

Keragaman Genetik Rizobakteri Penghasil Asam Indol Asetat Berdasarkan 16S rRNA dan *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

(Genetic Diversity of Indole Acetic Acid-Producing Rhizobacteria Based on 16S rRNA and *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

Puji Lestari^{1*}, Dwi N. Susilowati¹, I Made Samudra¹, Tri P. Priyatno¹, Kristianto Nugroho¹, Whyranti Nurarfa², Inda Setyawati², dan Yadi Suryadi¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: plestari129@yahoo.com

²Departemen Biokimia IPB, Fakultas FMIPA, Gedung FAPET Jalan Agatis Wing 5 Level 5, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 1 Februari 2017; Direvisi: 20 Maret 2017; Diterima: 25 April 2017

ABSTRACT

Indole acetic acid (IAA) can be produced by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). To find potential sources of PGPR along with clear information on intra and interspecies relationship, the genetic diversity of Indonesian indigenous isolates need to be investigated. This study aimed to determine genetic diversity of Indonesian indigenous rhizobacteria producing IAA using 16S rRNA and its complementary method, ARDRA. The IAA content, macroscopic morphology, and 16S rRNA and ARDRA-*RsaI* of ICABIOGRAD bacterial isolates were analysed. A total of fourteen rhizobacterial isolates produced IAA in a range of 5.24–37.69 $\mu\text{g/ml}$ and SM1 was the most superior one. Morphological characteristics of rhizobacterial colonies supported the variation of bacterial strain producing IAA. Eight selected isolates were identified as *Bacillus* species with homology of 96–99%. Five isolates (SM1, JP4, KP3, MB2, and CP3) were identified as *B. subtilis*, SC2 was being as *B. amyloliquefaciens*, BL2 was close to *B. velezensis*, and JP3 had a high homology with *Brevundimonas olei*. The eight rhizobacterial isolates were closely related to the reference bacterial strains of the same species. The ARDRA-*RsaI* analysis revealed five phylotypes with unique fingerprint patterns, of which, CP3, MB 2, and KP 3 were in the same phyloptype. The close relation of *Bacillus* species was shown by phyloptype 5 (*B. subtilis* SM1 and *B. velezensis* BL2), presumably far distant from *B. amyloliquefaciens* SC2 (phyloptype 4), and JP 3 was grouped in the genus *Brevundimonas* (phyloptype 3). The genetic diversity of rhizobacteria isolates producing IAA was considerably low based on 16S-rRNA and ARDRA.

Keywords: IAA, ARDRA, plant growth promoting rhizobacteria, 16S rRNA, genetic diversity.

ABSTRAK

Asam indol asetat (AIA) dapat dihasilkan oleh bakteri rizosfer/rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman (PPT). Keragaman genetik isolat bakteri PPT indigenous Indonesia perlu diinvestigasi untuk mencari sumber potensial agen PPT dengan informasi kekerabatan intra dan interspesies yang jelas. Karena itu penelitian ini bertujuan mengetahui keragaman genetik rizobakteri penghasil AIA *indigenous* Indonesia dengan gen 16S rRNA, dilengkapi dengan ARDRA. Koleksi isolat bakteri BB Biogen diidentifikasi kandungan AIA-nya, morfologi secara makroskopis dan sekuensing pada sekuen 16S rRNA dan ARDRA. Total empat belas isolat rizobakteri memiliki kandungan AIA dalam kisaran 5,24–37,69 $\mu\text{g/ml}$ dan tertinggi pada SM1. Karakteristik morfologi koloni rizobakteri mendukung variasi strain bakteri penghasil AIA. Delapan isolat terpilih diidentifikasi sebagai spesies *Bacillus* dengan homologi 96–99%. Lima isolat (SM1, JP4, KP3, MB2, dan CP3) diidentifikasikan sebagai *B. subtilis*, SC2 sebagai *B. amyloliquefaciens*, BL2 dekat dengan *B. velezensis*, dan JP3 memiliki homologi tinggi dengan *Brevundimonas olei*. Delapan isolat rizobakteri tersebut berkerabat dekat dengan strain bakteri referensi yang memiliki kesamaan spesies. Analisis ARDRA-*RsaI* menghasilkan lima filotipe dengan keunikan pola sidik jari. Isolat CP3, MB 2, dan KP 3 berada dalam satu filotipe. Kedekatan isolat dalam *Bacillus* sp. digambarkan oleh filotipe 5 (*B. subtilis* SM1 dan *B. velezensis* BL2) yang diduga jauh dari *B. amyloliquefaciens* SC2 (filotipe 4) dan JP 3 pada genus *Brevundimonas* (filotipe 3). Keragaman genetik isolat rizobakteri penghasil AIA terhitung rendah berdasarkan 16S-rRNA dan ARDRA-*RsaI*.

Kata kunci: AIA, ARDRA, rizobakteri pemacu pertumbuhan tanaman, 16S rRNA, keragaman genetik.

PENDAHULUAN

Asam indol asetat (AIA) merupakan salah satu hormon pertumbuhan auksin yang penting pada tanaman. AIA berperan dalam proses fisiologi seperti pembelahan dan pembesaran sel, diferensiasi jaringan, dan respon terhadap cahaya dan gravitasi (Leveau dan Lindow 2005). AIA secara umum dihasilkan dari metabolisme L-triptofan yang banyak diproduksi mikroba termasuk rizobakteri penghasil hormon pertumbuhan sebagai pemacu pertumbuhan tanaman/*(plant growth-promoting rizobacteria PPT)*. Rizobakteri ini hidup di rizosfer melalui mekanisme terkait PPT yang berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman melalui interaksi mikroba-tanaman (Duca et al. 2014). Mekanisme pemacu pertumbuhan tanaman oleh rizobakteri PPT adalah melalui mode fiksasi diazotropik nitrogen, pelarutan fosfat, ketahanan sistematis terhadap penyakit, dan memproduksi fitohormon (Banerjee et al. 2010; Zhang et al. 2010). Bakteri PPT ini mensintesis hormon tumbuh termasuk auksin, bertujuan mengarahkan proses fisiologis tanaman inang demi kepentingan mikroba tersebut (Shih-Yung 2010). Dengan demikian bakteri rizosfer/rizobakteri ini merupakan sumber yang berlimpah untuk penemuan isolat PPT.

