

KOMUNIKASI SINGKAT

Identifikasi Rizobakteria Asal Tanaman Cabai Berdasarkan Sekuen Gen 16S rRNA

Identification of Rhizobacteria from Chillipepper Based on 16S rRNA Gene Sequence

Jumsu Trisno*, Yusniwati
Universitas Andalas, Padang 25162

ABSTRAK

Rizobakteria dilaporkan memiliki potensi sebagai agens penginduksi ketahanan sistemik pada berbagai tanaman inang. Lima isolat rizobakteria (RbTD1-3, RbTD1-8, RbPdGN-3, RbAg1-5, RbLPK1-9) berhasil diisolasi dari daerah perakaran tanaman cabai di Sumatera Barat. Identifikasi rizobakteria dilakukan menggunakan *polymerase chain reaction* dengan primer 27F dan 1525R yang mengamplifikasi daerah 16S rRNA. Fragmen DNA berukuran 1.5 kb berhasil teramplifikasi dari 4 isolat (RbLPK1-9, RbPdGN-3, RbTD1-3, RbTD1-8) dan digunakan untuk sekuensing. Analisis filogenetika berdasarkan sekuen nukleotida daerah 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat RbLPK1-9 memiliki kemiripan dengan *Pseudomonas fluorescens* Biotipe G (92%), sedangkan isolat RbTD1-3, RbTD1-8 dan RbPdGN-3 memiliki kemiripan dengan *Bacillus subtilis* 10407 (57%).

Kata kunci: *polymerase chain reaction*, rizobakteria, 16S rRNA

ABSTRACT

Rhizobacteria was reported to have a potential role as inducer of systemic resistance in several host plants. Five isolates of rhizobacteria (RbTD1-3, RbTD1-8, RbPdGN-3, RbAg1-5, RbLPK1-9) were isolated from rhizosphere of chillipepper plants in West Sumatera. Identification of rhizobacteria was conducted by polymerase chain reaction using primers 27F and 1525R which amplified 16S rRNA region. DNA fragment of 1.5 kb was successfully amplified from 4 isolates (RbLPK1-9, RbPdGN-3, RbTD1-3 and RbTD1-8) and subjected to direct sequencing. Phylogenetic analysis based-on 16S rRNA sequences showed that isolate RbLPK1-9 has a close relationship with *Pseudomonas fluorescens* Biotipe G (92%), whereas isolates RbTD1-3, RbTD1-8 and RbPdGN-3 have a close relationship with *Bacillus subtilis* 10407 (57%).

Key words: polymerase chain reaction, rhizobacteria, 16S rRNA

Pemanfaatan rizobakteria sebagai agens pengendali hayati sudah semakin luas diterapkan untuk mengatasi berbagai penyakit tumbuhan. Penelitian Aksoy dan Yilmaz (2008) menunjukkan *P. putida* bersifat antagonis terhadap cendawan *Polymyxa betae*, vektor *Beet necrotic vein yellow virus*, dan mampu menekan infeksi virus. Habazar *et al.*

*Alamat penulis korespondensi: Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang 25162
Tel: 075172701, Faks: 075172702, Surel: ano_trisno@yahoo.co.id

(2001) melaporkan *P. fluorescens* Pf 5 dapat mengurangi infeksi CMV, sedangkan Taufik *et al.* (2005) berhasil menekan infeksi *Cucumber mosaic virus* (CMV) dan *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) pada tanaman cabai dengan menggunakan *Bacillus subtilis* dan *B. stearrowthermopilus*. *Streptomyces* sp. galur lokal dapat melindungi tanaman ketimun dari infeksi CMV dengan mengurangi gejala mosaik 50-58% dan menghambat perkembangan virus sampai 85% (Galal 2006).

Ciri, sifat, dan perilaku rizobakteria yang akan digunakan sebagai agens pengendali hayati sangat penting untuk diketahui agar pemanfaatannya dapat tepat sasaran. Salah satu tahapan karakterisasi yang paling awal adalah identifikasi rizobakteria. Karakterisasi bakteri patogen umumnya dilakukan dengan pengujian sifat biokimia dan fisiologi, namun dewasa ini teknik *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan metode yang semakin banyak digunakan untuk deteksi, identifikasi, dan karakterisasi bakteri patogen. Identifikasi bakteri dengan teknik PCR umumnya menggunakan sekuen daerah 16S rRNA sebagai dasar identifikasi (Dorsch *et al.* 1994; Li dan De Boer 1995; Tavasoli *et al.* 2011).

