was conducted in order to determine the species of endophytic bacteria isolates A1 and B1, and determine the conserve and diverse sequence bases of endophytic bacteria isolates A1 and B1. Endophytic bacteria in this research are isolates A1 and B1. The method used were DNA isolation using CTAB / NaCl modified, amplification of 16S rDNA sequences and 16S rDNA sequencing to determine base of nitrogen sequence. Sequencing results then were processed to know the species name. The result of this study found that isolate A1 were identified as Bacillus cereus strain CRH 25, and isolate B1 were identified as Bacillus cereus strain LT15-MRL. Isolate A1 has 1 diverse base sequence and conserve base is 1120. Isolate B1 has 0 diverse sequence and conserve base is 1085.*

**Key words:** identification; isolate of endophytic bacteria A1 and B1; 16S rDNA

#### PENDAHULUAN

Bakteri endofit merupakan bakteri menguntungkan yang berinteraksi dengan tanaman inang tanpa menyebabkan gangguan atau kerusakan (Desriani *et al.*, 2014). Kobayashi dan Palumbo (2000) dalam Njoloma (2006) menyebutkan dalam satu tanaman bisa terdapat lebih dari satu spesies bakteri endofit baik Gram positif maupun Gram negatif.

Manfaat bakteri endofit sangat banyak. Long *et al.* (2008) menyebutkan bahwa bakteri endofit memiliki potensi dalam menghasilkan hormon *Indole Acetic Acid* (IAA), dan menambat nitrogen, sehingga menguntungkan jika digunakan sebagai *Plant Growth Promotion* (PGP).

Anggara *et al.* (2014) telah mengisolasi 8 isolat bakteri endofit penghasil hormon IAA dari akar tanaman ubi jalar varietas Papua Patippi, dengan 4 isolat yang mampu menghasilkan hormon IAA dengan konsentrasi tinggi, yaitu 0,3552 ppm untuk isolat A1, 0,5032 ppm untuk B1, 0,3552 ppm untuk B2, dan 0,5525 ppm untuk isolat B3. Isolat A1 dan B1 dipilih karena memiliki morfologi serupa tetapi memiliki potensi yang berbeda. Penyebab perbedaan potensi ini diduga karena adanya perbedaan jenis bakteri. Perbedaan potensi ini mungkin juga terjadi karena isolat ini diperoleh dari tanaman inang yang berbeda yaitu tanaman A dan B dari akar tanaman ubi jalar (*Ipomoea batatas*) varietas Papua Pattipi.

Identifikasi adalah suatu proses penggunaan kriteria yang ditetapkan untuk klasifikasi dan nomenklatur dengan membanding-bandingkan ciri-ciri yang ada pada suatu individu yang belum diketahui dengan individu yang sudah dikenal (Pelczar and Chan, 1986). Identifikasi dapat dilakukan secara fenotipik maupun genomik.

Identifikasi genomik adalah identifikasi yang memanfaatkan analisis genomik. Analisis genomik adalah analisis yang mempelajari hubungan spesies dengan kerabatnya berdasarkan sekuens penanda molekuler. Analisis genomik memiliki beberapa keuntungan antara lain dari segi waktu lebih cepat dan dari segi hasil lebih *reproducible* (bila diulang menghasilkan hasil yang sama), serta menghasilkan data yang tidak ambigu (Woo *et al.*, 2008). Penanda molekuler yang digunakan pada penelitian ini adalah sekuens 16S rDNA. Sekuens 16S rDNA dapat digunakan sebagai penanda karena memiliki daerah dengan urutan basa nitrogen yang lestari dan beragam. Urutan basa nitrogen yang lestari dapat digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogeni, sedangkan urutan basa yang beragam dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam spesies (Pangastuti, 2006).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi bakteri endofit dari isolat bakteri A1 dan B1 berdasarkan analisis sekuens 16S rDNA dan untuk mengetahui urutan basa nitrogen dari sekuens 16S rDNA yang lestari dan beragam dari isolat bakteri A1 dan B1. Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan identifikasi secara genomik isolat bakteri A1 dan B1 penghasil IAA dari Anggara *et al.* (2014) sebagai salah satu syarat bakteri yang baik dan dapat diaplikasikan langsung pada tumbuhan, juga dapat mengetahui efek negatif dan sifat antagonis bakteri uji dengan bakteri lain.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Juli 2016. Rekultur bakteri endofit dan isolasi DNA dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, dan Laboratorium IPA Terpadu FMIPA Universitas Negeri Surabaya. Amplifikasi 16S rDNA dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Sekuensing DNA dilakukan di *First BASE laboratories*; The Gemini Singapore Science Park melalui PT Genetika Science Indonesia (Jakarta).

