

## Identifikasi Isolat Bakteri Endofit B2 dan B3 dari Akar Tanaman Ubi Jalar Berdasarkan Sekuens 16S rDNA

### *Identification of Endophytic Bacteria Isolate B2 and B3 from Sweet Potato's Root Based on Sequence 16S rDNA*

Hilda Zumrona \*, Yuliani, Lisa Lisdiana

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

\* e-mail: hilda.zumrona@gmail.com

#### ABSTRAK

Isolat bakteri endofit B2 dan B3 merupakan bakteri endofit yang dapat menghasilkan hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) yang diisolasi dari akar tanaman ubi jalar varietas Papua Patippi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri tersebut sampai tingkat spesies berdasarkan sekuens 16S rDNA dan mengetahui urutan basa yang lestari dan beragam dari sekuens 16S rDNA bakteri uji. Teknik identifikasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis sekuens 16S rDNA. Metode penelitian yang digunakan meliputi isolasi DNA dengan menggunakan metode CTAB/NaCl yang dimodifikasi, visualisasi DNA dengan elektroforesis gel agarose, amplifikasi sekuens 16S rDNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), serta sekuensing. Identifikasi dilakukan berdasarkan indeks similaritas sekuens 16S rDNA bakteri uji dengan sekuens 16S rDNA strain acuan yang diperoleh dari *GenBank* NCBI. Suatu isolat bakteri digolongkan dalam satu spesies jika memiliki indeks similaritas sekuens 16S rDNA sebesar  $\geq 99\%$  dengan sekuens acuan di *GenBank*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat B2 teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* (JN628977) dengan indeks similaritas sebesar 100% dan jumlah basa nukleotida yang beragam sebesar 0 dari 1432, dan isolat B3 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479) dengan indeks similaritas sebesar 100% dan jumlah basa nukleotida yang beragam sebesar 0 dari 1415.

**Kata kunci:** bakteri endofit penghasil IAA; identifikasi; sekuens 16S rDNA

#### ABSTRACT

*Endophytic bacteria isolate B2 and B3 is IAA-producing endophytic bacteria which is isolated from sweet potato's root varieties Papua Patippi. This study aimed to identify species of bacterial isolate based on sequence 16S rDNA and determine the conserve sequence and diverse sequence from 16S rDNA sequences of bacterial isolate. This research using analysis of 16S rDNA sequences to identify. The methods used include DNA isolation using CTAB/NaCl modified, visualization of DNA by gel agarose electrophoresis, amplification of 16S rDNA sequences using Polymerase Chain Reaction (PCR), and sequencing. Identification was done based on similarity index of 16S rDNA sequences bacterial with 16S rDNA reference strains which is obtained from GenBank NCBI. A bacterial isolates was classified within a species if it has similarity index of 16S rDNA sequence  $\geq 99\%$  with reference sequences in GenBank. The results showed that isolates B2 were identified as *Bacillus thuringiensis* (JN628977) with similarity index 100% and number of diverse nucleotide bases is 0/1432, and isolates B3 were identified as *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479) with similarity index of 100% and number of diverse nucleotide bases is 0/1415.*

**Key words:** IAA-producing endophytic bacteria; identification; 16S rDNA sequences

#### PENDAHULUAN

Bakteri endofit yaitu bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman dan tidak merugikan inangnya (Miliute dan Buzaitė, 2011). Bakteri endofit memberikan beberapa keuntungan bagi tanaman, antara lain dapat memproduksi zat pengatur tumbuh seperti *Indole Acetic Acid* (IAA), menginduksi ketahanan tanaman terhadap serangan patogen (Ryan *et al.*, 2007; Taghavi *et al.*, 2008), dapat melarutkan fosfat (Bandara *et al.*, 2006), memfiksasi nitrogen, meningkatkan resistensi terhadap kekeringan, dan mampu

bertahan di bawah cekaman tekanan osmosis (Khan dan Doty, 2009).

