



ISSN 0126-1754

Volume 10, Nomor 2, Agustus 2010

Terakreditasi Peringkat A

SK Kepala LIPI

Nomor 180/AU1/P2MBI/08/2009

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



Diterbitkan oleh
Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Berita Biologi merupakan Jurnal Ilmiah ilmu-ilmu hayati yang dikelola oleh Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), untuk menerbitkan hasil karya-penelitian (original research) dan karya-pengembangan, tinjauan kembali (review) dan ulasan topik khusus dalam bidang biologi. Disediakan pula ruang untuk menguraikan seluk-beluk peralatan laboratorium yang spesifik dan dipakai secara umum, standard dan secara internasional. Juga uraian tentang metode-metode berstandar baku dalam bidang biologi, baik laboratorium, lapangan maupun pengolahan koleksi biodiversitas. Kesempatan menulis terbuka untuk umum meliputi para peneliti lembaga riset, pengajar perguruan tinggi maupun pekaryat-tesis sarjana semua strata. Makalah harus dipersiapkan dengan beipedoman pada ketentuan-ketentuan penulisan yang tercantum dalam setiap nomor.

Diterbitkan 3 kali dalam setahun yakni bulan April, Agustus dan Desember. Setiap volume terdiri dari 6 nomor.

Surat Keputusan Ketua LIPI

Nomor: 1326/E/2000, Tanggal 9 Juni 2000

Dewan Pengurus

Pemimpin Redaksi

B Paul Naiola

Anggota Redaksi

Andria Agusta, Dwi Astuti, Hari Sutrisno, Iwan Saskiawan

Kusumadewi Sri Yulita, Tukirin Partomihardjo

Redaksi Pelaksana

Marlina Ardiyani

Desain dan Komputerisasi

Muhamad Ruslan, Yosman

Sekretaris Redaksi/Korespondensi Umum

(berlangganan, surat-menyurat dan kearsipan)

Enok, Ruswenti, Budiarto

Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)

Jin Raya Jakarta-Bogor Km 46,

Cibinong 16911, Bogor - Indonesia

Telepon (021) 8765066 - 8765067

Faksimili (021) 8765059

e-mail: berita.biologi@mail.lipi.go.id

ksamajp2biologi@yahoo.com

herbogor@indo.net.id

Keterangan foto cover depart: Keragaman genetik plasma nutfah padi beras putih dan beras warna, sesuai makalah di halaman 143 Foto: Dwinita W Utami - Koleksi BB Biogen-Badan Pengembangan dan Penelitian Pertanian-Departemen Pertanian.

Anggota Referee / Mitra Bestari

Mikrobiologi

Dr Bambang Sunarko (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Prof Dr Feliatra (*Universitas Riau*)
Dr Heddy Julistiono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr I Nengah Sujaya (*Universitas Uday and*)
Dr Joko Sulistyio (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Joko Widodo (*Universitas Gajah Mada*)
Dr Lisdar I Sudirman (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Ocky Kama Radjasa (*Universitas Diponegoro*)

Mikologi

Dr Dono Wahyuno (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Deptan*)
Dr Kartini Kramadibrata (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Genetika

Prof Dr Alex Hartana (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Warid Ali Qosim (*Universitas Padjadjaran*)
Dr Yuyu Suryasari Poerba (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Taksonomi

Dr Ary P Keim (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Daisy Wowor (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Prof (Ris) Dr Johanis P Mogeia (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Rosichon Ubaidillah (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Bioiogi Molekuler

Dr Eni Sudarmonowati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)
Dr Endang Gati Lestari (*BB Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian-Deptan*)
Dr Hendig Winarno (*Badan Tenaga Atom Nasional*)
Dr I Made Sudiana (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Nurlina Bermawie (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Deptan*)
Dr Yusnita Said (*Universitas Lampung*)

Bioteknologi

Dr Nyoman Mantik Astawa (*Universitas Udayana*)
Dr Endang T Margawati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)
Dr Satya Nugroho (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)

Veteriner

Prof Dr Fadjar Satrija (*FKH-IPB*)

Bioiogi Peternakan

Prof (Ris) Dr Subandryo (*Pusat Penelitian Ternak-Deptan*)

Ekologi

Dr Didik Widyatmoko (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)
Dr Dewi Malia Prawiradilaga (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Frans Wospakrik (*Universitas Papua*)
Dr Herman Daryono (*Pusat Penelitian Hutan-Dephut*)
Dr Istomo (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Michael L Riwu Kaho (*Universitas Nusa Cendana*)
Dr Sih Kahono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biokimia

Prof Dr Adek Zamrud Adrian (*Universitas Andalas*)
Dr Deasy Natalia (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Elfahmi (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Herto Dwi Ariesyadi (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Tri Murningsih (*Pusat Penelitian Biologi -LIPI*)

Fisiologi

Prof Dr Bambang Sapto Purwoko (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Gono Semiadi (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Irawati (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)
Dr Nuril Hidayati (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Wartika Rosa Farida (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biostatistik

Ir Fahren Bukhari, MSc (*Institut Pertanian Bogor*)

Bioiogi Perairan Darat/Limnologi

Dr Cynthia Henny (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)
Dr Fauzan Ali (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)
Dr Rudhy Gustiano (*Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar-DKP*)

Bioiogi Tanah

Dr Rasti Saraswati (*BB Sumberdaya Lahan Pertanian-Deptan*)