Isolat bakteri yang telah direkultur pada media NA (*Nutrient Agar*), direkultur kembali pada media LB (*Luria Bertani*) 1 ml, yang kemudian direkultur kembali pada media LB 5 ml. Kultur isolat bakteri selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 x.g, selama 2 menit, pada suhu 4°C untuk memperoleh pellet bakteri. Pellet bakteri yang diperoleh diresuspensi dengan larutan buffer TE sebanyak 573 µl. Pelisisan dinding sel bakteri dilakukan dengan menambahkan 15µl SDS 20 % dan proteinase-K 20 mg/ml untuk purifikasi awal. Larutan yang telah homogen diinkubasi selama 1 jam, suhu 37°C. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menambahkan 100 µl NaCl 5M dan 80 µl CTAB/NaCl, larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit, suhu 65°C. Larutan kemudian dipurifikasi lagi dengan menambahkan P:C:I (*Phenol: Chloroform:Isoamyl alcohol*) (25:24:1) dengan volume yang sama dan disentrifugasi pada kecepatan 3.600 x.g, suhu 4°C, selama 5 menit. *Upper phase* yang diperoleh dipurifikasi lagi dengan penambahan C:I (*Chloroform:Isoamyl alcohol*) (24:1) dengan volume yang sama dan disentrifugasi pada kecepatan 3.600 x.g, suhu 4°C, selama 5 menit. *Upper phase* yang diperoleh dipresipitasi dengan Isopropanol dingin 0,6 kali volume sampel yang diperoleh. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.600 x.g, selama 5 menit, suhu 4°C untuk memperoleh pellet DNA. Pellet DNA yang diperoleh dicuci menggunakan etanol 70 % dan disentrifugasi dengan kecepatan 3.600 x.g, selama 5 menit, suhu 4°C. Pellet DNA dikeringan (*overnight*), kemudian di resuspensi menggunakan larutan buffer TE sebanyak 50 µl. Sampel kemudian disimpan pada suhu -20°C, hingga dilakukan analisis lanjutan. Sampel DNA kemudian di uji secara semi kualitatif dan kuantitatif. Sampel DNA yang telah memenuhi syarat kemudian diamplifikasi sekuens 16S rDNA dengan metode PCR (Wilson, 1997).

Amplifikasi sekuens 16S rDNA menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Hasil dari PCR dapat diketahui secara kualitatif melalui elektroforesis menggunakan gel agarose 1% yang kemudian divisualisasi dengan bantuan uv transluminator. Siklus yang terjadi dalam PCR adalah sekitar 35 siklus.

Sekuensing yang dilakukan menggunakan metode Sanger dengan prinsip *chain termination didedoxynucleotides*. Bahan yang digunakan untuk sekuensing antara lain: DNA *template*, primer *forward* menggunakan 63F (5'CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') dan primer *reverse* menggunakan 1387R (5'GGG CGG

WGT GTA CAA GGC 3'), DNA Polymerase, Deoxynucleotides Tri Phospat (dNTP), Dideoxynucleotides Tri Phospat (ddNTP), dan akuabides (ddH<sub>2</sub>O) free nuclease. Alat yang digunakan untuk sekuensing adalah big dye terminator cycle sequencing kit dan DNA sequencer.