Bakteri endofit dapat ditemukan membentuk koloni pada beberapa bagian tanaman, misalnya akar, batang, daun, buah, bunga, dan biji. Isolat bakteri endofit B2 dan B3 merupakan bakteri endofit yang mampu memproduksi hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) yang diisolasi dari akar ubi jalar varietas Papua Patippi (Anggara *et al.*, 2014). Karakterisasi awal kedua isolat tersebut menunjukkan adanya 2 karakter yang berbeda dan memiliki potensi yang berbeda dalam menghasilkan IAA. Berdasarkan hasil tersebut,

diduga kedua isolat bakteri tersebut tergolong dalam genus yang berbeda (Benito, 2005).

Potensi kedua isolat bakteri endofit tersebut dalam menghasilkan IAA dapat dimanfaatkan di lapang sebagai *Plant Growth Promotion* (PGP). Salah satu syarat supaya bakteri dapat diaplikasikan di lapangan adalah telah dilakukan identifikasi. Identifikasi bersifat esensial untuk mengetahui peranannya dalam ekosistem (Emerson *et al.*, 2008).

Identifikasi berdasarkan sekuens 16S rDNA didasarkan pada tingkat similaritas sekuens isolat bakteri dengan sekuens 16S rDNA acuan (Hestiningtyas, 2008). Kelebihan identifikasi menggunakan analisis sekuens 16S rDNA adalah urutan basa nitrogen pada hampir semua spesies bakteri telah berhasil ditentukan sehingga bisa dijadikan acuan dalam identifikasi, urutan nukleotida pada gen 16S rDNA memiliki keragaman intraspesifik yang lebih rendah dibandingkan gen pengkode protein yang lain, dan sekuens 16S rDNA memiliki bagian yang bersifat yang lestari (Acinas *et al.*, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri tersebut sampai tingkat spesies berdasarkan sekuens 16S rDNA dan mengetahui urutan basa yang lestari dan beragam dari sekuens 16S rDNA bakteri uji.

## BAHAN DAN METODE

Kultur bakteri endofit B2 dan B3 diremajakan dalam media NA (*Nutrient Agar*) dengan waktu inkubasi 24 jam pada suhu 30°C. Kultur bakteri selanjutnya diremajakan dalam media LB (*Luria Bertani*) 1 ml lalu diremajakan lagi dalam media LB (*Luria Bertani*) 5 ml dan diinkubasi. Kultur bakteri selanjutnya dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA dilakukan dengan metode CTAB/NaCl (Ausubel *et al.*, 1995) yang dimodifikasi. Pengumpulan pellet dilakukan dengan cara mensentrifugasi kultur bakteri dengan kecepatan 3000 g pada suhu 4°C selama 2 menit. Pellet selanjutnya diresuspensi dengan buffer TE sebanyak 573 µl kemudian ditambahkan 15 µl SDS 20% dan 12 µl proteinase K 20 mg/ml. Suspensi selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam kemudian ditambahkan 100 µl NaCl 5 M dan 80 µl larutan CTAB/NaCl, lalu dihomogenkan. Suspensi selanjutnya diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Larutan P:C:I (25:24:1) ditambahkan dengan perbandingan 1:1, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3.600 g selama 5 menit suhu 4°C. *Upper fase* dipindahkan ke *tube* 1,5 ml steril, lalu ditambahkan C:I (24:1) perbandingan 1:1 kemudian disentrifugasi 3.600 g selama 5 menit pada suhu 4°C. *Upper fase*

dipindahkan dalam *tube* steril selanjutnya ditambahkan isopropanol 0,6 vol lalu disentrifugasi 3.600 g selama 5 menit pada suhu 4°C. Pellet diresuspensi dengan etanol 70% lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3.600 g selama 5 menit pada suhu ruang. Supernatan dibuang dan ditunggu sampai semua sisa etanol menguap. Pellet kemudian diresuspensi dengan 50 µl buffer TE. Sampel selanjutnya disimpan pada suhu 4°C sampai dilakukan analisis lebih lanjut.