Biodiversitas dan Ikiim

Dr Rizaldi Boer (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Tania June (*Institut Pertanian Bogor*)

Bioiogi Kelautan

Prof Dr Chair Rani (*Universitas Hasanuddin*)
Dr Magdalena Litaay (*Universitas Hasanuddin*)
Prof (Ris) Dr Ngurah Nyoman Wiadnyana (*Pusat Riset Perikanan Tangkap-DKP*)
Dr Nyoto Santoso (*Lembaga Pengkajian dan Pengembangan Mangrove*)

Berita Biologi menyampaikan terima kasih
kepada para Mitra Bestari/ Penilai (Referee) nomor ini
10(2)-Agustus 2010

Dr. Andria Agusta - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Ary P. Keim - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. B Paul Naiola - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Endang Gati Lestari - *BB Litbang Bioteknologi dan
Sumberdaya Genetik Pertanian-Deptan*
Dr. Endang Tri Margawati - *Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI*
Dr. Iwan Saskiawan - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Kusumadewi Sri Yulita - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Marlina Ardiyani - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Satya Nugroho - *Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI*

Referee/ Mitra Bestari Undangan

Drs. Edi Mirmanto, M.Sc. - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Herwasono Soedjito - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Joeni Setijo Rahajoe - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dr. Rianta - *Pusat Penelitian Limnologi LIPI*
Dr. Syahroma H. Nasution - *Pusat Penelitian Limnologi*
Prof. (Ris.) Dr. Woro A. Noerdjito - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*
Dra. Yuliasri Jamal, M.Sc. - *Pusat Penelitian Biologi LIPI*

DAFTAR ISI

MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

PENINGKATAN KUALITAS NUTRISI TEPUNG DAUN LAMTORO SEBAGAI PAKAN IKAN DENGAN PENAMBAHAN EKSTRAK ENZIM CAIRAN RUMEN DOMBA (Improvement Nutrition Value of <i>Leucaena</i> Leaf Meal as Fish Feed with Addition of Sheep Rumen Fluid Enzyme)	
<i>Indira Fitriliyani, Enang Harris, Ing Mokoginta, Nahrowi</i>	135
SIDIJARI DNA PLASMA NUTFAH PADI LOKAL MENGGUNAKAN MARKA MOLEKULER SPESIFIK UNTUK SIFAT PADI BERAS MERAH [DNA Fingerprinting of Local Rice Germplasm using The Specific Markers for Red Rice]	
<i>Dwinita W. Utami, Aderahma Ilhami, Ida Hanarida</i>	143
PENGUNAAN VAKSIN <i>Aeromonas hydrophila</i>: PENGARUHNYA TERHADAP SINTASAN DAN IMUNITAS LARVA IKAN PATIN (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>) (The Application of <i>Aeromonas hydrophila</i> Vaccine: The Effects on The Survival Rate and Immunity of Patin Seed (<i>Pangasionodon hypophthalmus</i>))	
<i>Angela M Lusiasuti dan Wartono Hadie</i>	151
KEANEKARAGAMAN LUMUT DI TAMAN NASIONAL BUKIT BARISAN SELATAN, PROVINSI LAMPUNG, SUMATERA [Mosses Diversity In Bukit Barisan Selatan National Park, Lampung Province, Sumatera]	
<i>Florentina Indah Windadri</i>	159
PRIMER-PRIMER BARU UNTUK MENGAMPLIFIKASI GEN PENGKODE PROTEIN AMPLOP VIRUS DENGUE STRAIN CH53489 [Novel Primers to Amplify The Gene Coding for Envelope Protein of Dengue Virus Strain CH53489]	
<i>Ira Djajanegara</i>	167
ANALISIS VEGETASI POHON DI HUTAN HUJAN TROPIK HARAPAN, JAMBI [Vegetation Analysis of Trees in Harapan Rainforest, Jambi]	
<i>Muhammad Mansur, Teguh Triono, Ismail, Setyawan Warsono Adi, Enu Wahyu, Gofar Ismail</i>	173
KEANEKARAGAMAN KUMBANG LUCANID (Coleoptera: <i>Lucanidae</i>) DI TAMAN NASIONAL BOGANI NANI WARTA BONE, SULAWESI UTARA [Lucanids Beetle Diversity (Coleoptera: <i>Lucanidae</i>) in the Bogani Nani Wartabone National Park, North Sulawesi]	
<i>Roni Koneri</i>	179
ANALISIS PREDIKSI SEBARAN ALAMI GAHARU MARGA <i>Aquilaria</i> DAN <i>Gyrinops</i> DI INDONESIA [Natural Distribution Prediction Analyses of Agarwood Genera of <i>Aquilaria</i> and <i>Gyrinops</i>) in Indonesia]	
<i>Roemantyo dan Tukirin Partomihardjo</i>	189
VIRULENCE OF <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> AND REACTION OF RICE GENOTYPES TO THE RACES OF THE PATHOGEN [Virulensi <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> dan Reaksi Genotipe Padi Terhadap Ras Patogen]	
<i>Y Suryadi and Triny S Kadir</i>	199

