

ISOLASI DNA TOTAL BAKTERI *Bacillus* sp. ENDOFIT KELAPA SAWIT

Ika Jati Cahyani¹, Dewi Indriyani Roslim², Fifi Puspita³

¹Mahasiswa Program S1 Biologi, FMIPA, Universitas Riau

²Dosen Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Riau

³Dosen Jurusan Agroteknologi, Faperta, Universitas Riau

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

Jatiika@gmail.com

ABSTRACT

Endophytic bacteria are living and saprophyte bacteria associated with plant tissue without causing harm to the plant. One of endophytic bacteria is from the genus of *Bacillus* sp. Molecular analysis using 16S rRNA genes needs to be done to identify and determine the species of endophytic bacteria. The purpose of this study was to isolate DNA of endophytic bacteria originated from palm oil plants by using 16S rRNA gene. This research was conducted from February to May 2016. Bacteria was isolated from 3 healthy palm plants, existed around oil palm crops which were afflicted by disease of rotting base on the stem. Of each plant, bacteria were isolated from the stem, roots, stems and leaf. Research methods included the manufacture of medium *Nutrient Agar* (NA) and *Nutrient Broth* (NB), rejuvenation of the isolates of bacteria, bacterial DNA isolation and electrophoresis. The whole (12) isolates of endophytic bacteria which successfully isolated showed that the total DNA retrieved was intact, characterized by a thick and intact band.

Keywords : *Bacillus* sp., Endophytic bacteria, Isolation DNA, *Gen 16S rRNA*, Palm oil.

ABSTRAK

Bakteri endofit merupakan bakteri saprofit yang hidup dan berasosiasi dengan jaringan tanaman tanpa menimbulkan kerugian pada tanaman. Salah satu bakteri endofit adalah dari genus *Bacillus* sp. Analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA perlu dilakukan untuk mengidentifikasi dan menentukan spesies dari bakteri endofit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi DNA bakteri endofit asal tanaman kelapa sawit dengan menggunakan gen 16S rRNA. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari hingga Mei 2016. Bakteri diisolasi dari 3 tanaman kelapa sawit yang sehat, yang berada disekitar tanaman kelapa sawit yang terserang penyakit busuk pangkal batang. Dari setiap tanaman bakteri diisolasi dari pelepah, akar, batang dan daun. Metode penelitian meliputi pembuatan medium *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB), peremajaan isolat bakteri, isolasi DNA bakteri, PCR, elektroforesis. Seluruh (12) isolat bakteri endofit yang berhasil diisolasi menunjukkan bahwa DNA total yang diperoleh utuh yang ditandai dengan pita tebal dan utuh.

Kata kunci : *Bacillus* sp., Bakteri endofit, Isolasi DNA, *Gen 16S rRNA*, Kelapa sawit.

PENDAHULUAN

Bakteri endofit merupakan bakteri saprofit yang hidup dan berasosiasi dengan jaringan tanaman tanpa menimbulkan kerugian atau gejala penyakit pada tanaman tersebut (Strobel *et al.* 2003). Keberadaan bakteri endofit di dalam jaringan tanaman banyak memberikan manfaat antara lain membantu mendukung pertumbuhan tanaman karena bakteri endofit mampu menghasilkan zat pengatur tumbuh dan juga berperan dalam fiksasi nitrogen (N) pada beberapa tanaman serta sebagai agen pengendali hayati (Backman dan Sikora 2008).

Bakteri endofit biasanya dapat ditemukan pada jaringan tanaman yang sehat seperti pada berbagai macam jaringan biji, akar, batang dan daun. Jaringan internal pada bagian perakaran memiliki kerapatan populasi bakteri paling tinggi dibandingkan dengan bagian tanaman lain. Bakteri endofit dapat diisolasi mulai dari bagian akar, batang, daun dan biji (Hallman 1997).

Setiap tanaman tingkat tinggi mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan *et al.* 2001). Sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur (Strobel *et al.* 2003). Tanaman kelapa sawit juga memiliki bakteri endofitik yang dapat diisolasi seperti yang telah diisolasi dari tanaman hortikultura dan tanaman pangan.

Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengisolasi

mikroorganisme endofit pada beberapa tanaman, misalnya pada tanaman kelapa sawit yang dilakukan oleh Sapak *et al.* (2008) yang mengatakan bahwa bakteri endofit yang diisolasi dari jaringan akar kelapa sawit tanpa gejala penyakit telah menunjukkan potensi untuk menghambat penyebaran *Ganoderma boninense* Pat. Penelitian lainnya juga mengatakan bahwa *Bacillus* sp. memiliki kemampuan untuk memacu pertumbuhan bibit kelapa sawit serta mempunyai kemampuan untuk mengendalikan jamur *Ganoderma boninense* Pat. (Ali *et al.* 2009)

Pada tanaman *Artemisia annua* L mikroba endofit yang ditemukan yaitu *Bacillus polymixa* yang termasuk ke dalam genus *Bacillus* yang mempunyai ciri sel berbentuk batang, gram positif, fakultatif anaerob, motil, membentuk endospora, dan katalase positif (Simanjuntak *et al.* 2004). Bakteri yang berhasil diisolasi dari akar tanaman jagung adalah dari kelompok *Bacillus* dan *Pseudomonas* karena kedua bakteri tersebut diketahui bersifat dapat memicu pertumbuhan tanaman yang menghasilkan hormon pertumbuhan seperti indole-3-acetic acid (IAA) (Saylendra dan Firnia 2013).

Menurut Joung dan Cote (2001), Teknik penentuan jenis dari bakteri yang lebih akurat adalah dengan menggunakan sekuen seperti 16S rRNA. Analisis dengan menggunakan sekuen 16S rRNA sering digunakan untuk mengklasifikasikan organisme. Sekuen gen 16S rRNA pada bakteri merupakan marka molekular yang baik karena perubahannya yang sangat lambat pada saat evolusi sehingga dapat mengetahui hubungan filogenetik, transfer gen secara lateral jarang terjadi dan memiliki daerah yang sangat stabil

(*conserved region*) maupun daerah yang *variable* (Rychlic 1995).

Adapun identifikasi secara molekular sistem filogenetik dapat menggunakan RNA ribosom (rRNA). Penggunaan 16S-rRNA pertama kali dilakukan oleh Carl Woese pada tahun 1970-an (Woese 1987).

Tahap penelitian ini dilakukan isolasi DNA dari bakteri endofit. Oleh karena itu pada penelitian ini akan digunakan gen 16S rRNA untuk memastikan apakah isolat yang telah diisolasi dari tanaman kelapa sawit merupakan kelompok *Bacillus*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan spesies *Bacillus* sp. endofit yang diisolasi dari pelepah, akar, daun, dan batang kelapa sawit menggunakan urutan nukleotida gen 16S rRNA.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2016 sampai dengan Mei 2016 di Biological Control Community (Bicom) Fakultas Pertanian dan laboratorium Genetika Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau Pekanbaru.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan di dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, jarum ose, bunsen, rak tabung reaksi, enkas, autoklaf, pisau kulkas, *sentrifus*, *waterbath*, pipet mikro berbagai ukuran, tip mikro, *hot plate*, timbangan analitik, perangkat elektroforesis (*Fisions Model FEC 360*, *Large Horizontal Gel System*), UV transilluminator (*Wiseuv WUV-M20*, *Daihan Scientific*), kamera berfilter UV (*Olympus SP-500 UZ*), tabung mikro

1,5 ml dan 50 ml.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12 sampel isolat bakteri endofit yaitu 3 dari pelepah (kode isolat P), 3 dari akar (kode isolat A), 3 dari batang (kode isolat B) dan 3 dari daun (kode isolat D), media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), alkohol 70%, akuades, kitisolasi DNA (*Geneaid DNeasy Blood & Tissue*), etanol absolut, 1,2% agarose, 1x TBE, etidium bromida, *loading dye*, *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*ThermoScientific*), aquabidestilata (dH₂O).

Prosedur Penelitian

Pembuatan Medium *Nutrient Agar*

Sebanyak 2,3 gram *Nutrient Agar* (NA) bubuk dilarutkan ke dalam 100 ml akuades hingga homogen. Medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi

Pembuatan Medium *Nutrient Broth*

Sebanyak 0,8 gram *Nutrient Broth* (NB) bubuk dilarutkan ke dalam 100 ml akuades hingga homogen. Medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi.

Peremajaan Isolat

Kultur murni bakteri ditumbuhkan pada medium cair NB dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 48 jam. Setelah itu bakteri ditumbuhkan pada medium padat NA dicawan petri menggunakan metode gores kuadran (*streak*) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam.