Campuran reaksi yang digunakan untuk amplifikasi sekuens 16S rDNA yaitu *ready to go* dengan menggunakan genom bakteri sebagai DNA *template*. Volume akhir satu tabung *ready to go* ialah 25 µl. Campuran tersebut terdiri dari DNA *template* 2 µl, primer *forward* 1 µl, primer *reverse* 1 µl, PCR mix (*All Gene*) 12,5 µl, dan *nuclease free water* 8,5 µl. Primer yang digunakan yaitu primer *forward* 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') dan primer *reverse* 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTCTGA-3').

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan PCR (*My Cycler Thermal cycler*, Bio-Rad) yang diprogram dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal DNA *template* dengan menggunakan suhu 94°C selama 4 menit; diikuti dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi selama 1 menit suhu 94°C, *annealing* selama 1 menit suhu 50°C, dan ekstensi selama 2 menit suhu 72°C; ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 3 menit; lalu suhu diatur 4°C dan siap untuk dilihat hasilnya. Amplikon divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dengan penanda 1kb DNA *ladder*.

Sekuensing 16S rDNA dilakukan di Laboratorium Genetika dan Molekuler Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dengan menggunakan *big dye terminator cycle sequencing kit* dan 310 DNA *sequencer* (Perkin-Elmer). Tahapan pelaksanaan *sequencing* dilakukan sesuai dengan petunjuk operasional 310 ABI PRISM DNA *Sequencer* Perkin Elmer. Primer yang digunakan yaitu 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTCTGA-3').

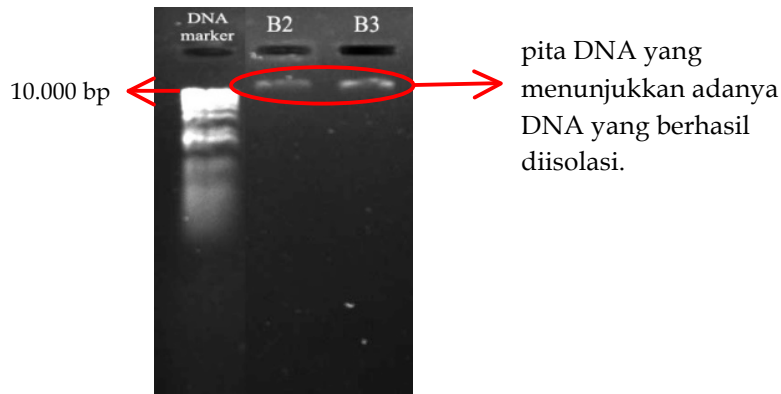
*Alignment* sekuens 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan program ClustalX. Pohon filogeni dikonstruksi dengan membandingkan sekuens 16S rDNA isolat bakteri endofit B2 dan B3 dengan sekuens acuan yang diperoleh dari GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pohon filogeni dikonstruksi menggunakan *Phylip* Version 3.695 menggunakan algoritma *Neighbor-joining*. Hubungan kekerabatan ditentukan dengan metode *Juke and Cantor* menggunakan program *Phydit*. Pohon filogeni divisualisasi dengan menggunakan program *TreeView*.

**HASIL**

Visualisasi DNA hasil isolasi pada gel agarose 0,8% menunjukkan adanya pita pada gel agarose (Gambar 1). Pita yang terbentuk menunjukkan adanya DNA yang berhasil diisolasi dengan metode CTAB/NaCl. DNA yang diperoleh selanjutnya diukur konsentrasi dan

tingkat kemurniannya dengan menggunakan metode spektrofotometri. Hasil pengukuran kuantitatif disajikan pada Tabel 1.

