



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

BAB 3

KERAGAMAN GENETIK BAKTERI ANTAGONIS

PSEUDOMONAS sp. CRB

Pendahuluan

Keragaman genetik adalah tingkat keragaman yang mengacu kepada total jumlah karakter genetik yang menyusun genetik suatu spesies. Keragaman genetik dalam spesies diperlukan untuk menjaga keragaman di antara spesies. Jika satu spesies dihilangkan dari sistem, siklus akan terganggu dan komunitas akan didominasi oleh spesies tunggal. Keragaman genetik berperan penting dalam pertahanan hidup dan kemampuan beradaptasi dari suatu spesies. Ketika lingkungan berubah, variasi genetik yang kecil diperlukan untuk beradaptasi dan bertahan hidup. Spesies yang mempunyai tingkat keragaman genetik yang besar di antara spesies di dalam populasinya akan mempunyai lebih banyak variasi untuk memilih variasi gen tertentu yang paling sesuai. Spesies yang mempunyai keragaman genetik yang sangat sedikit akan menghadapi resiko yang besar dalam kondisi ini.

Analisis keragaman genetik rutin dilakukan dengan menggunakan gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda filogenetik untuk mikroorganisme karena mengandung daerah terkonservasi yang ditemukan pada semua mikroorganisme dan unik terhadap spesies yang berlainan maupun berdekatan. Selain itu, gen 16S rRNA mempunyai daerah variabel untuk menguji kekerabatan (Woose 1987; Moyer *et al.* 1994). Analisis keragaman genetik menggunakan gen 16S rRNA dapat dilakukan dengan metode hibridisasi *in-situ*, *ribotyping*, *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan analisis sekuen DNA.

Analisis RFLP yang dilakukan pada gen 16S rRNA disebut *amplified DNA restriction analysis* (ARDRA) (Vanechoutte *et al.* 1992). ARDRA ialah teknik yang telah rutin dilakukan untuk mengetahui keragaman mikrob dan struktur komunitasnya (Weidner *et al.* 1996; Zhou *et al.* 1997; Dunbar *et al.* 1999), identifikasi spesies (Vanechoutte *et al.* 1995; Hall *et al.* 1999; Ross *et al.* 2000), dan studi taksonomi dan filogeni (Heyndrickx *et al.* 1996). Analisis sekuen DNA



adalah suatu metode untuk mengetahui keragaman dengan suatu sekuen gen 16S rRNA menggunakan *software* (Lagace *et al.* 2004). Keuntungan yang didapatkan dengan menggunakan metode analisis sekuen gen 16S rRNA ialah bersifat universal, mempunyai fungsi spesifik, dapat dibandingkan, kronometer molekuler yang dapat dipercaya dan pusat data mudah diperoleh melalui internet.

Pemilihan kandidat agen biokontrol akan lebih leluasa jika keragaman genetik di antara isolat-isolat bakteri antagonis tinggi. Kelompok bakteri yang mempunyai tingkat keragaman genetik tinggi di dalam populasinya akan lebih banyak variasi untuk memilih di antaranya yang paling sesuai atau dikembangkan semuanya sekaligus.

Tujuan penelitian

1. Mengetahui keragaman genetik di antara *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan berdasarkan *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA).
2. Mengidentifikasi secara molekuler dan mengetahui keragaman genetik di antara *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan berdasarkan sekuen gen 16S rRNA.

Bahan dan Metode

Isolasi DNA genom. DNA genom diisolasi dari kultur *Pseudomonas* sp. CRB dalam medium cair King's B yang diinkubasi selama semalam di atas penggoyang pada suhu ruang. Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan metode *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Sambrook & Russel 2001). Sebanyak 1.5 ml kultur sel *Pseudomonas* sp. CRB diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pelet yang didapat kemudian diresuspensi dengan 250 µl bufer *Tris EDTA* (TE) 1x dan disentrifugasi kembali. Proses ini dilakukan dua kali. Pelet yang didapat disuspensi dengan 250 µl bufer TE 1x dan 5 µl lisozim. Tabung dibolak-balik untuk mempercepat lisis sel. Selanjutnya, suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Proses lisis sel dilanjutkan dengan



menambahkan 500 μl *sodium dedocyl sulfate* (SDS) 10% dan 10 μl proteinase-K, kemudian tabung dibolak-balik. Suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Sebanyak 80 μl NaCl 5M dan 100 μl CTAB 10% ditambahkan ke dalam suspensi, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit dan tabung kembali dibolak-balik.