Bakteri penghasil PPT banyak diidentifikasi berasal dari spesies *Bacillus* sp., *Enterobacter*, *Pseudomonas* sp., *Rhizobium*, dan lainnya seperti *B. subtilis*, *B. amyloliquefacien*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, dan *E. coacae*. Bakteri PPT tersebut mensintesis AIA melalui *pathway* spesifik yang mendominasi bagian akar tumbuhan (Mohite 2013). Mengingat spesies bakteri PPT merupakan salah satu komponen utama keanekaragaman ekosistem yang menyediakan informasi genetik, kestabilan struktur populasinya di ekosistem perlu dijaga.

Keragaman rizobakteri penghasil PPT dalam ekosistem pertanian penting sebagai sumber bakteri yang membantu memacu pertumbuhan tanaman dan potensinya perlu dioptimalkan. Karakterisasi fenotipe telah lama dilakukan untuk klasifikasi bakteri, namun karakter morfologi makroskopisnya masih belum presisi baik dalam membedakan antarisolat/strain maupun menentukan kekerabatan filogenetik. Analisis molekuler diketahui sangat informatif untuk menganalisis keragaman genetik bakteri, sehingga karakterisasi morfologi dan biokimia dan identifikasi molekuler bakteri yang diisolasi dapat mendukung klasifikasi dan arah pemanfaatannya (Islam et al. 2016; Majeed et al, 2015).

Asam ribonukleat ribosomal 16S ribosomal (16S rRNA) merupakan marka molekuler yang sering di-

manfaatkan untuk analisis keragaman genetik mikroba. Marka molekuler ini mengandung sekuen *conserve* yang merupakan sekuen dalam *array* unik relatif intra dan inter spesies. Gen rRNA dapat digunakan untuk analisis sekuen, *ribotyping*, dan analisis *restriction fragment length Polymorphism* (RFLP). Metode *ribotyping* memiliki prinsip pemotongan spesifik oleh enzim restriksi tertentu pada gen penyandi 16S rRNA hasil amplifikasi, sehingga diperoleh pola pita pemotongan yang khas untuk setiap jenis bakteri. Analisis RFLP pada 16S rRNA atau rRNA (*amplified rRNA restriction analysis/ARDRA*) merupakan teknik identifikasi strain yang penting untuk mengetahui keragaman genetik mikroba (Yang et al. 2007). Keragaman genetik berdasarkan 16S-ARDRA telah dilakukan untuk berbagai spesies bakteri seperti *Streptococcus*, *Lactobacillus*, dan *Mycobacterium*. Sampai saat ini pendekatan sekuensing dengan 16S rRNA dan ARDRA telah diaplikasikan untuk bakteri PPT (Bahri et al. 2009; Rameshkumar et al. 2012). Profil pemotongan hasil ARDRA dapat digunakan sebagai pustaka spesies bakteri tertentu (Hall et al. 2001). Penggalan informasi keragaman genetik bakteri penghasil AIA indigenous Indonesia dengan pendekatan ini masih sangat terbatas, terutama untuk kegiatan molekuler yang paralel dengan identifikasi isolat bakteri yang potensial menghasilkan AIA. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keragaman genetik rizobakteri penghasil AIA indigenous Indonesia dengan gen 16S rRNA, dilengkapi dengan ARDRA.

BAHAN DAN METODE

Materi Mikroba dan Peremajaan Isolat

Sebanyak empat belas isolat bakteri rizobakteri digunakan dalam penelitian ini. Isolat tersebut sebelumnya diisolasi dari lahan pertanian yang biasa ditanami singkong dan jagung di beberapa lokasi di Sukabumi, Jawa Barat pada tahun 2015 (Tabel 1). Semua isolat merupakan kultur koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian.

Isolat bakteri rizobakteri dalam koleksi diremajakan dengan cara menginokulasikan satu ose kultur stok ke dalam media *nutrient* agar pada cawan petri. Tiap isolat dibiarkan tumbuh pada suhu ruang selama lebih kurang 2 hari sampai muncul koloni berwarna dan berlendir (Patten dan Glick 2002). Koloni hasil peremajaan ini disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan untuk analisis selanjutnya.

Analisis keragaman genetik isolat yang diduga penghasil AIA dilakukan dengan sekuensing fragmen 16S rRNA yang juga digunakan untuk identifikasi

Tabel 1. Konsentrasi AIA dari empat belas isolat rizobakteri asal lahan pertanian di Sukabumi, Jawa Barat.

Isolat bakteri	Asal isolat (lokasi)	Konsentrasi AIA ($\mu\text{g/ml}$)
SM 1	Mekarsari, Cicurug	37,69 \pm 0,60
KP 2	Pakuwon, Parakansalak	6,60 \pm 0,11
SC 4	Cisalak, Kalapanunggal	11,17 \pm 0,0
SC 2	Cisalak, Kalapanunggal	9,67 \pm 0,0
BL 2	Pamuruyan	5,74 \pm 0,00
JP 4	Pakuwon, Parakansalak	5,24 \pm 0,10
MB 1	Bojong Genteng	9,99 \pm 0,05
JP 3	Pakuwon, Parungkuda	5,78 \pm 0,05
KP 3	Pakuwon, Parungkuda	18,28 \pm 0,05
TB 1	Bojong Genteng	5,64 \pm 0,05
MB 2	Bojong Genteng	5,49 \pm 1,16
CP 3	Pakuwon, Parungkuda	6,10 \pm 0,10
CP 4	Pakuwon, Parungkuda	7,10 \pm 0,05
TB 2	Bojong Longok	10,84 \pm 0,30

spesies. Untuk melengkapi informasi sekuen 16S rRNA, analisis ARDRA digunakan sebagai kelanjutan analisis ampikon 16S rRNA (Suzuki dan Yamasato 1994).

Pengukuran Kandungan AIA

Pengukuran kandungan AIA dilakukan dengan menginokulasi satu ose sel bakteri dari kultur agar miring hasil peremajaan ke dalam 10 ml media *nutrient broth* (NB) yang mengandung triptofan 2% dan diinkubasi selama 2 hari dengan agitasi 120 rpm. Kultur bakteri lalu disentrifugasi (22R Beckman Coulter) dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Pengukuran kandungan AIA berdasarkan reagen Salkowski dilakukan sebanyak dua ulangan. Sebanyak 2 ml supernatan ditambah 4 ml pereaksi Salkowski, dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi selama 1 jam. Larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2.800) pada panjang gelombang 530 nm dengan larutan AIA komersial (Sigma-Aldrich) sebagai standar pada konsentrasi 0, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$.