## HASIL

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh data berupa DNA hasil isolasi bakteri endofit A1 dan B1 dari akar tanaman ubi jalar, data hasil amplifikasi sekuens 16S rDNA, dan data hasil sekuensing.

Data semikualitatif DNA yang diperoleh dari penelitian ini berupa pita DNA diperoleh melalui hasil elektroforesis menggunakan gel agarose 0,8% yang divisualisasikan menggunakan uv transluminator. Data kuantitatif berupa konsentrasi dan kemurnian diperoleh melalui hasil spektrofotometri. Hasil visualisasi DNA bakteri A1 dan B1 dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil visualisasi DNA menunjukkan bahwa ukuran DNA pada semua sampel adalah ±10000 bp. Sampel DNA terbaik yaitu isolat A1 pada sumur keempat dan isolat B1 pada sumur ketiga yang kemudian dilanjutkan dengan pengujian secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi DNA tertinggi terdapat pada isolat B1 yaitu sebesar 73,87 ng/µl. Nilai kemurnian tertinggi terdapat pada isolat A1 yaitu sebesar 1,85 dilihat dari nilai A 260/280, sedangkan isolat bakteri B1 menghasilkan nilai 2,05, (Tabel 1).

Sampel DNA yang telah memenuhi syarat secara kuantitatif dan semi kualitatif kemudian diamplifikasi dengan metode PCR dengan menggunakan primer universal 63F (5' CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') dan 1387R (5' GGG CGG WGT GTA CAA GGC 3'). Hasil amplifikasi DNA kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 1 % dan divisualisasikan dengan uv transluminator. Hasil amplifikasi DNA disajikan pada Gambar 2.

Hasil amplifikasi sekuens 16S rDNA semua isolat baik A1 maupun B1 sekuens 16S rDNA teramplifikasi dengan ditandai adanya pita DNA yang terang dan tebal. Semua sampel isolat teramplifikasi sekuens 16S rDNA pada ukuran sekitar 1500 bp, dengan menggunakan primer universal 63F (5' CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') dan 1387R (5' GGG CGG AGT GTA CAA GGC 3').

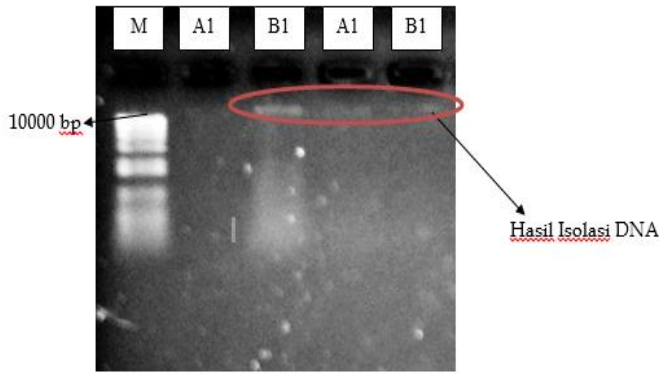
Amplikon selanjutnya disekuensing dengan menggunakan metode Sanger. Hasil sekuensing berupa text file (urutan basa hasil sekuensing). Data hasil sekuensing menunjukkan bahwa isolat A1 memiliki basa sejumlah 1121 bp dan isolat B1 memiliki basa sejumlah 1086 bp. Jumlah basa isolat A1 dan B1 ini sesuai dengan jumlah sekuens 16S rDNA yaitu sekitar 1500 bp. Hasil sekuensing ini kemudian diolah menggunakan program ClustalX, Phylip, dan Phydit untuk dibandingkan dengan ±80 bakteri acuan sehingga menghasilkan pohon filogeni.