KEANEKARAGAMAN TUMBUHAN PULAU SEPANJANG JAWA TIMUR [Plant Diversity of Sepanjang Island, East Java] <i>Rugayah, Suhardjono, S Susiarti</i>	205
PENGARUH LAMA PENYIMPANAN, SUHU DAN LAMA PENGERINGAN KENTANG TERHADAP KUALITAS KERIPIK KENTANG PUTIH [Effect of Storage, Temperature and Drying Duration of Potato on Potato chip Quality] <i>AH Asgar, Asih Kartasih, Asep Supriadi dan Henna Trisdyan</i>	217
SELEKSIJAMUR TANAH PENGURAI LIGNIN DAN PAH DARI BEBERAPA LINGKUNGAN DI BALI [The Selection of Lignin and PAHs Degrading Fungi from Some Environment in Bali] <i>YB Subowo dan Corazon</i>	227
PENGARUH EKSTRAK AIR DAN ETANOL <i>Kaempferia</i> spp. TERHADAP AKTIVITAS DAN KAPASITAS FAGOSITOSIS SEL MAKROFAG YANG DIINDUKSI BAKTERI <i>Staphylococcus epidermidis</i> [Influenced of Water and Ethanol Extracts of <i>Kaempferia</i> spp. to Phagocytosis Activity and Capacity Macrophage Cells Induce by <i>Staphylococcus epidermidis</i>] <i>Tri Murningsih</i>	235
KERAGAMAN BAKTERI ENDOFITIK PADA EMPAT JENIS VARIETAS PADI DENGAN METODA ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) [The Diversity of Endophytic Bacteria Within Four Different Rice Varieties by Using ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) Method] <i>Dwi N Susilowati, Nurul Hidayatun, Tasliah, danKMulya</i>	241
RESPON TANAMAN PADI GOGO (<i>Oryza sativa</i> L.) TERHADAP STRESS AIR DAN INOKULASI MIKORISA [Response of Upland Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) Under Water Stress and Mycorrhizae Inoculation] <i>Harmastini Sukiman, Syoflatin Syamsiyah dan Adiwirman</i>	249
KOMPOSISI JENIS KEPITING (Decapoda: <i>Brachyura</i>) DALAM EKOSISTEM MANGROVE DAN ESTUARI, TAMAN NASIONAL BALI BARAT [Crabs (Decapoda: <i>Brachyura</i>) Species Composition in Mangrove and Estuarine Ecosystem, West Bali National Park] <i>Dewi Citra Murniati</i>	259
<u>KOMUNIKASI PENDEK</u>	
CATATAN JENIS-JEMS TUMBUHAN ASING DAN INVASIF DI TAMAN NASIONAL GUNUNG CEDE PANGRANGO, JAWA BARAT [Recorded of Alien Invasive Species in Gunung Gede Pangrango National Park, West Java] <i>Sunaryo dan Eka F Tihurua</i>	265

**KERAGAMAN BAKTERI ENDOFITIK DnSOLASI DARI EMPAT
VARIETAS PADI DENGAN METODA ARDRA¹**
**[The Diversity of Endophytic Bacteria Isolated from Four Rice Varieties
by Using ARDRA Method]**

Dwi N Susilowati^{13*}, Nurul Hidayatun, Tasliah dan K Mulya

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jin Tentara Pelajar 3 A, Bogor 16111. Tlp 0251 -8337975

*e-mail: d_nengsusi@yahoo.com

ABSTRACT

Sixty eight endophytic bacteria were isolated from four different rice varieties (IR64, Cirata, Code and Limboto) obtained from agroecosystem in Cikembar, Sukabumi, West Java. Those isolates were subjected for analysis the diversity based on genetic fingerprinting through Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) method. The objective of this research is to characterize the predominant endophyte bacteria are present within various rice varieties grown on agroecosystem in Cikembar, Sukabumi by using ARDRA method. The results shows that restriction analysis with both RsaI and HaeIII was sufficient to allocate the endophyte bacteria from four different rice varieties into the 29 types. Moreover, RsaI alone was capable of resolving the 11 types, followed by HaeIII 14 types. In general, the result may explain that there is no collinierity between the cluster and their host plant. *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Acidovorax* and *Pseudomonas* were identified as endophytic bacteria from rice varieties in this agroecosystem based on their 16S rRNA sequences. Seven types were placed in close proximity to these genera, but other types were still unknown. Among these isolates, genera *Staphylococcus* and *Bacillus* are common to rice endophytes.

Kata kunci: keragaman, bakteri endofit, 16S ribosomal DNA, ARDRA

PENDAHULUAN

Struktur mikroba dalam suatu ekosistem membentuk sistem kompleks sebagai hasil adaptasi terhadap lingkungannya, sehingga kestabilan struktur populasi mikroba menjadi ukuran kualitas suatu ekosistem. Perubahan ekosistem akan menyebabkan perubahan pada keanekaragaman mikrob (McChang *et al.*, 1999). Untuk itu keberadaan mikroba dalam ekosistem pertanian perlu diketahui dan dilestarikan dalam bentuk kultur koleksi yang kemudian dapat digunakan sebagai sistem peringatan dini untuk mengantisipasi hilangnya diversitas mikroba.