Karakterisasi Morfologi

Sebanyak empat belas isolat rizobakteri yang diremajakan dan membentuk koloni tunggal diamati morfologinya secara makroskopis. Karakter morfologi seperti bentuk koloni, permukaan, warna, tepian, dan elevasi diamati. Uji pewarnaan Gram juga dilakukan dengan mencampur satu tetes KOH 3% dengan satu ose kultur bakteri di atas kaca obyek yang bersih dan diaduk hingga diperoleh suspensi yang rata. Ose kemudian diangkat dari kaca obyek beberapa sentimeter. Apabila benang lendir bakteri terangkat, maka kultur bakteri adalah Gram-negatif. Sebaliknya apabila suspensi berair dan tidak tampak adanya lendir

setelah ose digerakkan berulang-ulang maka kultur bakteri adalah Gram-positif.

Isolasi DNA

Inokulan untuk isolasi DNA disiapkan dengan mengulurkan 1 ose tiap isolat ke dalam 1 ml media NB yang dibiarkan tumbuh dua hari. Kultur umur 2 hari dipindahkan ke dalam tabung mikro, kemudian disentrifugasi dua kali pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit dengan suhu 4°C. Suspensi hasil sentrifugasi dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 ml EDTA 0,5 M, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 3.000 rpm selama 14 menit dengan suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang kembali, sedangkan pelet yang ada diresuspensi dengan larutan sukrosa 25% sebanyak 900 μl dan larutan EDTA 0,5 M sebanyak 100 μl (9 : 1 v/v), selanjutnya ditambahkan dengan 100 μl larutan lisozim 10 mg/ml. Suspensi diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu, suspensi ditambah 120 μl larutan NaCl 5 M, 70 μl larutan EDTA 0,5 M, 140 μl larutan SDS 20%, dan 10 μl larutan proteinase-K 10 mg/ml. Suspensi kemudian diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 50°C selama 1 jam. Larutan fenol : kloroform 1 : 1 (v/v). Sebanyak 120 μl ditambahkan ke dalam suspensi. Suspensi yang telah terbentuk emulsinya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 14 menit. Supernatan atau lapisan bagian atas yang mengandung DNA, dipindahkan ke dalam tabung mikro steril dan dipresipitasi dengan EtOH 95% dingin sebanyak 2 \times volume supernatan yang terbentuk. Suspensi kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 30 menit. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 3 menit dan supernatan yang terbentuk dibuang. Pelet dikeringkan selama lebih kurang 30 menit. Pelet (DNA hasil pengeringan) kemudian diresuspensi menggunakan 20 μl bufer TE (Tris 10, EDTA 1 mM) dan diinkubasi di dalam penangas air (*waterbath*) dengan suhu 65°C selama 10 menit. Pelet DNA hasil resuspensi kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada tahap selanjutnya. DNA dicek kuantitas dan kualitasnya dengan NanoDrop®2000 (Thermo Scientific).

Identifikasi Isolat Rizobakteri dengan 16S rRNA

Untuk identifikasi spesies, isolat dipilih berdasarkan kandungan AIA yang mewakili (tertinggi dan rendah) dan warna koloni yang sama, untuk diampifikasi DNA-nya menggunakan primer sekuen 16S rRNA, yaitu 63F (5' CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') dan 1387R (5' GGG CGG WGT GTA CAA GGC 3') masing-masing 1 μl (Marchesi et al. 1998). Reaksi PCR

dilakukan dalam total volume 40 μl dengan komposisi 2 μl DNA 20–50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 20 μl PCR *ready mix* (Go Taq, terdiri atas *Taq polymerase*, dNTPs, MgCl_2 , dan bufer PCR) dan sisanya air deionisasi. Amplifikasi DNA dilakukan pada mesin PCR (Esco) dengan kondisi suhu denaturasi awal 94°C selama 1 menit 30 detik, *annealing* 55°C selama 45 detik, dan ekstensi 72°C selama 1 menit dengan 30 siklus, ekstensi akhir 72°C selama 1 menit dengan 1 siklus, serta tahap pendinginan 10°C selama 15 menit. Produk PCR dalam bentuk pita tunggal dilanjutkan untuk disekuensing secara *direct sequencing*. Sekuen yang diperoleh dicek dengan program BioEdit. Analisis homologi sekuen 16S rRNA isolat terpilih dilakukan dengan program BlastN pada situs NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Analisis filogeni dilakukan dengan mensejajarkan sekuen isolat yang dibanding dengan sekuen referensi strain bakteri sesuai spesies hasil identifikasi yang ada dalam basis data (www.ncbi.nlm.nih.gov). Pembuatan pohon filogenetik dilakukan melalui program MEGA4 (Tamura et al. 2007).

Amplifikasi ARDRA Isolat Rizobakteri

Sekuen 16S rRNA isolat bakteri terpilih diamplifikasi PCR dengan primer 63F dan 1387R (Marchesi et al. 1998). Reaksi PCR dilakukan dalam total volume 25 μl dengan komposisi 2 μl DNA 20–50 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 12,5 μl PCR *ready mix* (Go Taq) dan air deionisasi 8,5 μl . Amplifikasi DNA dilakukan dengan kondisi seperti identifikasi isolat. Hasil amplifikasi tiap isolat kemudian dipotong dengan enzim *RsaI* yang mempunyai situs pemotongan (5'-GTAC) (Heyndrickx et al. 1996). Reaksi pemotongan terdiri atas 10 μl produk PCR, 18 μl ddH₂O, 2 μl 10 × bufer Tango, dan 1 μl enzim restriksi. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 20 jam. Hasil pemotongan dielektroforesis dan divisualisasi di bawah *UV transilluminator*.