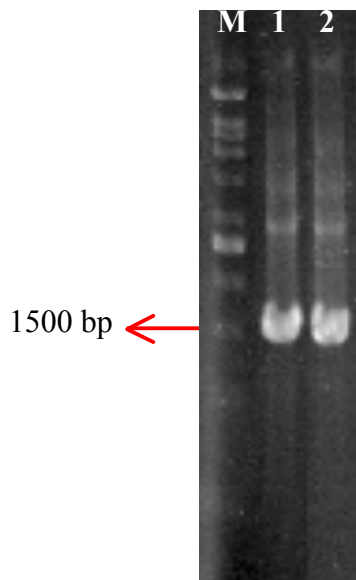
Pita yang terbentuk menunjukkan adanya DNA yang berhasil diisolasi dengan metode CTAB/NaCl. Sampel DNA isolat B3 menunjukkan pita yang lebih tebal dan jelas dibandingkan dengan sampel DNA isolat B2.



**Gambar 1.** Visualisasi DNA hasil isolasi pada gel agarose 0,8%

**Tabel 1.** Hasil uji kuantitatif sampel DNA dengan menggunakan metode spektrofotometri

| Kode Isolat | Nucleic Acid Conc. (ng/μl) | Tingkat Kemurnian |         | Standart Tingkat Kemurnian |           |
|-------------|----------------------------|-------------------|---------|----------------------------|-----------|
|             |                            | 260/280           | 260/230 | 260/280                    | 260/230   |
| B2          | 23,8                       | 1,75              | 1,49    | 1,8 - 2,0                  | 2,0 - 2,2 |
| B3          | 26,2                       | 1,78              | 1,77    |                            |           |



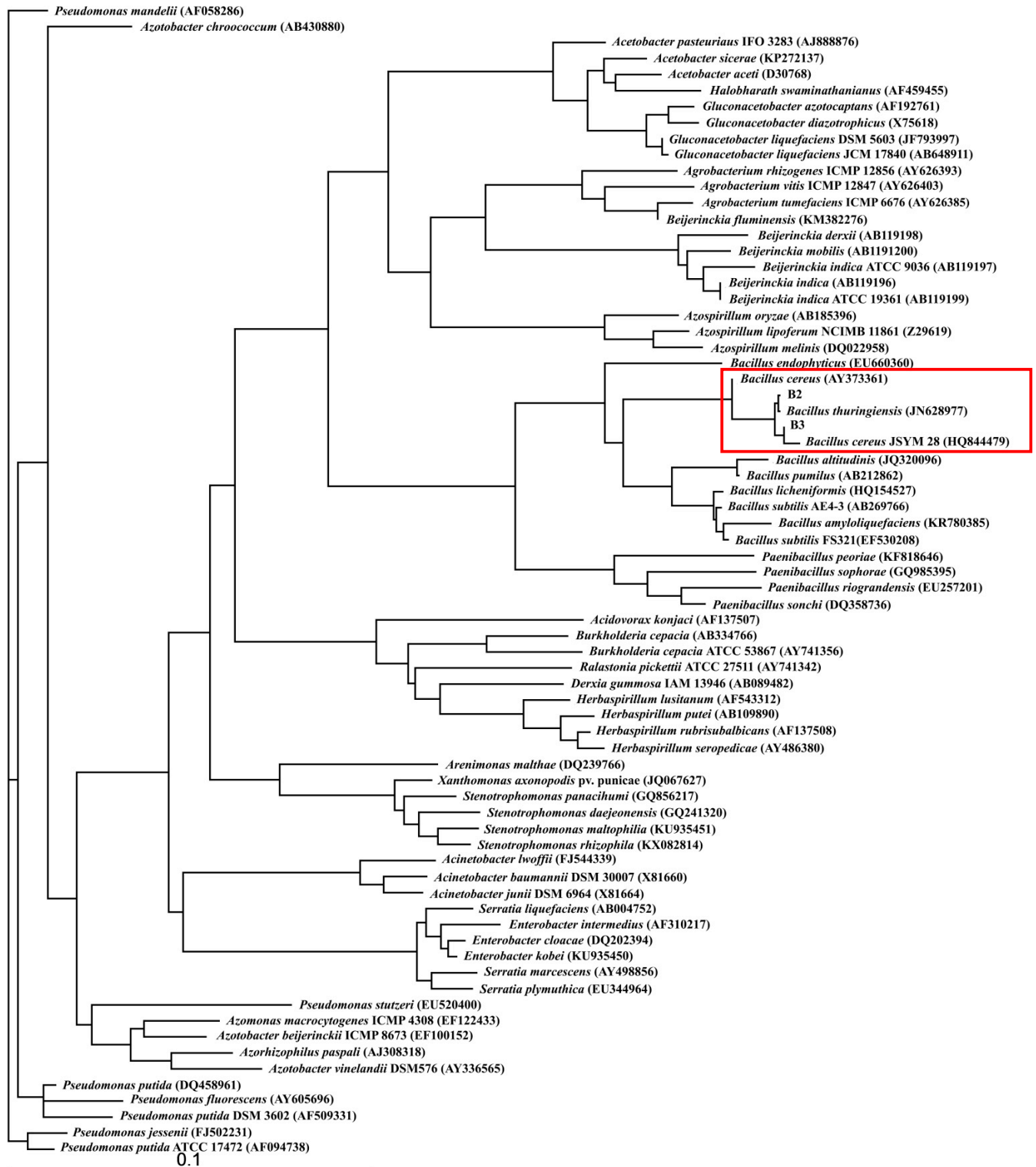
**Gambar 2.** Visualisasi amplicon 16S rDNA pada gel agarose 1%. (M) pita DNA dari marker DNA ladder berukuran 1 kb; (1) pita DNA amplicon isolat B2 yang sejajar dengan marker pada posisi 1500 bp; (2) pita DNA amplicon isolat B3 yang sejajar dengan marker pada posisi 1500 bp