Eksplorasi rizobakteria dari tanaman cabai di Sumatera Barat (daerah Tanah Datar, Padang, dan Limapuluh Koto) didapatkan 5 isolat, RbTD1-3, RbTD1-8, RbPdGN-3, RbAg1-5, dan RbLPK1-9, yang memiliki sifat morfologi dan fisiologi beragam (Tabel 1) tetapi belum diketahui identitasnya. Semua isolat memiliki bentuk koloni bulat, tetapi menunjukkan perbedaan pada warna dan permukaan koloni. Sifat fisiologi 5 isolat

tersebut juga beragam, isolat RbTD1-8, RbTD1-3, dan RbPdGN-3 memberikan reaksi Gram positif, sedangkan isolat RbLPK1-9 dan RbAg1-5 memberikan reaksi gram negatif. Hanya isolat RbLPK1-9 memberikan reaksi positif pada uji pigmen fluoresen, tetapi semua isolat tidak memberikan reaksi terhadap uji hipersensitif. Penelitian dilakukan dengan tujuan mengetahui identitas isolat-isolat rizobakteria tersebut berdasarkan pada analisis hasil sekuensing nukleotida.

Masing-masing isolat rizobakteria ditumbuhkan pada medium nutrien agar (NA) dengan metode gores dan diinkubasi selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dipindahkan ke dalam 50 mL medium nutrien broth (NB), diinkubasi selama 16 jam pada suhu 27 °C dengan kondisi digoyang pada kecepatan 105 g. Sebanyak 1 mL kultur rizobakteria dipindahkan ke dalam 250 mL medium NB baru, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27 °C dengan kondisi digoyang pada kecepatan 105 g. Kultur yang diperoleh digunakan pada tahapan isolasi DNA.

Isolasi DNA Rizobakteria

Sebanyak 2 mL kultur rizobakteria dimasukkan ke dalam tabung mikro kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 14 462 g selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh dilarutkan dengan 0.5 mL TE (Tris EDTA) dengan vortek, selanjutnya ditambahkan 40 µL SDS 10% dan 5 µL proteinase K (10 mg mL⁻¹). Campuran dibolak-balik hingga homogen, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Tahap selanjutnya ialah penambahan fenol:kloroform

Tabel 1 Karakter morfologi dan fisiologi isolat rizobakteria asal tanaman cabai dari daerah Sumatera Barat

Isolat	Morfologi koloni			Sifat fisiologi		
	Bentuk	Warna	Permukaan	Reaksi Gram	Pigmen fluorescens	Reaksi hipersensitif
RbTD1-8	Bulat	Putih	Cembung	+	-	-
RbTD1-3	Bulat	Kuning	Cembung	+	-	-
RbLPK1-9	Bulat	Krem	Datar	-	+	-
RbPdGN-3	Bulat	Krem	Cembung	+	-	-
RbAg1-5	Bulat	Putih	Datar	-	-	-

(1:1) sebanyak 1 kali volume larutan, dan sentrifugasi dengan kecepatan 14 462 g selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro baru, ditambahkan 1/10 volume Natrium asetat 3 M, kemudian ditambahkan 1 kali volume etanol dingin dan tabung dibolak-balik sampai kelihatan DNA terpresipitasi. Tabung disentrifugasi lagi pada kecepatan 14 462 g selama 1 menit hingga diperoleh pelet. Sebanyak 0.5 mL etanol (70%) dingin ditambahkan, tabung disentrifugasi kembali pada kecepatan 14 462 g selama 1 menit, kemudian pelet dikeringanginkan. Pelet dilarutkan dengan bufer TE, suspensi DNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