Elektroforegram pola pita yang terbentuk dari setiap isolat dijadikan data biner. Nilai 1 diberikan untuk pita yang terbentuk, sedangkan nilai 0 diberikan untuk pita yang tidak terbentuk. Hasil visualisasi yang telah dijadikan data biner dibuat pohon filogenetiknya mengikuti program MVSP 3.2 dengan metode *unweight pair group method arithmetic mean* (UPGMA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan AIA dan Karakter Morfologis Isolat Rizobakteri

Koleksi isolat bakteri BB Biogen yang diperoleh dari rizosfer beberapa tanaman di lahan pertanian Sukabumi berhasil diketahui potensinya sebagai

penghasil AIA yang berperan dalam memacu pertumbuhan tanaman. AIA merupakan anggota fitohormon penting sebagai auksin alami yang terbukti banyak dihasilkan oleh bakteri. Dari total empat belas isolat rizobakteri yang positif memproduksi AIA (5,24–37,69 $\mu\text{g}/\text{ml}$), empat isolat (SM1, SC4, KP3 dan TB2) paling dominan kandungan AIA-nya (Tabel 1), tertinggi pada SM1 (37,69 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Rentang kandungan AIA dalam studi ini tidak berbeda jauh dengan rizobakteri tanaman padi, yaitu antara 5,9–35,79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Patel dan Desai 2015), dan rizosfer pada tanaman pisang dan kapas (Mohite 2013). Isolat SM1 menghasilkan AIA lebih tinggi daripada rizobakteri hasil penelitian sebelumnya seperti isolat terpilih RS/PK/11 dengan AIA 35,79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Patel dan Desai 2015), mr3 dengan AIA antara 23–24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Mohite 2013), dan sembilan rizobakteri yang menghasilkan AIA padi hari kedua dalam rentang 12,4–35,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Lwin et al. 2012), serta bakteri endofit lainnya dari Phetcharat dan Duangpaeng (2012) dan Khan et al. (2016). Namun demikian beberapa isolat rizobakteri indigenous Indonesia penghasil AIA dalam studi ini lebih rendah daripada mikroba penemuan sebelumnya (Kumar et al. 2014; Sun et al. 2014) termasuk *Azospirillum* sp. AJK1 (Majeed et al. 2015) dan *Arthrobacter agilis* A17 (Ozidal et al. 2017). Secara umum isolat-isolat ini masih sebanding dengan bakteri endofit koleksi BB Biogen lainnya seperti 4PB, 6KJ, dan 1 PK yang menghasilkan AIA antara 34–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Lestari et al. 2015). Berdasarkan studi (Lwin et al. 2012) yang menunjukkan bahwa AIA di atas 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman jagung dari segi batang dan perakaran, rizobakteri dalam studi ini memiliki potensi sebagai PPT yang perlu dianalisis lebih lanjut.

Hasil ini juga menunjukkan bahwa produksi AIA oleh mikroba bervariasi, di mana sintesisnya dipengaruhi oleh prekursor baik endogen maupun eksogen. Sesuai dengan fungsi triptofan sebagai prekursor sintesis AIA, triptofan mampu meningkatkan biosintesis AIA secara nyata (Mohite et al. 2013). *Pathway* dari segi bakteri, AIA disintesis dari triptofan oleh *tryptophan-2-monooxygenase* (*iaaM*) dan *indole-3-acetamide* hidrolase (*iaaH*). *iaaM* mengonversi triptofan menjadi *indole-3-actamide* (IAM) yang berlanjut dihidrolisis menjadi AIA oleh *iaaH* (Won et al. 2011). Dalam studi ini, triptofan ditambahkan ke dalam media kultur bakteri, sehingga potensi rizobakteri penghasil AIA berhasil diketahui. Oleh karena itu, produksi AIA oleh bakteri harus dioptimalkan mengingat sangat dipengaruhi oleh kondisi kultur, fase pertumbuhan, dan ketersediaan substrat (Mutluru dan Konada 2007).

Karakteristik morfologi empat belas isolat rizobakteri penghasil AIA tersebut menunjukkan sebagian besar memiliki koloni bulat, elevasi cenderung cembung dengan permukaan yang basah dan tepian rata, hanya KP3 dan SC4 yang tepi koloninya tidak halus/rata. Warna koloni lebih bervariasi, lebih dari separuh dari total isolat berwarna putih (Tabel 2). Hampir semua isolat rizobakteri merupakan Gram-positif kecuali CP4 dan JP3 yang termasuk Gram-negatif. Meskipun lebih banyak bakteri Gram-negatif yang dilaporkan sebagai penghasil AIA, studi ini membuktikan bahwa bakteri Gram-positif dari spesies *Bacillus* (SM1, SC2, BL2, JP4, KP3, MB2, dan CP3) potensial menghasilkan AIA. Isolat rizobakteri dalam studi ini dapat memperkaya koleksi mikroba penghasil AIA yang telah ada. Bakteri Gram-positif lebih sering ditemukan di rizosfer daripada Gram-negatif. Secara umum bakteri Gram-negatif yang ditemukan di rizosfer dan tanah masing-masing hanya sekitar 20% dan 7%. Proporsi tersebut dapat bervariasi tergantung jenis tanaman, pemupukan, pemberian kapur, dan faktor lingkungan lainnya (da Silva dan Nahas 2002). Bakteri Gram-positif umumnya berbentuk batang, menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti mikrolatin A dan bermanfaat sebagai antimikroba, antivirus, antibiotik, dan lainnya se-

hingga penting untuk pertumbuhan tanaman, agen biokontrol ataupun agen bioremediasi (Xie et al. 2013).

Identifikasi Isolat Rizobakteri dengan 16S rRNA

Dugaan spesies rizobakteri penghasil AIA ini didukung oleh hasil identifikasi dengan 16S rRNA (Tabel 2 dan 3). Primer sekuen 16S rRNA mampu menghasilkan amplicon sesuai ukuran target (1.300 bp) dan homologi tinggi, yang menggambarkan presisi tinggi dalam identifikasi secara molekuler isolat rizobakteri yang banyak memiliki kemiripan koloni. Dari delapan isolat yang berwarna putih (Tabel 2) berdasarkan dugaan awal dari morfologi koloni dan Gram-positif sebagai *Bacillus* sp., tujuh isolat tergolong *Bacillus* dengan homologi nyata mendekati 100% nilai $E = 0$ (Tabel 3), relevan dengan pendapat (Priest et al. 1988). Lima isolat (SM1, JP4, KP3, MB2, dan CP3) mempunyai homologi tinggi dengan *B. subtilis*, SC2 tergolong *B. Amyloliqefaciens*, dan BL2 tergolong *B. velezensis*. Isolat-isolat yang tergolong *B. subtilis* ternyata memiliki sedikit perbedaan morfologi koloni (Tabel 2). Satu isolat (JP3) yang bukan genus *Bacillus* tergolong *Brevundimonas olei* dengan homologi 96%. Homologi yang

Tabel 2. Karakteristik morfologi secara makroskopis dan pewarnaan Gram empat belas isolat rizobakteri dalam studi ini.