Purifikasi DNA dan pengendapan debris sel dilakukan dengan menambahkan 500 μl *Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol* (P:C:I) dengan perbandingan (25:24:1). DNA dipisahkan dari debris sel dengan cara sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Terbentuk dua fase, fase air bagian atas yang mengandung DNA dan fase organik debris bagian bawah. Fase bagian atas diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro steril yang baru. Selanjutnya, dipurifikasi dengan menambahkan C:I dengan perbandingan (24:1) dan disentrifugasi kembali. Fase air bagian atas diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus steril yang baru.

Proses pengendapan DNA dilakukan dengan menambahkan alkohol absolut dingin sebanyak 2x volume supernatan dan sodium asetat 10% sebanyak 10 volume supernatan. Pengendapan dibantu dengan inkubasi di dalam *freezer* (-5°C) selama satu malam dan kemudian dilakukan sentrifugasi. Pelet yang didapatkan ditambahkan etanol 70% dingin untuk mengikat air dan suspensi kembali disentrifugasi. Supernatan dibuang, sedangkan pelet dikeringudarkan dengan cara membuka tutup tabung mikrosentrifus selama 3 jam sampai alkohol menguap. Kemudian pelet DNA ditambahkan 20 μl ddH₂O.

Amplifikasi gen penyandi 16S rRNA. DNA yang menyandikan 16S rRNA dari masing-masing isolat diamplifikasi dengan primer hulu 63f (5'-CAG GCC TAA AAC ATG CAA GTC-3') dan primer hilir 1387r (5'- GGG CGG WGT GTA AA GGC-3'). Primer ini mengamplifikasi sekitar 1.300 bp konsensus gen 16S rRNA yang bersifat umum untuk domain bakteri (Marchesi *et al.* 1998). Reaksi PCR dibuat dalam volume total 50 μl . Campuran reaksi mengandung 25 μl bufer Taq C II, 8 μl campuran *deoxynucleotide triphosphate* (dNTP) masing-masing 2.5 mM, 2 μl masing-masing primer hulu dan hilir (10 pmol/ μl), 0.5 μl *long amplification* (LA) *Taq polymerase* (5 unit/ μl) (Takara, Jepang), 5 μl DNA

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



cetakan (20 ng/μl) dan ddH₂O. Proses PCR dilakukan dalam mesin PCR GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Jerman), terdiri dari pra-denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, diikuti dengan 30 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit, dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 1.5 menit, dengan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Untuk mengetahui ukuran fragmen, DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada agarose 1% dalam bufer *Tris base Acetic acid EDTA* (TAE) pada 70V selama 1 jam. Hasil elektroforesis diwarnai dengan ethidium bromida 5 μg/ml selama 15 menit dan divisualisasi dengan *UV transilluminator*.

Analisis ARDRA. 16S rDNA hasil amplifikasi dipurifikasi dari gel menggunakan kit ekstraksi DNA dari gel Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Amerika Serikat). Produk yang telah dipurifikasi (1.5 μg) dipotong dengan 5 unit masing-masing enzim restriksi *AluI*, *RsaI* dan *HaeIII* (Fermentas Life Science, Uni Eropa). Pemotongan dilakukan pada suhu 37°C selama semalam. Fragmen hasil pemotongan dielektroforesis dengan *agarose* 2% dalam bufer TAE pada 100V selama 1 jam. Hasil elektroforesis diwarnai dengan ethidium bromida 5 μg/ml selama 15 menit dan divisualisasi dengan *UV transilluminator*. DNA 1 kb *ladder* (Fermentas) digunakan sebagai penanda ukuran molekul DNA. Untuk menentukan pita-pita yang terlihat pada gel sebagai hasil pemotongan enzim restriksi, estimasi ukuran fragmen DNA dilakukan dengan persamaan matematika yang menunjukkan hubungan antara laju migrasi dengan berat molekul. Persamaannya adalah $D = a - b (\log M)$ (Brown 1986); D adalah jarak migrasi, M adalah berat molekul, a dan b adalah konstanta yang dipengaruhi oleh kondisi elektroforesis.