Bakteri endofit merupakan bakteri yang hidup pada jaringan tumbuhan dan berinteraksi dengan tumbuhan yang ditumpanginya dengan interaksi yang bersifat mutualisme (Strobel dan Daisy, 2003). Sebanyak 155 isolat endofit berhasil diisolasi dari bagian batang, daun dan akar tanaman padi dari varietas Cirata, Limboto, Code dan IR64 yang ditanam secara serentak pada areal pertanaman padi di daerah Cikembar, Sukabumi, Jawa Barat (Susilowati *et al.*, 2006). Menurut Lesmana *et al.* (2003), varietas-varietas tersebut memiliki sifat tertentu dalam hal ketahanan

terhadap mikroba patogen tanaman padi, yaitu Cirata merupakan varietas lokal yang peka terhadap *Pyricularia grisea* penyebab penyakit blas; Limboto varietas lokal tahan terhadap fungi *P. grisea*; Code turunan IR64 tahan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* penyebab penyakit hawar daun bakteri (HDB); dan IR64 varietas introduksi peka terhadap *X. oryzae* pv. *oryzae*. Keragaman bakteri endofit yang terdapat pada keempat jenis varietas padi yang diketahui memiliki sifat tersebut di atas diharapkan dapat memperkaya koleksi plasma nutfah mikroba pertanian dan mengantisipasi hilangnya diversitas mikroba indigen dari plasma nutfah padi di Indonesia.

Bakteri endofit yang secara umum ditemukan pada berbagai tumbuhan di antaranya *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* dan *Agrobacterium* (Bell *et al.*, 1995; Hallmann *et al.*, 1997; Hallmann, 2001; Bacon *et al.*, 2002). *Pantoea*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium* dan *Bacillus* banyak dilaporkan sebagai bakteri endofit pada tumbuhan yang dibudidayakan (Hallmann, 2001; Bacon *et al.* 2002; Reiter *et al.*, 2002; Zinniel *et al.*, 2002); sedangkan *Microbacterium*, *Brevundimonas* dan *Sphingomonas*

sangat jarang ditemukan sebagai bakteri endofit. *Pantoea* banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman padi (Feng *et al.*, 2006) dan *Klebsiella* sp. juga dilaporkan mengkolonisasi jaringan tanaman padi (Elbeltagy *et al.*, 2000).

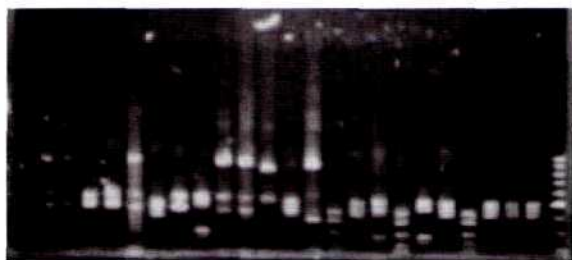
Bakteri endofit dapat berperan sebagai pemacu pertumbuhan tumbuhan, yang didukung oleh serangkaian proses mikroba seperti pelarutan nutrisi, penambahan N₂ udara, produksi hormon tumbuh dan mengantisipasi serangan OPT (Hallmann 2001; Botini *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005). Kemampuan mengkolonisasi sistem perakaran secara efektif sebagai bakteri rhizosfer dan memacu pertumbuhan akar merupakan dua faktor penentu efikasi bakteri endofit dapat berperan terhadap pertumbuhan tumbuhan, memacu rendemen tumbuhan serta mengontrol serangan penyakit tumbuhan (Compant *et al.*, 2005).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keragaman bakteri endofit pada empat varietas padi yang berbeda (Cirata, Limboto, Code dan IR64) yang ditanam secara serentak pada areal pertanaman padi di daerah Cikembar, Sukabumi, Jawa Barat. Analisis keragaman dilakukan dengan metoda ARDRA, yaitu dengan pendekatan amplifikasi gen 16S rDNA dan pemotongan secara spesifik oleh enzim restriksi tertentu pada gen penyandi 16S rRNA hasil amplifikasi, sehingga diperoleh pola pita pemotongan yang khas untuk setiap jenis bakteri. Weidner *et al.* (1996) menyatakan gen 16S rDNA dapat dipergunakan untuk tujuan karakterisasi molekular. Dari pola pita tersebut akan dapat direkonstruksi pohon filogenetik yang akan mengelompokkan bakteri berdasarkan jarak kekerabatannya.

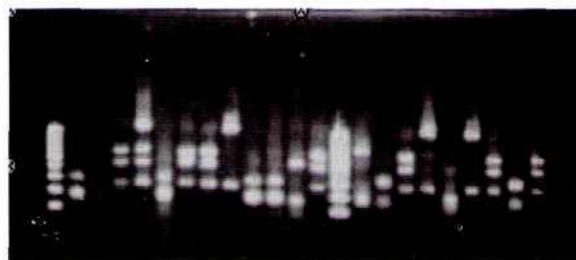
BAHANNANMETODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada Maret hingga Oktober 2006. Sebanyak 68 isolat bakteri endofit tanaman padi koleksi BB Biogen diisolasi DNA-nyadan diamplifikasi dengan primer 63-F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC), 1387-R (GGGCGGCGTGTACAAGGCC) dari invitrogen, selanjutnya produk PCR (amplikon) yang diperoleh direstriksi dengan enzim *Rsa*(fermentas) dan *Hae*III (fermentas).