Isolat	Karakteristik koloni bakteri					Reaksi Gram
	Bentuk	Permukaan	Warna	Tepian	Elevasi	
MB 1	Bulat	Kering	Kuning	Rata	Cembung	+
MB 2*	Bulat	Basah	Putih	Agak rata	Cembung	+
TB 1	Bulat	Basah	Kuning	Rata	Cembung	+
TB 2	Bulat	Basah	Kuning oranye	Rata	Cembung	+
CP 3*	Bulat	Kering	Putih	Rata	Cembung	+
CP 4	Bulat	Basah	Kuning	Rata	Cembung	-
KP 2	Bulat	Basah	Kuning	Rata	Cembung	+
KP 3*	Tidak beraturan	Basah	Putih	Berlekuk-lekuk	Cembung	+
SC 2*	Bulat	Basah	Putih pucat	Rata	Cembung	+
SC 4	Tidak beraturan	Basah	Cokelat pucat	Berlekuk-lekuk	Datar	+
JP 3*	Bulat	Kering	Putih pucat	Rata	Cembung	-
JP 4*	Bulat	Basah	Putih	Rata	Cembung	+
BL 2*	Bulat	Basah	Putih pucat	Rata	Cembung	+
SM 1*	Bulat	Basah	Putih pucat	Agak rata	Cembung	+

*Isolat bakteri yang berwarna putih dipilih untuk analisis molekuler dengan ARDRA.

Tabel 3. Analisis homologi sekuen 16S rRNA empat belas isolat rizobakteri dengan Blastn.

Isolat	Spesies	Homologi (%)
SM 1	<i>Bacillus subtilis</i>	99
SC 2	<i>B. amyliqefaciens</i>	98
BL 2	<i>B. velezensis</i>	99
JP 4	<i>B. subtilis</i>	99
JP 3	<i>Brevundimonas olei</i>	96
KP 3	<i>B. subtilis</i>	99
MB 2	<i>B. subtilis</i>	99
CP 3	<i>B. subtilis</i>	99

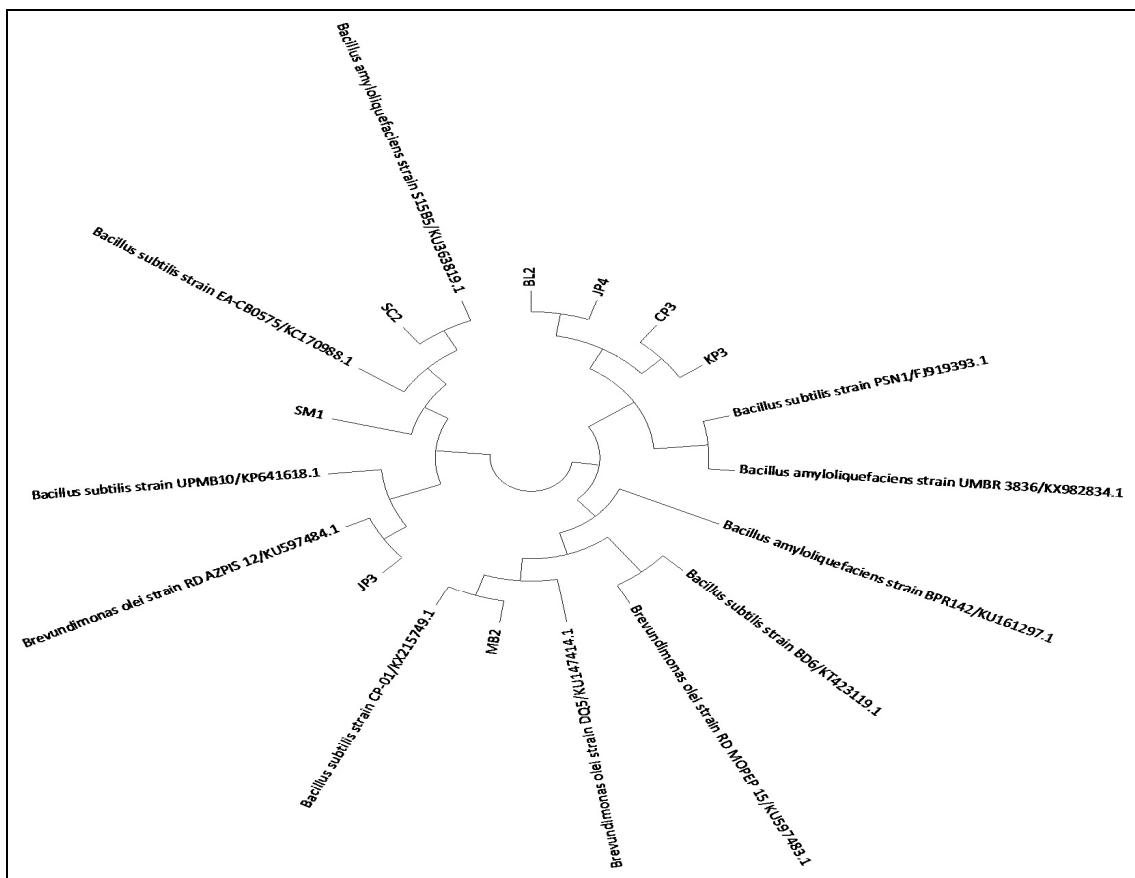
tinggi antara isolat JP3 dengan *B. olei* (96%) memberi peluang untuk penggalan informasi lebih lanjut pada identifikasi sekuennya menggunakan sekuen 16S rRNA yang lebih panjang, dimungkinkan karena adanya sekuen *novel* berdasarkan karakterisasi taksonomi (Naveed et al. 2014). Oleh karena itu, 16S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi rizobakteri penghasil AIA dan kedekatannya dengan spesies terdekatnya.