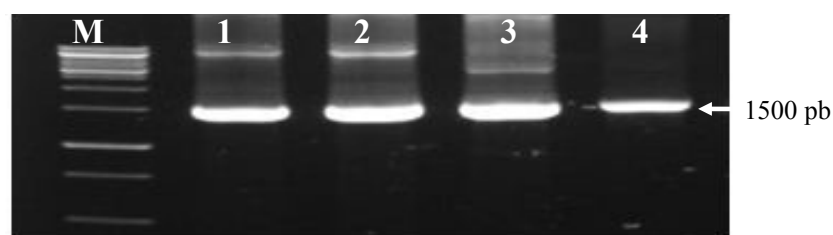
Amplifikasi PCR pada Daerah 16S rRNA

Primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC TCAG-3') dan 1525R (5'-AGAGTTTGATCM TGG CTCAG-3') digunakan untuk mengamplifikasi daerah 16S rRNA (Wowrik *et al.* 2005). Daerah gen ini banyak digunakan dalam filogenetika, klasifikasi, dan identifikasi untuk bakteri karena sifat keberadaannya yang ubikuitas dengan fungsi yang identik pada semua bakteri. Reaksi PCR untuk 25 µL total reaksi terdiri atas 2.5 µL bufer, 0.5 µL dNTPs (10 µM µL⁻¹), 1 µL masing-masing primer (10 µM µL⁻¹), 0.2 µL *Taq polymerase* dan 1 µL DNA (50 ng). Amplifikasi sebanyak 35 siklus pada mesin *thermal cycler* T1plus TM dengan tahapan denaturasi pada suhu 94 °C selama 4 menit, penempelan primer pada suhu 55 °C selama 1 menit, pemanjangan pada suhu 72 °C selama 2 menit, dan tahap pemanjangan terakhir pada suhu 72 °C selama 7 menit. Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa 1.0% dan divisualisasi menggunakan *UV transilluminator*.

Sekuensing dan Analisis Sekuen Nukleotida

Pita DNA hasil amplifikasi digunakan untuk sekuensing dengan metode *dideoxy nucleotide chain termination* menggunakan ABI-Prims 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) di PT. Charoen Pokphand Indonesia, Tbk, Jakarta. Hasil sekuensing disunting dengan program Bioedit V7.0.5 sebelum dilakukan analisis. Urutan nukleotida yang didapat selanjutnya digunakan untuk perbandingan dengan data sekuen yang ada di *GenBank* melalui program BLAST (<http://www.wbi.ac.uk>). Tingkat kesamaan dan pohon filogenetik dianalisis menggunakan program ClustalW.

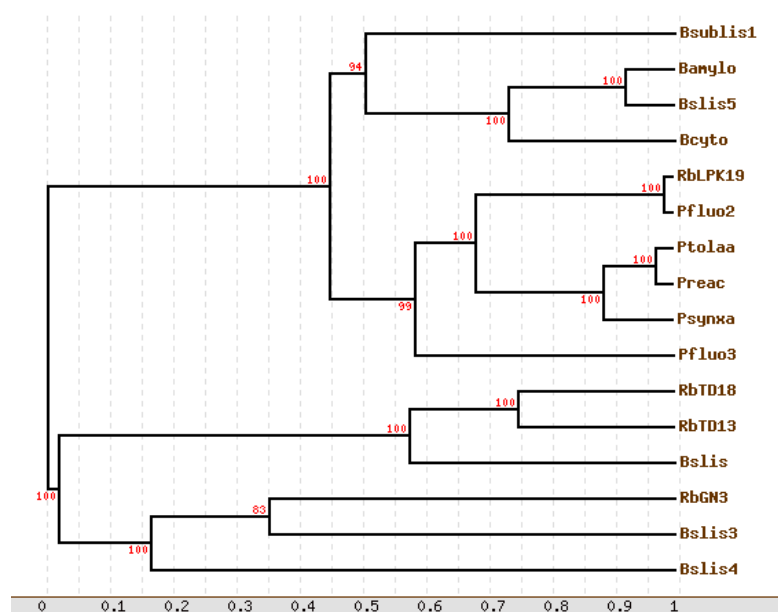
Isolasi DNA rizobakteria diperoleh total DNA yang baik (rata-rata konsentrasi 100 ng µL⁻¹) untuk isolat RbLPK1-9, RbGN-3, RbTD1-3, dan RbTD1-8, sedangkan untuk isolat RbAg1-5 tidak didapatkan DNA yang memadai untuk tahapan amplifikasi berikutnya (total DNA tidak tampak pada gel agarosa). Amplifikasi PCR keempat isolat rizobakteria menggunakan primer 27F dan 1525R menghasilkan pita DNA pada ukuran yang sama, yaitu sekitar 1500 pb (Gambar 1). Pohon filogenetik yang mengikutsertakan beberapa data sekuen *GenBank* sebagai perbandingan (Tabel 2) menunjukkan bahwa isolat RbLPK1-9 termasuk dalam kelompok *Pseudomonas* sedangkan isolat RbTD1-3, RbTD1-8, dan RbPdGN-3 termasuk dalam kelompok *Bacillus* (Gambar 2). Berdasarkan hasil BLAST diketahui bahwa isolat RbLPK1-9 mempunyai kemiripan 92%, dengan *Pseudomonas fluorescen* Biotipe G (No. Aseki: AJ308307.1), sedangkan isolat RbTD1-3, RbTD1-8 dan RbPdGN-3 hanya menunjukkan kemiripan sebesar 57% dengan *Bacillus subtilis* 10407 (No Aseki: JF834073.1).