Koleksi bakteri endofit diekstraksi DNA-nya dengan menggunakan metode Lazo *et al.* (1987). PCR dilakukan dengan mencampurkan 2,00 µl DNA template dalam campuran yang terdiri atas 2,0 µl 10xBufferPCR, 1.50 µl 25 mM MgCl₂, 0.50 µl 10 mM dNTP, masing-masing 0,50 µl 10 µg primer F dan R dan 0,20 Taq DNA polimerase dan ddH₂O hingga volume 25 µl. Amplifikasi DNA dilakukan dengan kondisi: denaturasi awal 94°C selama 2 menit, diikuti 30 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer selama 30 detik dengan variasi suhu 50°C dan 55°C, polimerasi selama 1 menit pada suhu 72°C dan pada siklus terakhir dilakukan perpanjangan waktu polimerasi selama 7 menit. Penghentian reaksi dilakukan dengan penurunan suhu ke 4°C (Rodiyah, 2003). Pemurnian produk PCR dilakukan dengan metode pengendapan etanol (Sambrook dan Russell, 2001). Digesti enzim *Rsa*I (5'-GT AC) dan *Hae*III (5'-GG CC) dengan mencampurkan 5 µl DNA hasil presipitasi dengan 8,0ul air deionisasi dan ditambahkan 1 µl bufer



A



B

Gambar 1. Hasil restriksi gen 16S rRNA bakteri endofit (E): A. dengan enzim *Rsa*I dan B. dengan enzim *Hae* III yang dielektroforesis dengan gel agrosa menggunakan marker (M) 100 pb

label 1. Pengelompokkan pola pita pemotongan yang dihasilkan oleh enzim restriksi *RsaI* dan *HaeIII*

<i>RsaI</i>		<i>HaeIII</i>	
Pola	Ukuran Basa (bp)	Pola	Ukuran Basa (bp)
A	400,450,500	A	200, 325
B	400,450, 500, 600	B	275,475,600
C	450, 525	C	200,275, 350
D	400,900	D	275, 1000
E	200,275, 375, 425	E	275,475,600,1000
F	450, 700	F	175, 325,475
G	525, 850	G	175,250, 700
H	450, 525, 900	H	175,500
I	275,450, 500	I	175,250,350,700
J	425, 500, 850	J	175,325
K	400	K	200, 325, 650
		L	700
		M	200,275,475
		N	200,475

Tabel 2. Pola restriksi oleh enzim restriksi *RsaI-HaeIII* dan tipe ARDRA dari isolat endofit asal empat varietas tanaman padi

No	Kode Isolat	Inang Isolat (Varietas Padi)	Pola Restriksi ^b	Tipe ARDRA'
1	Endo-2	Cirata	HA	21
2	Endo-4	Cirata	HA	21
3	Endo-14	Cirata	AC	3
4	Endo-18	Cirata	CB	7
5	Endo-19	Cirata	AE	4
6	Endo-20 (<i>Pseudomonas putida</i>)	Cirata	FG	17
7	Endo-21	Cirata	CE	10
8	Endo-23	Cirata	OA	19
9	Endo-24	Cirata	IC	25
10	Endo-25	Cirata	CB	7
11	Endo-26 (<i>Serratia marcescens</i>)	Cirata	HA	21
12	Endo-29	Cirata	CE	10
13	Endo-30	Cirata	HA	21
14	Endo-33	Cirata	AB	2
15	Endo-35	Cirata	CB	7
16	Endo-39	Cirata	ID	26
17	Endo-40 (<i>Serratia marcescens</i>)	Cirata	HA	21
18	Endo-41 (<i>Slaphylococcus</i>)	Cirata	ID	26
19	Endo-42	Cirata	ID	26
20	Endo-47	Cirata	DA	11
21	Endo-50	Cirata	HA	21
22	Endo-51 (<i>Bacillus cereus</i>)	Cirata	AB	2
23	Endo-53	Cirata	GH	18
24	Endo-56	Cirata	CB	7
25	Endo-61	Cirata	IC	25

Tabel. 2 lanjutan...

No	Kode Isolat	Inang Isolat (Varietas Padi)	Pola Restriksi"	Tipe ARDRA'
26	Endo-62	Cirata	AB	2
27	Endo-63	Cirata	DA	11
28	Endo-64	Limboto	AB	2
29	Endo-65 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Limboto	AB	2
30	Endo-67	Limboto	DI	13
31	Endo-68	Limboto	EA	14
32	Endo-69	Limboto	IC	25
33	Endo-70	Limboto	AB	2
34	Endo-73	Limboto	AB	2
35	Endo-75	Limboto	CC	8
36	Endo-76 (<i>Staphylococcus</i>)	Limboto	CE	10
37	Endo-77	Limboto	AB	2
38	Endo-79 (<i>Staphylococcus</i>)	Limboto	ID	26
39	Endo-80	Limboto	HJ	23
40	Endo-81	Limboto	EM	16
41	Endo-82	Limboto	ID	26
42	Endo-85	Limboto	AF	5
43	Endo-86	Limboto	AF	5
44	Endo-87	Limboto	AE	4
45	Endo-89 (<i>Staphylococcus</i>)	Limboto	CD	9
46	Endo-91 (<i>Pseudomonas syringae</i>)	Limboto	DG	12
47	Endo-92	Limboto	AB	2
48	Endo-99	Limboto	DO	12
49	Endo-103	Limboto	AB	2
50	Endo-105	Limboto	AA	1
51	Endo-106	Limboto	EC	15
52	Endo-107 (<i>Acidovorax</i>)	Limboto	KJ	29
53	Endo-118	Limboto	BK	6
54	Endo-124	Limboto	HL	24
55	Endo-125	Limboto	AB	2
56	Endo-126	Limboto	AB	2
57	Endo-127	Limboto	AB	2
58	Endo-128	Limboto	HB	22
59	Endo-129	Limboto	HL	24
60	Endo-130	Limboto	AB	2
61	Endo-132	Code	CD	9
62	Endo-135 (<i>Agrobacterium larrymoorei</i>)	Code	GE	20
63	Endo-136 (<i>Bacillus</i> sp.)	Code	AB	2
64	Endo-139 (<i>Bacillus pumilus</i>)	IR64	KB	28
65	Endo-142	IR64	HA	21
66	Endo-144	IR64	CD	9
67	Endo-147	IR64	JC	27
68	Endo-155	IR64	AA	1