Koloni rizobakteri dominan mempunyai bentuk yang bulat, permukaan basah, tepian berbentuk rata, elevasi cenderung cembung, dan warna koloni putih dengan optik tidak tembus cahaya. Kemiripan morfologi koloni dalam spesies adalah sama (SM1, MB2, JP4, dan CP3) dan sebagian lain berbeda spesies, yaitu *B. amyloliquefaciens* SC2 dan *B. velenzensis* BL2. Morfologi koloni isolat SM1, CP3, MB2, JP4, dan KP3 (Tabel 2) mirip dengan *B. subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051 yang juga diamati pada media *nutrient agar*, dan keragaan koloninya dalam media TSB menunjukkan perbedaan (EHC 2015). Informasi ini sesuai dengan laporan sebelumnya (Wang-ngarm et al. 2014) bahwa koloni suatu bakteri dipengaruhi oleh

penyesuaian diri terhadap lingkungannya serta sifat-sifat fisiologis. Meskipun demikian variasi morfologi koloni juga ditemukan dalam satu spesies, seperti *B. subtilis* KP3 dalam studi ini.

Isolat penghasil AIA dari spesies *Bacillus* ini relevan dengan potensi *B. subtilis* dan *B. Amyloliquefaciens* sebelumnya yang selain sebagai agen biokontrol juga PPT (Logan 2012) termasuk *B. velenzensis* dan *B. olei*. Genus *Brevundimonas* yang tergolong *α-subclass Proteobacteria*, menurut Lee et al. (2010) belum banyak dilaporkan memiliki aktivitas yang berperan sebagai PPT. Hasil studi ini merupakan indikasi awal untuk mencoba menggali potensi PPT genus *Brevundimonas* penghasil AIA tinggi pada studi ke depannya, dikarenakan produksi AIA *B. velenzensis* BL2 dan *B. olei* J P3 jauh lebih rendah daripada *B. subtilis* SM1 dan *B. subtilis* KP3. Dengan demikian produksi AIA oleh bakteri bervariasi tergantung spesies dan strain.

Filogram isolat rizobakteri dibuat dengan 1.000 sampling *bootstrap* dengan MEGA4. Sekuen delapan isolat dibandingkan dengan sebelas isolat referensi, yaitu delapan strain *Bacillus* sp. dan tiga strain



Gambar 1. Kekerabatan genetik delapan isolat rizobakteri berdasarkan sekuen 16S rRNA yang dibandingkan dengan strain bakteri PPT hasil pencarian dari basis data (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Brevundimonas sp. yang diketahui sebagai PPT dari basis data (www.ncbi.nlm.nih.gov), dan menghasilkan dua kelompok utama (Gambar 1). Sebagian besar isolat tergolong kelompok I yang terdiri atas BL2, JP4, CP3, dan KP3 dan berada dekat dengan strain *B. subtilis*. Sedangkan MB2 lebih dekat dengan *B. subtilis* CP-01. Isolat JP3 dekat dengan *B. olei* RD AZPIS 12 yang berada dalam grup II, namun berada dalam subgrup berbeda dengan JP3 dan SC2. Isolat SC2 dekat dengan *B. amyloliquefaciens* strain 51585 yang diketahui sebagai penghasil hormon tumbuh, sedangkan SM1 lebih dekat dengan *B. subtilis* strain tertentu. Namun demikian, beberapa isolat jauh jaraknya dengan strain referensi dari basis data meskipun merupakan spesies yang sama. Dengan demikian filogeni berdasarkan gen 16S rRNA ini dapat memperluas pengetahuan tentang kekerabatan bakteri dan menyediakan informasi penting untuk identifikasi konvensional (Singh et al. 2007). Maka pemanfaatan gen 16S rRNA parsial lebih menitikberatkan pada informasi sekuen yang menentukan spesies. Analisis keragaman isolat bakteri penghasil AIA dengan 16S rRNA tersebut lebih lengkap dengan dukungan profil ARDRA.

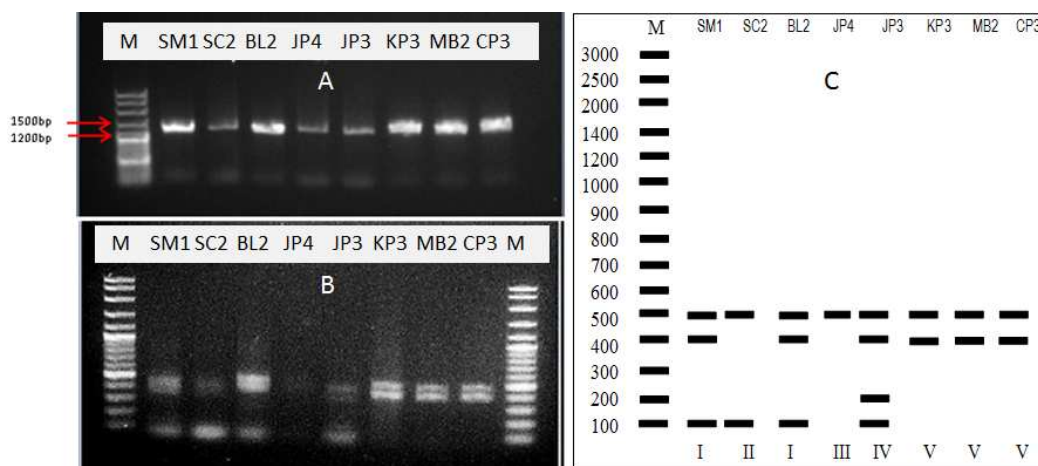
Analisis ARDRA pada Isolat Rizobakteri

Analisis ARDRA dilakukan untuk melengkapi dan mendukung informasi sekuen dan keragaman genetik berdasarkan sekuen 16S rRNA tiap isolat. Amplifikasi fragmen 16S rRNA dari delapan isolat rizobakteri terpilih dianalisis ARDRA dan positif menghasilkan amplicon sekitar 1.300 bp (Gambar 2A). Pematangan amplicon dengan enzim restriksi *RsaI* menghasilkan pola sidik jari yang berbeda, terdapat empat variasi