Berdasarkan Tabel 1., sampel DNA isolat B3 memiliki konsentrasi dan kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan sampel DNA isolat B2. Sampel DNA isolat B2 memiliki nilai konsentrasi DNA sebesar 23,8 ng/μl dengan tingkat

kemurnian sebesar 1,75 ( $A_{260/280}$ ) dan sebesar 1,49 ( $A_{260/230}$ ). Isolat B3 memiliki konsentrasi DNA sebesar 26,2 ng/μl dengan tingkat kemurnian 1,78 ( $A_{260/280}$ ) dan sebesar 1,77 ( $A_{260/230}$ ).

Visualisasi amplikon sekuens 16S rDNA disajikan pada Gambar 2. Hasil visualisasi menunjukkan adanya pita DNA yang sejajar dengan marker pada ukuran 1500 bp.

Hasil konstruksi pohon filogeni menunjukkan kedua isolat bakteri endofit berada dalam satu *clade* dengan *Bacillus* (Gambar 3).



Gambar 3. Pohon filogeni isolat bakteri endofit B2 dan B3 dengan strain bakteri acuan

Perhitungan indeks similaritas menunjukkan kedua isolat bakteri memiliki kekerabatan dengan spesies yang berbeda

(Tabel 2). isolat B2 teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* (JN628977) dengan indeks similaritas sebesar 100% dan jumlah sekuens berbeda sebesar 0/1432. Isolat B3 teridentifikasi

sebagai *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479) dengan indeks similaritas 100% dengan jumlah sekuens berbeda sebesar 0/1415.

### PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit B2 dan B3 teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* (JN628977) dan *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479) yang hidup dalam akar ubi jalar varietas Papua Patippi. Isolat bakteri endofit B2 teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* (JN628977) dengan indeks similaritas sebesar 100% dan memiliki 0/1432 sekuens yang berbeda. Indeks similaritas yang mencapai 100% menandakan bahwa bakteri endofit isolat B2 merupakan spesies yang sama dengan *Bacillus thuringiensis* (JN628977) dan bukan merupakan strain baru. Bakteri endofit isolat B3 memiliki indeks similaritas sebesar 100% dengan *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479) dan memiliki 0/1415 sekuens yang berbeda. Indeks similaritas yang mencapai 100% menginformasikan bahwa bakteri endofit isolat B3 teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479) dan bukan merupakan strain baru. Menurut Janda dan Abbott (2007), suatu isolat bakteri teridentifikasi dalam satu spesies jika memiliki nilai similaritas minimal 99% dan idealnya adalah 99,5%.

Genus bakteri endofit yang banyak ditemukan pada akar tanaman antara lain *Agrobacterium*, *Aneurinibacillus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, dan *Sporolactobacillus* (Souza *et al.*, 2013). *Bacillus* merupakan salah satu genus bakteri endofit yang banyak ditemukan pada tanaman.

*Bacillus cereus* merupakan salah satu bakteri yang hidup sebagai endofit pada beberapa tanaman. *Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri tanah yang biasa digunakan sebagai biopestisida (Mbai *et al.*, 2013). Beberapa penelitian menemukan keberadaan *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus cereus* sebagai bakteri endofit dalam tanaman. *Bacillus thuringiensis* juga ditemukan pada akar tanaman padi Basmati Kenya (Mbai *et al.*, 2013). Zhao *et al.* (2011) melaporkan *Bacillus cereus* hidup sebagai endofit pada nodul akar *Sophora alopecuroides*. Penelitian lain menunjukkan bahwa *Bacillus cereus* hidup dalam akar tanaman ubi jalar (*Ipomea batatas* (L.) Lam) (Dawwam *et al.*, 2013).

*Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus cereus* memiliki beberapa manfaat bagi tanaman. Ali dan Vora (2014) melaporkan bahwa *B. thuringiensis* yang hidup sebagai endofit pada daun *Withania somnifera* terbukti mampu memproduksi *Indole-3-*

*Acetic Acid* (IAA). Screening *Bacillus thuringiensis* yang hidup pada akar padi Basmati Kenya menunjukkan bahwa bakteri tersebut berpotensi dalam melarutkan fosfat dan memecah urea (Mbai *et al.*, 2013). *Bacillus cereus* memiliki aktivitas anti mikrobial melawan jamur patogen *Pythium myriotylum* Drechsler penyebab penyakit busuk akar (Chen *et al.*, 2014). *Bacillus cereus* dapat memproduksi IAA dan melarutkan fosfat (Zhao *et al.*, 2011; Dawwam *et al.*, 2013) serta mampu memproduksi siderophore dan menambat nitrogen (Zhao *et al.*, 2011).

### SIMPULAN

Identifikasi bakteri endofit B2 dan B3 dilakukan berdasarkan analisis sekuens 16S rDNA. Bakteri endofit B2 teridentifikasi sebagai *Bacillus thuringiensis* (JN628977) dengan indeks similaritas sebesar 100%. Bakteri endofit B3 teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479) dengan indeks similaritas sebesar 100%.

Urutan basa nukleotida yang lestari dan beragam dapat dilihat dari jumlah basa nukleotida yang berbeda. Bakteri endofit B2 memiliki jumlah basa nukleotida yang beragam sebesar 0 dan jumlah urutan basa yang lestari sebanyak 1432 dengan *Bacillus thuringiensis* (JN628977). Bakteri endofit B3 memiliki jumlah basa nukleotida yang beragam sebesar 0 dan jumlah urutan basa yang lestari sebanyak 1415 dengan *Bacillus cereus* JSYM 28 (HQ844479).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada: Bapak Agus, Ibu Retno dan Ibu Silvi dari Balai Besar Karantina Pertanian Surabaya atas bantuannya dalam proses *gel doc* hasil isolasi DNA; Bapak Mahrus Ismail, M.Si. selaku laboran Lab. Genetika dan Molekuler Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan bantuan selama proses PCR dan sekuensing; dan Ibu Laura Navika Yamani, M.Si., Ph.D. selaku peneliti di Lab. Hepatitis *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan dalam proses pengolahan sekuens DNA.