Gambar 1 Hasil amplifikasi DNA rizobakteria asal tanaman cabai menggunakan primer 27F dan 1525R. 1, isolat RbTD1-8; 2, RbTD1-3; 3, RbLPK1-9; 4, RbPdGN-3; M, penanda DNA 1 kb.

Tabel 2 Daftar bakteri yang digunakan untuk analisis pohon filogenetik rizobakteria

Nama bakteri	Kode	Panjang sekuen nukleotida (pb)	No akses GenBank
<i>Bacillus subtilis</i> 10407	Bslis	658	JF834073.1
<i>Bacillus subtilis</i> I4	Bsublis1	1275	JN794569.1
<i>Bacillus amyloquefaciens</i> B5	Bamylo	1493	JN657256.1
<i>Bacillus cytotoxius</i> 08CEB44BAC	Bcyto	1598	JN790694.1
<i>Bacillus galur</i> sp4 (2011)	Bslis3	887	JF416653.1
<i>Bacillus subtilis</i> NNB-24	Bslis4	659	JN167994.1
<i>Bacillus subtilis</i> 10403	Bslis5	1472	JF834074.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotipe G	Pfluo2	1371	AJ308307.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotipe G	Pfluo3	4319	DI101057.1
<i>Pseudomonas tolaasii</i> NCPPB	Ptola	1371	AF320992
<i>Pseudomonas reactans</i>	Preac	1452	AF320987.1
<i>Pseudomonas synxantha</i>	Psynxa	1500	AF267911.1
Rizobakteria LPK19 asal cabai (A)	RbLPK19	574	-
Rizobakteria TD18 asal cabai (B)	RbTD18	574	-
Rizobakteria TD13 asal cabai (C)	RbTD13	562	-
Rizobakteria GN3 asal cabai (D)	RbGN3	570	-



Gambar 2 Pohon filogenetik rizobakteria dari pertanaman cabai di Sumatera Barat berdasarkan sekuen fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer 27F dan 1525R (daerah 16S rRNA).

Identifikasi rizobakteria asal tanaman cabai merupakan tahap awal karakterisasi rizobakteria dalam rangka mencari isolat yang berpotensi untuk digunakan sebagai agens pengendalian hayati atau agens penginduksi ketahanan terhadap berbagai penyakit. Keempat isolat rizobakteria (RbLPK1-9, RbTD1-3, RbTD1-8, dan RbPdGN-3) perlu diuji lebih lanjut untuk mengetahui potensinya

sebagai agens pengendalian hayati atau agens penginduksi ketahanan tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

Aksoy HM, Yilmaz NDK. 2008. Antagonistic effects of natural *Pseudomonas putida* biotypes on *Polymyxa betae* Keskin, the vector of *Beet necrotic yellow vein virus* in

- sugar beet. *J Plant Dis Protect.* 115(6):241-246.
- Dorsch M, Asbolt NJ, Cox PT, Goodman AE. 1994. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rRNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *J Appl Bacteriol.* 77(6):722-729. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb02825.x.
- Galal AM. 2006. Induction of systemic resistance in cucumber plant against *Cucumber mosaic cucumovirus* by local *Streptomyces* strains. *Plant Pathol J.* 5(3):343-349. doi: 10.3923/ppj.2006.343.349.
- Habazar T, Liswarni Y, Reflin, Darma E, Melinda. 2001. Pengaruh populasi *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* dan *Xanthomonas campestris* pv *glycines* pada benih kedelai terhadap keparahan penyakit pada bibit. Di dalam: *Prosiding Kongres XVI dan Seminar Nasional*; 2001 Agu 22-24; Bogor (ID): PFI. hlm123-127.
- Li XA, De Boer SH. 1995. Selection of polymerase chain reaction of *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus*. *Phytopathology.* 85(8):837-842. doi: 10.1094/Phyto-85-837.
- Taufik M, Hidayat SH, Suastika G, Sumaraw SM, Sujiprihati S. 2005. Kajian *plant growth promoting rhizobacteria* sebagai agens proteksi *Cucumber mosaic virus* dan *Chili veinal mottle virus* pada cabai. *Hayati J Biosci.* 12(4):139-144.
- Tavasoli E, Marefat AR, Hassanzadet N. 2011. Identity and genetic diversity of *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanyan, Iran. *Afr J Plant Sci.* 5(6):329-336.
- Wowrik B, Kerkhof L, Zylstra GJ, Kukor JJ. 2005. Identification of unique type II Polyketid synthase gene in soil. *Appl Environ Microbiol.* 71(5):2232-2238. doi: 10.1128/AEM.71.5.2232-2238.2005.