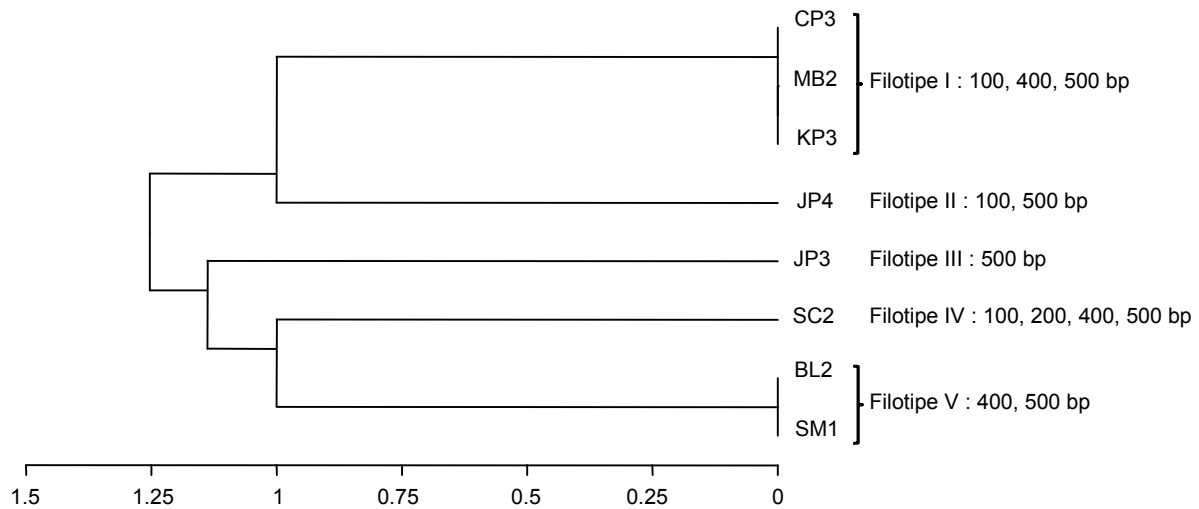
ukuran, yaitu 100 bp, 200 bp, 400 bp, dan 500 bp (Gambar 2B). Pola ARDRA ini kemudian divisualisasi menjadi pola gambar untuk memperjelas posisi pita sidik jari tiap isolat (Gambar 2C). Tiga isolat (KP3, MB2, dan CP3) memiliki sidik jari yang sama dengan dua pita (400 bp dan 500 bp), sedangkan SM1 dan BL2 memiliki tiga pita (100 bp, 400 bp, dan 500 bp) (Gambar 3), namun tiga isolat lainnya menunjukkan polimorfisme.

Analisis ARDRA-*RsaI* menghasilkan lima filotipe (I-V) yang masing-masing memiliki pola sidik jari spesifik berdasarkan ukuran pita DNA. Isolat CP3, MB2, dan KP3 yang tergolong *B. subtilis* berada dalam satu filotipe. Filotipe I tersebut dekat dengan filotipe yang beranggotakan JP4 yang juga tergolong *B. subtilis*. Kedekatan isolat dalam *Bacillus* sp. Digambarkan oleh filotipe V (*B. subtilis* SM1 dan *B. velezensis* BL2) yang diduga jauh dari *B. amyloliquefaciens* SC2 (filotipe IV) dan JP3 pada genus *Brevundimonas* (filotipe III). Terdapat isolat yang berasal dari daerah dan tanaman yang sama namun berada dalam filotipe yang berbeda, yaitu JP4 dan JP3. Terdapat kecenderungan spesies yang berbeda berada dalam filotipe yang berlainan. Hasil ini menunjukkan bahwa ARDRA-*RsaI* dapat membedakan isolat rizobakteri penghasil AIA yang berbeda grup namun masih belum sepenuhnya membedakan isolat-isolat dalam spesies yang sama.

Pohon filogenetik yang terbentuk dari rizobakteri asal lahan Sukabumi berdasarkan ARDRA-*RsaI* menunjukkan keragaman yang rendah. Hal ini didukung dengan pola sidik jari yang hampir mirip antarisolat. Hasil ini sesuai dengan hasil identifikasi yang sebagian besar tergolong spesies *Bacillus*, *B. subtilis*



Gambar 2. Analisis ARDRA pada delapan isolat rizobakteri. A = amplicon delapan isolat berdasarkan sekuen 16S rRNA, B = hasil pematangan gen 16S rRNA isolat rizobakteri menggunakan enzim restriksi *RsaI*. M = marka *ladder* 100 bp, C = visualisasi elektroforegram yang menunjukkan pola ARDRA yang menggunakan enzim restriksi *RsaI*.



Gambar 3. Pohon filogenetik delapan isolat rizobakteri penghasil AIA berdasarkan hasil pemotongan enzim restriksi *RsaI* dan filotipenya.

khususnya, seperti ditunjukkan oleh keragaman yang rendah juga dalam rizobakteri *Bacillus* sp. hasil penelitian Bahri et al. (2009) dengan enzim yang sama. Variasi ARDRA sangat dipengaruhi penggunaan enzim restriksi walaupun ada kemiripan dengan sekuensing, yaitu untuk memperoleh informasi yang penting dalam identifikasi dan keragaman organisme. Dengan adanya situs rekognisi dari pemotongan enzim restriksi, perolehan sekuen konvergen lebih kecil sehingga taksa menjadi lebih divergen. Oleh karena itu, dengan ARDRA, profil unik isolat dapat diperoleh yang lebih mendetilkan sekuen parsial 16S rRNA untuk tujuan rujukan. Level spesies juga menjadi dapat diinvestigasi lebih komprehensif secara taksonomi berdasarkan kesamaan nukleotida (Bahri et al. 2009; (Sasaki et al. 2004).