Hasil sekuensing 16S rDNA dari isolat bakteri A1 dan B1 menunjukkan bahwa isolat A1 memiliki nilai similaritas yang tinggi yaitu 99,91 % dengan *Bacillus cereus* strain CRh 25. Isolat bakteri A1 memiliki basa nukleotida yang berbeda 1 dari 1120 dengan *Bacillus cereus* strain CRh 25. Isolat B1 memiliki nilai similaritas 100 % dengan *Bacillus cereus* strain LTH15-MRL. Cluster yang menunjukkan bakteri dengan kekerabatan terdekat dengan isolat A1 dan B1 dapat dilihat pada Gambar 3.

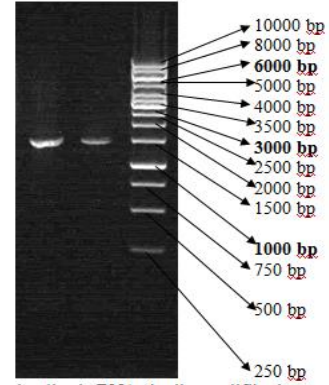
Isolat bakteri B1 memiliki basa nukleotida yang berbeda 0 dari 1085 dengan *Bacillus cereus* strain LTH15-MRL, sehingga dapat diketahui bahwa isolat A1 dan B1 merupakan bakteri dari spesies yang sama yaitu *Bacillus cereus*. Sekuens basa nukleotida yang lestari dan beragam dari isolat A1, B1, dan bakteri acuan dapat diketahui dari capture alignment sekuens 16S rDNA. Capture 35 basa nukleotida yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 4.

**Tabel 1.** Hasil pengujian DNA secara kuantitatif

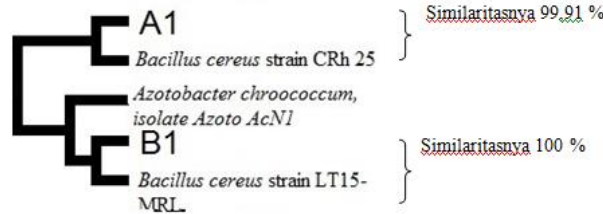
No	Sampel	Konsentrasi (ng/ µl)	Nilai Kemurnian			Nilai kemurnian DNA yang tinggi yaitu jika nilai Absorbansi 260/280 menunjukkan nilai 1,8-2,0
			A 260	A 280	A 260/280	
1	A1	24,19	0,484	0,261	1,85	
2	B1	73,87	1,477	0,722	2,05	



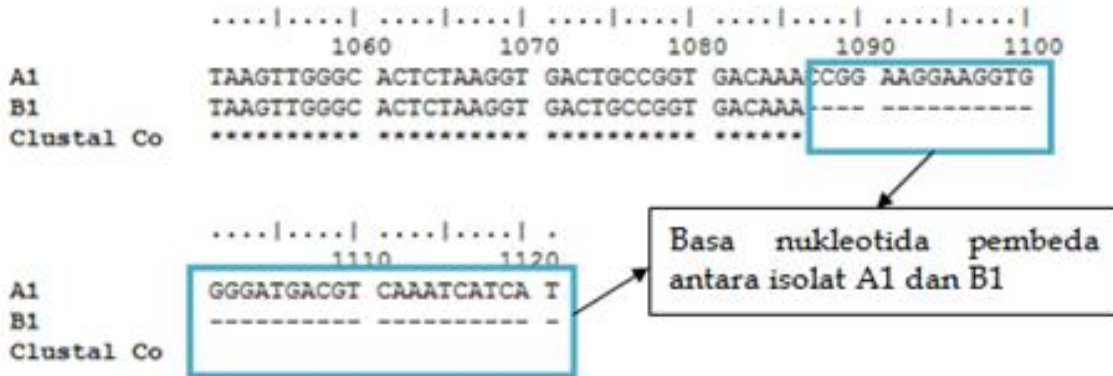
**Gambar 1.** Hasil visualisasi DNA isolat bakteri A1 dan B1 beserta DNA marker 1 kb.