### DAFTAR PUSTAKA

- Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, dan Polz MF, 2004. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operon. *Journal of Bacteriology*. (9) 186: 2629-2635.
- Ali MM dan Vora D, 2014. *Bacillus thuringiensis* as Endophyte of Medical Plants: Auxin Producing

- Biopesticide. *International Research Journal of Environmental Science*. (9) 3: 27-31.
- Anggara BS, Yuliani dan Lisdiana L, 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Penghasil Hormon *Indole Acetic Acid* (IAA) dari Akar Tanaman Ubi Jalar (*Ipomea batatas*). *Lentera Bio*. (3) 3: 160-167.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J, dan Struhl K, 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Bandara WMMS, Seneviratne G dan Kulasoorya SA, 2006. Interaction among Endophytic Bacteria and Fungi: Effects and Potentials. *J. Bioschi*. (5) 31: 645-650.
- Benito AG, 2005. *Application of Molecular Techniques for Identification and Enumeration of Acetic Acid Bacteria*. Tarragona: Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia.
- Chen T, Chen Z, Ma GH, Du BH, Shen B, Ding YQ dan Xu K, 2014. Diversity and Potential Application of Endophytic Bacteria in Ginger. *Genetics and Molecular Research*. (3) 13: 4918-4931.
- Dawwam GE, Elbeltagy A, Emara HM, Abbas IH dan Hassan MM, 2013. Beneficial Effect of Plant Growth Promoting Bacteria Isolated from the Roots of Potato Plant. *Annals of Agricultural Science*. (2) 58: 195-201.
- Emerson D, Agulto L, Liu H dan Liu L, 2008. Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience*. (10) 58: 925-936.
- Hestiningtyas M, 2008. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Berbagai Makanan dan Minuman Tradisional dan Identifikasi Isolat-Isolatnya Secara Molekuler Menggunakan DNA Ribosomal 16S. *Skripsi* tidak dipublikasikan. Departemen Farmasi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.
- Janda JM dan Abbott SL, 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. (9) 45: 2760-2764.
- Khan Z dan Doty SL, 2009. Characterization of Bacterial Endophytes of Sweet Potato Plants. *Journal Plant Soil*. DOI 10.1007/s11104-009-9908: 1-10.
- Mbai FN, Magiri EN, Matiru VN, Ng'ang J dan Nyambati VCS, 2013. Isolation and Characterisation of Bacterial Root Endophytes with Potential to Enhance Plant Growth from Kenya Basmati Rice. *American International Journal of Contemporary Research*. (4) 3: 25-40.
- Miliute I dan Buzaitė O, 2011. IAA Production and Other Plant Growth Promoting Trait of Endophytic Bacteria from Apple Tree. *Biologija*. (2) 57: 98-102.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ dan Dowling DN, 2007. Bacterial Endophytes: Recent Developments and Application. *FEMS Microbiology Letter*. (1) 278: 1-9.
- Souza SA, Xavier AA, Costa MR, Cardoso AMS, Pereira MCT dan Nietsche S, 2013. Endophytic Bacterial Diversity in Banana 'Prata Ana' (*Musa spp.*) Root. *Genetics and Molecular Biology*. (2) 36: 252-264.
- Taghavi S, Grafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangonsveld J dan van der Leile D, 2008. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Polar Trees. *Applied and Environmental Microbiology*. (3) 75: 748-757.
- Zhao L, Xu Y, Sun R, Deng Z, Yang W dan Wei G, 2011. Identification and Characterization of the Endophytic Plant Growth Promoter *Bacillus cereus* Strain MQ23 Isolated from *Sophora alopecuroides* Root Nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*. (42) 2011: 567-575.