dan 1 µl enzim restriksi dan diinkubasi 37°C selama 3 jam. Penyusunan dendrogram pohon filogenetik dilakukan melalui program statistik Nt-Sys berdasarkan matriks similaritas *simple matching*, dengan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean*).

HASDL

Penerapan teknik isolasi DNA dari Lazo *et al.* (1987) menghasilkan DNA yang cukup bersih dan dapat diamplifikasi dengan primer 63-F dan 1387-R menghasilkan satu pita tunggal berukuran sekitar 1500 pasang basa yang merupakan ukuran gen 16S rRNA. Primer yang merupakan primer universal untuk prokariot ini diketahui dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA dari domain bakteri dengan ukuran sekitar 1300-1500 pb, dan telah menunjukkan derajat *mismatch* pada ujung 5' yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan primer 27-F dan 1392-R.

Hasil pemotongan gen 16S rRNA pada 68 isolat bakteri endofit dengan enzim *Rsal* menghasilkan 11 pola pita yang berbeda. Pola pita yang dominan ditunjukkan oleh pola A, yang berukuran 400, 450 dan 500 pasang basa (Tabel 1, Gambar 1).

Hasil pemotongan dengan enzim restriksi *HaeIII* menghasilkan 14 pola pita pemotongan yang berbeda. Pola pita yang dominan terdapat pada pola B yang berukuran 275, 475 dan 600 pb (Tabel 1, Gambar 1).

PEMBAHASAN

Hasil pemotongan gen 16S rRNA pada 68 isolat bakteri endofit dengan enzim *Rsal* menghasilkan 11 pola pita yang berbeda dengan pola pita yang dominan ditunjukkan oleh pola A, yang berukuran 400, 450 dan 500 pasang basa. Adanya pola yang dominan menunjukkan bahwa terdapat bakteri yang mempunyai galur yang sama. Terdapat beberapa isolat bakteri endofit yang menghasilkan hanya satu pita pemotongan (E107 dan E139), yang dimungkinkan merupakan penumpukan dari dua fragment atau lebih karena enzim *Rsal* memotong DNA pada sisi pengenalan yang menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran yang sama.

Hasil pemotongan dengan enzim restriksi *HaeIII* menghasilkan 14 pola pita pemotongan yang berbeda dengan pola pita yang dominan terdapat pada

pola B yang berukuran 275, 475 dan 600 pb. Pada umumnya enzim *HaeIII* dapat memotong semua isolat dan memberikan hasil fragmen restriksi yang cukup diskriminatif.