**Gambar 2.** Hasil visualisasi DNA hasil amplifikasi menggunakan Metode PCR. Keterangan Gambar: A1. Hasil amplifikasi 16S rDNA dari isolat A1, B1. Hasil amplifikasi 16S rDNA dari isolat B1, C. DNA marker 1 kb.



**Gambar 3.** Cluster dari pohon filogeni yang menunjukkan bakteri dengan kekerabatan terdekat dengan isolat A1 dan B1.



**Gambar 4.** Capture 35 basa nukleotida berbeda antara isolat A1 dan B1 yang tidak ditandai dengan tanda “\*”

**PEMBAHASAN**

Isolasi DNA yang dilakukan menggunakan metode CTAB/NaCl yang telah dimodifikasi. Metode CTAB/NaCl yang dimodifikasi bertujuan untuk menghasilkan hasil isolasi DNA yang lebih murni dengan konsentrasi tinggi. Nilai kemurnian dari isolasi bakteri A1 dan B1 diketahui dari uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer dan uji semi kualitatif menggunakan elektroforesis pada gel agarose 0,8%. Nilai kemurnian yang tinggi yaitu antara

1,8-2,0 pada absorbansi 260/280 (Fatchiyah *et al.*, 2011). Isolat B1 terdapat sedikit kontaminan karena memiliki nilai kemurnian lebih dari 2,0 pada absorbansi 260/280, kontaminan pada isolat B1 yaitu protein. Sambrook and Russell (2001) menyatakan bahwa bila kemurnian DNA dibawah 1,8 dari nilai absorbansi 260/280 berarti DNA masih terkontaminasi kontaminan berupa fenol, sedangkan bila nilai kemurniannya lebih dari 2,0 masih terkontaminasi kontaminan berupa protein dan senyawa lain.

Konsentrasi DNA juga dapat diketahui melalui uji semi kualitatif dan kuantitatif. Konsentrasi DNA yang baik untuk PCR adalah sekitar 0,5-6,5 µg/ml (Wilkerson *et al.*, 1993 dalam Mulyani *et al.*, 2011). Konsentrasi DNA pada penelitian ini yaitu isolat A1 24,19 ng/µl dan isolat B1 73,87 ng/µl, sehingga dengan konsentrasi yang cukup tinggi tersebut hasil isolasi dapat dilanjutkan pada tahap amplifikasi sekuens 16S rDNA dengan metode PCR.

Amplifikasi sekuens dengan metode PCR merupakan salah satu teknik penggandaan asam nukleat pada target tertentu dengan cara mensintesis DNA baru (Wu *et al.*, 2002). Komponen PCR yang digunakan dalam penelitian ini meliputi PCR *master-mix* (intron), primer *universal* 16S rDNA (63F dan 1387R), dan DNA *template* dari isolat bakteri A1 dan B1.

Tahapan pada proses PCR yaitu terdiri atas denaturasi, annealing, dan ekstensi. Penelitian ini menggunakan suhu denaturasi 94°C selama 30 detik. Fatchiyah *et al.*, (2011) menyebutkan bahwa suhu denaturasi biasanya berkisar 92°C-95°C dan suhu standar yang sering digunakan yaitu suhu 94°C. Penelitian ini menggunakan suhu *annealing* 55°C selama 1 menit. Suhu ini sesuai dengan protokol yang dilakukan oleh Kusumaningrum *et al.*, (2013) dengan menggunakan primer yang sama yaitu primer 63F dan 1387R dengan menghasilkan ampikon sebesar 1350 bp. Ekstensi pita DNA dengan DNA polimerase merupakan tahap akhir dari PCR. Proses ekstensi pada penelitian ini menggunakan suhu 72°C selama 1,5 menit ditambah dengan ekstensi akhir pertama dengan suhu yang sama selama 10 menit dan ekstensi kedua dengan suhu 37°C selama 5 menit. Suhu dan waktu ini sesuai dengan penelitian Gaweco dan Thiel (1998) untuk proses polimerisasi dan ekstensi pita DNA diperlukan suhu 72°C selama 90 detik (1,5 menit). Penambahan waktu 10 menit pada suhu 72°C yaitu agar seluruh produk PCR diharapkan berbentuk DNA untai ganda (Lind *et al.*, 1996).