Isolasi DNA Total

Isolasi DNA Genom bakteri dilakukan sesuai instruksi pabrik menggunakan kit Wizard Genomic DNA (Geneaid). Satu koloni bakteri diambil dengan menggunakan ose yang kemudian ditumbuhkan pada 10 ml NB dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruangan. Setelah itu bakteri yang telah tumbuh pindahkan ke tabung 50 ml, setelah itu sentrifus dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang kemudian pelet sel bakteri diambil untuk dilakukan isolasi DNA bakteri. Pelet kemudian ditambahkan 200 µl buffer + lisozim, kemudian dilakukan pipeting agar larutan dan pelet homogen lalu pindahkan ke tabung 1,5 ml. Jika telah homogen inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit (selama inkubasi bolak balik tabung setiap 5 menit sekali). Tambahkan 20 µl proteinase K, kemudian bolak balik tabung sebanyak 4 kali setelah itu inkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit (selama inkubasi bolak balik tabung setiap 3 menit sekali). Tambahkan 200 µl GB buffer kemudian bolak-balik tabung sebanyak 4×, inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit (selama inkubasi bolak balik tabung setiap 3 menit), jika lisis cairan berubah warna menjadi bening. Sentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit setelah itu buang pelet dan supernatan pindahkan ke tabung 1,5 ml. Tambahkan 200 µl etanol absolute kemudian bolak balik tabung sebanyak 3× (jika terdapat gumpalan hancurkan dengan cara pipeting). Pindahkan cairan tersebut ke GD column yang terdapat *collection tube* kemudian sentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Cairan yang terdapat pada *collection tube* dibuang kemudian

ganti dengan *collection tube* yang baru dan tambahkan 400 µl W1 buffer setelah itu sentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit buang cairan yang terdapat pada *collection tube* kemudian pasang kembali *collection tube*. Tambahkan 600 µl wash buffer setelah itu sentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit kemudian buang cairan yang terdapat pada GD column setelah itu pindahkan cairan yang terdapat pada GD column tersebut ke tabung 1,5 ml setelah itu tambahkan 100 µl elution buffer hangat, diamkan selama 3 menit pada suhu ruang setelah itu sentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 3 menit setelah itu dapatlah hasil isolasi DNA bakteri. DNA tersebut kemudian disimpan di dalam kulkas.

Elektroforesis

DNA total yang diperoleh kemudian dicek hasilnya dengan menggunakan alat elektroforesis (*Fisons Model FEC 360, Large Horizontal Gel System*), pada 1,2% gel agarose di dalam 1 × TBE, dengan tegangan 75 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis yang berupa gel diwarnai dengan 3 µl *ethidium bromida*. Pita DNA divisualisasi di atas lampu UV *transilluminator* dan difoto menggunakan kamera (*Olympus SP-500 UZ*). Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita (band) DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Total

Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi DNA total pada 12 isolat bakteri endofit asal kelapa sawit. Isolasi DNA total dilakukan menggunakan kit isolasi DNA untuk bakteri (*Geneaid DNeasy*

Blood & Tissue) yang sesuai dengan petunjuk pabrik. DNA yang berhasil diisolasi nanti akan dijadikan sebagai DNA cetakan pada proses amplifikasi DNA.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa DNA total yang diperoleh utuh yang ditandai dengan pita tebal di atas 10000 pb. DNA total dari beberapa isolat menunjukkan ada juga DNA yang *smear* atau terdegradasi, namun DNA tersebut tetap dapat digunakan sebagai cetakan pada PCR (Gambar 4.1). Pita DNA *smear* dapat terjadi karena DNA yang terisolasi tidak utuh sehingga fragmen-fragmen DNA dengan ukuran berbeda tertahan pada gel sesuai dengan ukuran pasang basa DNA (Lewis 2003).



Keterangan : (M) *GeneRuler* 1kb DNA ladder, (1) A1, (2) A2, (3) A3, (4) B1, (5) B2, (6) B3, (7) D1, (8) D2, (9) D3, (10) P1, (11) P2, (12) P3

Gambar 1. Profil pita DNA total dari 12 sampel isolat bakteri endofit kelapa sawit yang di elektroforesis pada 1,2% gel agrose.

Isolasi DNA dengan menggunakan Kit tidak menjamin bahwa proses isolasi selalu berhasil, namun terkadang isolasi dengan menggunakan kit juga kerap gagal yang artinya tidak diperoleh DNA total. Hasil dari isolasi DNA total yang diperoleh juga memiliki kualitas yang berbeda. *Smear* yang terdapat pada

DNA terjadi karena isolat yang digunakan dalam proses isolasi DNA diduga berasal dari isolat yang belum murni sehingga hasil dari visualisasi pada saat elektroforesis terdapat *smear*. Selain itu, kontaminan pada DNA juga dapat menyebabkan DNA menjadi *smear*.