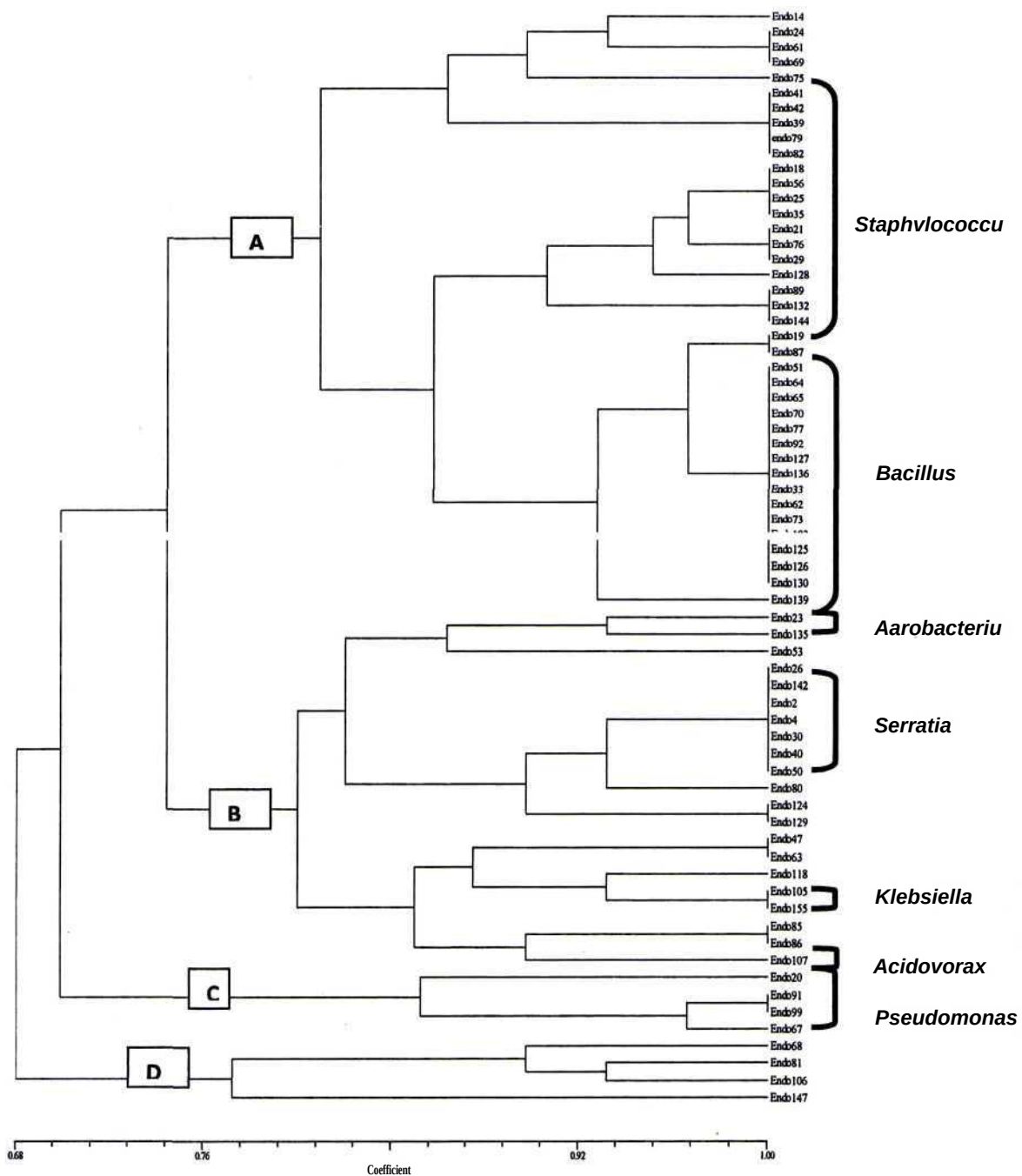
Enzim *Rsal* dan *HaeIII* merupakan enzim endonuklease restriksi tetrametrik (memiliki sisi pengenalan 4 basa), sehingga bila penyebaran nukleotida terjadi secara acak pada organisme dengan G+C sekitar 50%, maka setiap sekitar 256 pasang basa dapat diharapkan memiliki satu sisi pengenalan. Di sini kedua enzim menghasilkan sejumlah besar fragmen yang bervariasi ukurannya, yang bisa digunakan untuk membandingkan pola filogenetik antar isolat.

Konstruksi pohon filogenetik ke-68 isolat bakteri endofit padi berdasarkan hasil pola pita pemotongan menggunakan enzim *Rsal* dan *HaeIII* menghasilkan 29 kelompok (Tabel 2, Gambar 2). Tingkat keragaman yang cukup tinggi ini dimungkinkan oleh karena isolat diperoleh dari inang tanaman padi yang tumbuh dalam agroekosistemnya di alam dan bukan dari tanaman yang dikultur dalam laboratorium atau ditanam di rumah kaca.

Pada koefisien similaritas 75% isolat terbagi menjadi 4 klaster (A, B, C dan D). Tidak ada kecenderungan yang menunjukkan pengelompokan yang sesuai dengan tanaman inangnya akan tetapi pada pengelompokan yang lebih kecil terdapat kecenderungan pengelompokan berdasarkan sifat fisiologisnya. (Gram+ dan Gram-) dan jenisnya. Klaster A adalah kelompok bakteri Gram (+); sedangkan klaster B adalah kelompok bakteri Gram (-). Juga terdapat kecenderungan pengelompokan berdasarkan jenisnya. Identifikasi ini diberikan berdasarkan pada isolat referensi yang merupakan isolat bakteri endofit yang telah diidentifikasi berdasarkan hasil sekuens DNA-nya. Kedekatan antara isolat yang diteliti dengan sekuens yang teridentifikasi memberikan gambaran mengenai identitas isolat tersebut. Berdasarkan isolat yang telah teridentifikasi tersebut terlihat bahwa pada klaster A yang merupakan kelompok bakteri Gram + terlihat pengelompokan lagi seperti kelompok bakteri *Staphylococcus* dan kelompok *Bacillus*. Pada klaster B juga terbentuk sub-klaster *Agrobacterium*, *Serratia*, *Klebsiella* dan *Acidovorax*. Pada klaster C merupakan kelompok bakteri *Pseudomonas*.

Sebagaimana dinyatakan oleh Kobayashi dan Palumbo (2000), tanaman dapat dikolonisasi secara simultan oleh banyak jenis bakteri endofit, baik Gram positif maupun Gram negatif, meliputi genus: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*,

Agrobacterium, *Alcaligenes*, *Atcanivorax*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*,



Gambar 2. Pohon filogenetik bakteri endofit padi dengan kelompok kekerabatannya berdasarkan pola pita pemotongan enzim *RsaI* dan *HaeIII*

Herbaspirillum, *Mesorhizobium*, *Moraxella*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Phyllobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymobacter*, *Zymomonas* dan *Methylobacterium*. Sedangkan menurut Mano dan Morisaki (2008), bakteri endofit yang umum ditemukan dari jaringan berbagai jenis tumbuhan adalah kelompok *Pseudomonas* (*Pseudomonas*, *Bulkholderia*, *Phyllobacterium*) dan *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*).