Hasil sekuensing dari penelitian ini menunjukkan bahwa isolat bakteri A1 dan B1 merupakan bakteri dari genus dan spesies yang sama yaitu *Bacillus cereus* tetapi berbeda pada tingkat strain. Hasil sekuensing ini juga menunjukkan bahwa teknik identifikasi secara genomik dengan menggunakan analisis sekuens 16S rDNA dapat mengidentifikasi hingga tingkat strain suatu organisme (Vandamme *et al.*, 1996).

Isolat bakteri A1 dan B1 secara genomik teridentifikasi sebagai bakteri yang sama pada tingkat spesies yaitu *Bacillus cereus* tetapi berbeda pada tingkat strain. Isolat A1 teridentifikasi

sebagai *Bacillus cereus* strain CRh25 karena similaritasnya 99,91% dengan sekuens yang beragam 1 dari 1120 sekuens yang lestari. Isolat B1 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* strain LT15-MRL karena similaritasnya 100% dengan sekuens yang beragam 0 dari 1085 sekuens yang lestari. Perbedaan strain ini menyebabkan berbedanya karakter morfologi dan fisiologi bakteri meskipun merupakan spesies yang sama.

Hasil sekuensing 16S rDNA juga menunjukkan bahwa isolat bakteri A1 dan B1 merupakan spesies yang sama yaitu *Bacillus cereus* dan memiliki karakter kunci yaitu Gram positif. Pewarnaan Gram digunakan sebagai langkah awal dalam identifikasi bakteri. Bakteri *Bacillus cereus* ini juga pernah diisolasi oleh Janarthine *et al.*, (2010) dan merupakan bakteri endofit dari tanaman mangrove *Avicennia marina*. Bakteri ini juga terbukti dapat dijadikan sebagai *Plant Growth Promotion* (PGP) karena berpengaruh memacu pertumbuhan *Bacopa monnieri* secara *in vitro*.

Bakteri endofit yang telah teridentifikasi memenuhi syarat untuk dapat diaplikasikan. Aplikasi bakteri endofit pada tanaman dapat dilakukan dengan berbagai cara. Koomnok *et al.*, (2007) mengaplikasikan bakteri endofit pada kutur padi di Thailand dengan cara mencampur bakteri endofit tersebut dengan media untuk kultur jaringan padi. Germaine *et al.*, (2006) mengaplikasikan bakteri endofit langsung di tanah tempat tumbuh tanaman. Azevedo *et al.*, (2000) juga menyebutkan bahwa bakteri endofit dapat diaplikasikan pada biji tanaman dengan cara merendamnya atau diaplikasikan pada media tumbuh tanaman yang muda.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian mengenai identifikasi isolat bakteri endofit A1 dan B1 dari akar tanaman ubi jalar berdasarkan sekuens 16S rDNA maka dapat diambil suatu simpulan yaitu isolat bakteri A1 dan B1 berdasarkan hasil analisis sekuens 16S rDNA teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus*, isolat A1 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* strain CRh 25, dan isolat B1 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* strain LT15-MRL. Urutan basa nitrogen isolat bakteri A1 memiliki urutan basa yang beragam sebanyak 1 dan basa yang lestari sebanyak 1120. Isolat B1 memiliki urutan basa yang beragam sebanyak 0 dan basa yang lestari sebanyak 1085. Diperlukan penelitian lebih lanjut meliputi waktu isolasi yang tepat berdasarkan usia bakteri, metode pemurnian DNA yang tepat selain metode CTAB/NaCl, pemilihan primer yang tepat saat amplifikasi sekuens 16S rDNA dapat dilakukan dengan