Elektroforesis merupakan suatu teknik yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran (berat molekulnya) dan struktur fisik dari molekul. Gel yang digunakan untuk elektroforesis adalah gel agarose yang merupakan polisakarida turunan yang berasal dari alga merah. Untuk memisahkan sampel DNA yang berukuran 200-50.000 bp, biasanya digunakan gel agarose sedangkan untuk sampel DNA yang memiliki ukuran yang lebih pendek 5-500 bp digunakan gel poliakrilamid (Sambrook 2001).

Ukuran atau berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan cara membandingkan laju migrasi fragmen DNA dengan laju migrasi DNA ladder yang telah diketahui ukurannya. Makin kecil ukuran molekulnya maka laju migrasinya semakin cepat, karena matriks gel mengandung jaringan kompleks berupa pori-pori sehingga partikel-partikel tersebut dapat bergerak melalui matriks (Brown 1992).

Visualisasi DNA dilakukan dengan bantuan paparan sinar ultraviolet atau jika DNA tetap tidak terlihat jelas maka gel agarose direndam di dalam larutan etidium bromida terlebih dahulu kemudian dibilas dengan menggunakan aquades. Etidium bromida merupakan pewarna mutagenik yang akan berikatan dengan bagian basa dari DNA dan menyebabkan tranmisi sinar UV sehingga menjadi dapat dilihat (Surzycki 2000).

Kit isolasi DNA mengandung komponen-komponen yang berfungsi pada masing-masing tahap isolasi DNA. Penggunaan Buffer + lisozim berfungsi untuk melisiskan sel. Proteinase K berfungsi untuk memecah ikatan peptida pada protein. GB Buffer berfungsi untuk menjaga stabilitas DNA. Etanol absolute berfungsi agar DNA terpisah dari zat lainnya namun penggunaan etanol absolut ini tidak akan menghancurkan DNA sehingga hasil DNA total yang diperoleh utuh. W1 buffer berfungsi untuk menghilangkan residu protein dan residu RNA terdegradasi pada membran. Wash buffer digunakan untuk menghilangkan residu garam pada membran. Elution buffer digunakan untuk mengikat pengotor selain DNA agar DNA terpisah sempurna dari pengotor.

KESIMPULAN

DNA total seluruh (12) isolat bakteri *Bacillus* sp. endofit yang berhasil diisolasi menunjukkan bahwa DNA total yang diperoleh ditandai dengan pita tebal dan utuh di atas 10000 pb.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ir. Fifi Puspita, M.P yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ali M, Puspita F, Alhadda I. 2009. Uji Indikasi Beberapa Isolat *Bacillus* sp. Lokal Riau Terhadap Jamur *Ganoderma boninense* Penyebab Busuk Pangkal Batang Kelapa Sawit di Pembibitan Awal.

Laporan Penelitian Research Grant I-MHERE Project. Pekanbaru.

- Backman PA, Sikora RA. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biol Control*. 46(1):1-3. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.009.
- Brown TA. 1992. *Genetics: A molecular approach*. 2nd ed. Chapman & Hall, London; xxii + hlm.467.
- Hallman J, Quadt Hallman A, Mahafee WF, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytic in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43: 895-914.
- Joung KB, Cote JC. 2001. Phylogenetic Analysis of *Bacillus thuringiensis* Serovars Based on 16S rRNA Gene Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Journal of Applied Microbiology* 90:115-122.
- Lewis R. 2003. *Human Genetics: Concepts and applications*. The McGraw-Hills Company, Inc. Boston
- Rychlic W. 1995. Selection of primer for polymerase chain reaction. *Molbiotechnol* 3:129-134.
- Sapak Z, Meon S, Ahmad ZAM. 2008. Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of *Ganoderma* infection in oil palm. *Int. J. Agri. Biol.*, 10: 127-32.

- Saylendra A, Firnia D. 2013. *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp. asal endofit akar jagung (*Zea mays* L.) yang berpotensi sebagai pemacu pertumbuhan tanaman. *Jurnal Ilmu Pertanian dan Perikanan*. 2(1):19-27.
- Simanjuntak P, Bustanusallam, Malini, Otovina, Rahayuningsih, Said. 2004. Isolasi dan Identifikasi artemisinin dari hasil kultivasi mikroba endofit dari tanaman *Artemisia annua*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 15(2):68-74.
- Surzycki S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Strobel GA, Daisy B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Review Microbiol. and Mol. Biology*. 67(4):491-502.
- Tan RX, Zou WX. 2001 Endophytes: a rich source of functional metabolites. *NatProd.Rep*. 18: 448-459.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution *Microbiological Reviews*. 51(2): 221-271.