Keberadaan bakteri endofit sebagaimana dinyatakan oleh Mano *et al.* (2007) bisa berasal dari lingkungan sekitarnya, seperti daerah rhizosfer dan filosfer tumbuhan yang mampu menerobos ke dalam jaringan dalam tumbuhan melalui stomata, lentikula, luka (trachoma yang rusak), ataupun area munculnya akar lateral. Bakteri dari dalam dan luar jaringan batang dan daun tanaman padi dapat bermigrasi dari permukaan ke bagian interior tanaman ataupun sebaliknya. Oleh karena itu, adanya keragaman bakteri endofit pada varietas padi yang ditanam di daerah Cikembar Sukabumi ini menunjukkan bahwa bakteri endofit yang ada tersebut kemungkinan besar juga merupakan bakteri rhizosfer dari lahan pertanian padi yang merupakan inang bagi berbagai jenis bakteri rhizosfer.

KESIMPULAN

Enzim *RsaI* dan *HaeIII* mampu menghasilkan sejumlah besar karakter pembeda antar isolat dan dapat digunakan untuk analisis keragaman dan kekerabatan bakteri endofitik. Enzim *RsaI* menghasilkan 11 pola pita; sedangkan enzim *HaeIII* menghasilkan 14 pola pita. Secara keseluruhan isolat terbagi menjadi 29 kelompok. Banyaknya kelompok yang terbentuk memperlihatkan bahwa bakteri endofit memiliki keragaman yang cukup tinggi. Pada koefisien similaritas 75% isolat yang diteliti terbagi menjadi 4 kelompok kekerabatan. Tidak ada kecenderungan pengelompokan berdasarkan pada tanaman inangnya akan tetapi terdapat kecenderungan pengelompokan

berdasarkan jenisnya yang terbagi ke dalam jenis *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Acidovorax* dan *Pseudomonas*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Proyek Penelitian yang dibiayai dengan sumber dana DIPA APBN TA 2006, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Departemen Pertanian RI (No. DIPA 5038.0460 A1; sebagai penanggung Jawab adalah Dwi Ningsih Susilowati, M.Si. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Indah Puspitasari dan Siti Aminah atas bantuannya dalam penyelesaian kegiatan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bacon CW, AE Glenn and DM Hinton. 2002. Isolation, in planta detection and culture of endophytic bacteria and fungi. In: CJ Hurst, RL Crawford, MJ McInerney, GR Knudsen and LD Stetzenbach (Eds.). *Manual of Environmental Microbiology*, 543-553. 2nd ed. ASM Press, Washington DC.
- Bell CR, GA Dickie, WLG Harvey and JWYF Chan. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41, 46-53.
- Bottini R, F Cassan and P Piccoli. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 497-503.
- Compant S, B Duffy, J Nowak, C Clément and EA Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951-959.
- Elbeltagy A, K Nishioka, H Suzuki, T Sato, YI Sato, H Morisaki, H Mitsui and K Minamisawa. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 617-629.
- Feng Y, D Shen and Song W. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* Y19 promotes host plant growth and affects allocation of host photosynthates. *J. Appl. Microbiol.* 100, 938-945.
- Hallman J, A Quadt-Hallmann, WF Mahaffee and JW Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43, 895-914.
- Hallman J. 2001. Plant interaction with endophytic bacteria. In: MJ Jager and NJ Spence. *Biotic Interaction in Plant-Pathogen Association*. CBA, London.
- Kobayashi DY and JD Palumbo. 2000. *Bacterial Endophytes and Their Effects on Plants and Uses in Agriculture*. CW Bacon and JF White Jr (Eds.)- Marcel Dekker, New York.
- Lazo GR, R Roffey and DW Gabriel. 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 77, 448-453.

- Lesmana OS, HM Toha dan I Las. 2003.** *Deskripsi Varietas Unggul Baru Padi*. Balai Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi.
- Mano H, F Tanaka, C Nakamura, H Kaga and H Morisaki. 2007.** Cultivable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza saliva*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environment* **22**(2), 175-185.
- Mano H and H Morisaki. 2008.** Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and Environment* **23**(2), 109-117.
- McChang MR, AA Padheye and L Ajello. 1999.** Storage of stock culture of filamentous fungi and yeast in sterile distilled Water. *Applied Microbiology* **35**, 218-222.
- Reiter B, U Pfeifer, H Schwab and A Sessitsch. 2002.** Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2261-2268.
- Rodiyah. 2003.** Distribusi dan Diversitas Genetik Bakteri Diazotrof Endofitik pada Tebu (*Saccharum offwinarum* L.). *Tests*. Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Sambrook J and DW Russel. 2001.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Strobel G and B Daisy. 2003.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(4), 491-502.
- Susilowati DN, A Akhdiya, K Mulya, F Pratiwi, H Purwanti, A Suhendar, I Manzila, RD Hastuti, D Wahyuno, D Manohara, N Hidayatun, S Salma, Nurichana, S Soedjono, R Saraswati dan K Herlina. 2006.** *Laporan Hasil Penelitian. Konservasi dan Karakterisasi Mikroba Pertanian*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
- Weidner S, W Arnold and A Pukle. 1996.** Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of gene encoding 16S rRNA and 23 S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic finger printing and partial 16S rRNA sequencing. *Applied Environmental Microbiology* **64**, 2096-2104.
- Zinniel DK, P Lambrecht, NB Harris, Z Feng, D Kuczmarski and P Higley. 2002.** Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2198-2208.