KESIMPULAN

Bakteri Gram-positif dari spesies *Bacillus* (SM1, SC2, BL2, JP4, KP3, MB2, dan CP3) diketahui menghasilkan AIA. Produksi AIA oleh bakteri bervariasi tergantung spesies dan strain. Karakteristik morfologi koloni rizobakteri mendukung variasi strain bakteri penghasil AIA. Dugaan spesies rizobakteri penghasil AIA ini didukung oleh hasil identifikasi dengan 16S rRNA. Delapan isolat penghasil AIA diidentifikasi tergolong *B. subtilis*, *B. valsezensis*, *B. amyloliquefaciens*, dan *B. olei*. Filogeni isolat berdasarkan 16S rRNA menunjukkan adanya variasi genetik dalam spesies rizobakteri yang terhitung rendah dengan didukung analisis ARDRA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Studi ini didukung anggaran APBN BB Biogen, Balitbangtan 2015. Penulis mengucapkan terima kasih pada Nazhirotul Ilmiyah yang telah membantu analisis data, dan Siti Aminah dan Jajang dalam membantu menyiapkan isolat dan bahan-bahan peremajaan isolat bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahri, S., Wahyudi, A.T. & Mubarik, N.R. (2009) Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria of *Bacillus* sp. based on 16S rRNA sequence and amplified rDNA restriction analysis. *Microbiology Indonesia*, 3 (1), 12–16.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C. & Standing, D. (2010) Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*, 4 (6), 378–383.
- Da Silva, P. & Nahas, E. (2002) Bacterial diversity in soil in response to different plant, phosphate fertilizer and liming. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 304–310.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D. & Glick, B.R. (2014) Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106 (1), 85–125.
- Environment and Health Canada. (2015) *Final Screening assessment for Bacillus amyloliquefaciens 13563-0, Bacillus atrophaeus 18250-7, Bacillus licheniformis ATCC 12713, Bacillus subtilis ATCC 6051A (=ATCC 6051a), Bacillus subtilis ATCC 55405, Bacillus subtilis subspecies subtilis ATCC 6051, Bacillus subtilis subspecies inaquosorum ATCC 55406, Bacillus species 16970-5, Bacillus species 2 18118-1, Bacillus species 4 18121-4, and Bacillus species 7 18129-3.* Canada, Minister of the Environment.

- Hall, V., Taibot, P.R., Stubbs, S.L. & Duerden, B.I. (2001) Identification of clinical isolates of actinomyces species by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis. *Society*, 39 (10), 3555–3562.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. & De Vos, P. (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, 26 (3), 247–259.
- Islam, S. Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T. & Hossain, M.M. (2016) Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–12.
- Khan, A.L., Halo, B.A., Elyassi, A., Ali, S. Al-Hosni, K., Hussain, J., Al Harrasi, A. & Lee, I.J. (2016) Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 58–64. doi: 10.1016/j.ejbt.2016.02.001.
- Kumar, A., Kumar, K., Kumar, P., Maurya, R. Prasad, S. & Singh, S.K. (2014) Production of indole acetic acid by *Azotobacter* strains associated with mungbean. *Plant Archives*, 14 (1), 41–42.
- Lee, M., Srinivasan, S. & Kim, M.K. (2010) New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp. nov., an esterase-producing bacteria. *Journal of Microbiology*, 48 (5), 616–622.
- Lestari, P., Suryadi, Y., Susilowati, D.N., Priyatno, T.P. & Samudra, I.M. (2015) Karakterisasi bakteri penghasil asam indol aasetat dan pengaruhnya terhadap vigor benih padi. *Berita Biologi*, 14 (1), 19–28.
- Leveau, J.H.J. & Lindow, S.E. (2005) Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (5), 2365–2371.
- Logan, N.A. (2012) *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, 112 (3), 417–429.
- Lwin, K.M., Myint, M.M., Tar, T. & Aung, W.Z.M. (2012) Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal*, 16 (5), 137–144.
- Majeed, A., Abbasi, M.K., Hameed, S., Imran, A. & Rahim, N. (2015) Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–10.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D. & Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2), 795–799.
- Mohite, B. (2013) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13 (3), 638–649.
- Mutluru, S. & Konada, V.M. (2007) Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5 (3), 178–182.
- Naveed, M., Mubeen, S., Khan, S.U., Ahmed, I., Khalid, N. Suleria, R., Bano, A. & Mumtaz, A.S. (2014) Identification and characterization of rhizospheric microbial diversity by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (3), 985–993.
- Ozidal, M., Ozidal, O.G., Sezen, A., Algur, O.F. & Kurbanoglu, E.B. (2017) Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *Biotechnology* 7 (1), 1–6.
- Patel, P.V. & Desai, P.B. (2015) Isolation of rhizobacteria from paddy field and their traits for plant growth promotion. *Research Journal of Recent Sciences*, 4, 34–41.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8), 3795–801.
- Phetcharat, P. & Duangpaeng, A. (2012) Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. In: Kaewkhao, J., Limsuwan, P., Yupapin, P., Janjai, J.S. (eds.) *Procedia Engineering*, 32, 177–183.
- Priest, F.G., Goodfellow, M. & Todd, C. (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Analytical Biochemistry*, 134, 1847–1882.
- Rameshkumar, Neelamegam, Ayydurai, N., Kayalvishi, N. & Gunasekaran, N. (2012) Genotypic and phenotypic diversity of PGPR fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (1), 13–24.
- Sasaki, E., Osawa, R., Nishitani, Y. & Whiley, R.A. (2004) ARDRA and RAPD analyses of human and animal isolates of *Streptococcus gallolyticus*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66 (11), 1467–1470.
- Shih-Yung, H. (2010) *IAA production by Streptomyces scabies and its role in plant microbe interaction*. Master Thesis, Cornell University.
- Singh, S., Chandra, R., Patel, D.K. & Rai, V. (2007) Isolation and characterization of novel *Serratia marcescens* (AY927692) for pentachlorophenol degradation from pulp and paper mill waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (12), 1747–1754.
- Sun, P.F., Fang, W.T., Shin, L.Y., Wei, J.Y., Fu, S.F. & Chu, J.Y. (2014) Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. *PLoS One*, 9 (12), 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0114196.

- Suzuki, T. & Yamasato, K. (1994) Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 115 (1), 13–17.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8), 1596–1599.
- Wang-ngarm, S., Chareonsudjai, S. & Chareronsundjai, P. (2014) Physicochemical factors affecting the growth of *Burkholderia pseudomallei* in soil microcosm. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90 (3), 480–485.
- Xie, F., Zhu, T., Zhang, F., Zhou, K., Zhao, Y. & Li, Z. (2013) Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *SpringerPlus*, 2 (1), 1–5.
- Yang, J.H., Liu, H.X., Zhu, G.M., Pan, Y.L., Xu, L.D. & Guo, J.H. (2008) Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (1), 91–104.
- Zhang, S., White, T.L., Martinez, M.C., McInroy, J.A., Kloepper, J.W. & Klassen W. (2010) Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of Phytophthora blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control*, 53 (1), 129–135.
-