mendesain primer sendiri, dan penelitian mengenai potensi lain dari bakteri endofit.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anggara BS, Yuliani, Lisdiana L. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Endofit Penghasil Hormon *Indole Acetic Acid* dari Akar Tanaman Ubi Jalar. *LeteraBio* 3 (3): 160-167.
- Azevedo JL, Maccheroni Jr. W, Pereira JO, and Luiz de Araujo W. 2000. Endophytic microorganisms: A Review on Insect Control and Recent Advances on Tropical Plants. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 3 (1): 40-65.
- Desriani, Safira UMP, Bintang M, Rivai A, Lisdiyanti P. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Tanaman Binahong dan Katepeng China, (Online), *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3 (2): 89-93.
- Fatchiyah, Arumningtiyas EL, Widyarti S, dan Rahayu S. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Gaweco AS, and Thiel DHV. Detection of Hepatitis C Virus RNA by Semiquantitative Reverse Transcription PCR. *PCR in Bioanalysis, Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Germaine KJ, Liu X, Cabellos GG, Hogan JP, Ryan D, and Dowling DN. 2005. Bacterial Endophyte-Enhanced Phytoremediation of The Organochlorine Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *FEMS Microbiol Ecol*. 57 (2006): 302-310.
- Janarthine RS, Eganathan S, and Balasubramanian. 2010. Plant Growth Promoting of Endophytic *Bacillus cereus* Isolated From The Pneumatophores of *Avicennia marina*. *International Journal of Current Research*. Vol.5, pp.009-013.
- Koomnok C, Teamroong N, Rerkasem B, and Lumyong S. 2007. Diazotroph Endophytic Bacteria in Cultivated and Wild Rice in Thailand. *ScienceAsia* 33 (2007): 429-435.
- Rustamaji. 2009. *Aktivitas Enzim Katepsin dan Kolagenase dari Daging Ikan Bandeng (Chanos chanos Forskall) selama Periode Kemunduran Mutu Ikan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Kusumaningrum HI, Handayani L, Nurjanah S, dan Jenie BSLS. 2013. Pemilihan Metode Ekstraksi DNA dan Protokol Deteksi *Staphylococcus aureus* Menggunakan *Real-Time PCR*. *Prosiding Bidang: Mikrobiologi dan Keamanan Pangan*. Jember: 2013.
- Lind T, Thorland EC, and Sommer SS. 1996. Genomic Amplification with Transcript Sequencing (GAWTS). *PCR Sequencing Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Long HH, Schmidt DD, dan Baldwin IT. 2008. Native Bacterial Endophytes Promote Host Growth in a Species-Specific Manner; Phytohormone Manipulations Do Not Result in Common Growth Responses. *Journal PLoS ONE*. 3 (7): 2702.
- Mulyani Y, Purwanto A, dan Nurruhwati I. 2011. *Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas (Cyprinus carpio L.)*. Jatinangor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran.
- Njoloma JP. 2006. Establishment Mechanism of Nitrogen Fixing System by Endophytic Bacteria in The Japanese Sugarcane Plant. *Dissertation*. Tidak Dipublikasikan. Japan: The United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University.
- Pangastuti A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan BasaGen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*. 7 (3): 292-296.
- Pelczar MJ, dan Chan ECS. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 1*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Sambrook J, and Russel DW. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, dan Swings J. 1996. Polyphasic Taxonomy, A Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews*. 60 (2): 407-438.
- Wilson K. 1997. *Preparation of Genomic DNA from Bacteria* dalam Ausubel, F.M, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., dan Struhl K. (Eds). 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Willey & Sons, Inc.
- Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, dan Yuen KY. 2008. Then and Now: Use of 16S rDNA Gene Sequencing for Bacterial Identification and Discovery of Novel Bacteria in Clinical Microbiology Laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14 (10): 908-934.
- Wu Z, Wang X, and Blomquist G. 2002. Evaluation of PCR Primers and PCR Conditions for Specific Detection of Common Airborne Fungi. *J. Environ. Monit* (4): 377-382.