Pita-pita yang terbentuk dari pemotongan masing-masing enzim restriksi, dibuat data binernya berdasarkan ada atau tidak pita tersebut, dengan nilai 1 atau 0. Pola pita yang diperoleh dari tiap-tiap enzim restriksi kemudian digabungkan untuk mendapatkan satu pola pemotongan ketiga enzim dari masing-masing isolat. Pola biner ini digunakan untuk membuat dendrogram dengan menggunakan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

metode *neighbour-joining* dalam program *Treecon for Windows* 1.3b (Van de Peer & De Wachter 1997).

Analisis sekuen gen 16S rRNA. 16S rDNA yang teramplifikasi dipurifikasi dari gel menggunakan *kit* purifikasi Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Amerika Serikat). Sekuensing satu arah menggunakan primer hulu dari produk PCR dilakukan dengan mesin sekuen ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Amerika Serikat) di PT Charoen Pokphand, Indonesia. Pencarian miripan sekuen gen 16S rRNA di pusat data *GenBank* dikerjakan melalui layanan pelayanan *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide* (BLASTN) situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>). Untuk menentukan kekerabatan filogenetik, sekuen gen 16S rRNA disejajarkan menggunakan program ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/), kemudian dianalisis dengan metode *neighbour-joining* sesuai dengan model Jukes dan Cantor di program MEGA versi 4 (Tamura *et al.* 2007). Kekasaran inferensi pohon filogeni dievaluasi dengan 100 *bootstrap* pengulangan pengambilan sampel.

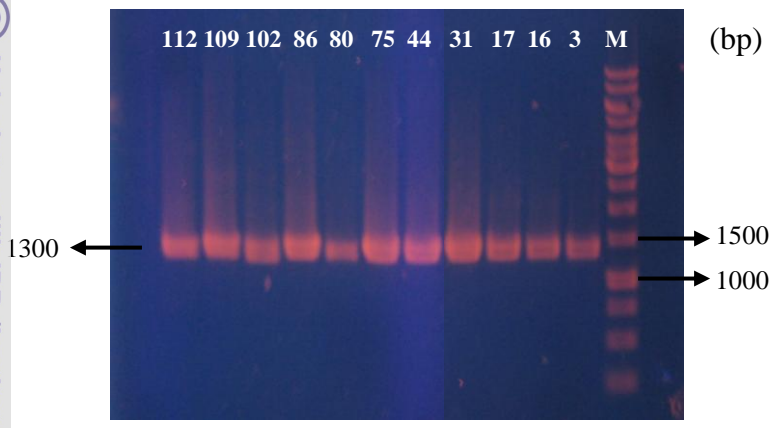
Hasil

Keragaman genetik berdasarkan ARDRA

Pada masing-masing isolat *Pseudomonas* sp. CRB, 16S rDNA dapat diamplifikasi menggunakan primer 63f dan 1387r dan menghasilkan pita berukuran sekitar 1.300 bp (Gambar 3). Keragaman genetik di antara isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan ditentukan berdasarkan analisis pola restriksi 16S rDNA yang diamplifikasi dengan PCR (*Amplified DNA Restriction Analysis* [ARDRA]). Berdasarkan fragmen yang dihasilkan dari pemotongan enzim restriksi *AluI*, *RsaI* dan *HaeIII* dapat dibedakan antara isolat-isolat satu dengan yang lain. Enzim restriksi *AluI*, *RsaI* dan *HaeIII* memotong ikatan fosfodiester pada situs tertentu pada sekuen 16S rDNA sehingga menghasilkan pola pemotongan tertentu. *AluI* memotong pada sekuen GG/CC, *RsaI* memotong pada sekuen GT/AT dan *HaeIII* memotong pada sekuen AG/CT.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memunculkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Pemotongan 16S rDNA dengan enzim restriksi tersebut menghasilkan 3-5 fragmen dengan ukuran yang berbeda (Gambar 4). Oleh karenanya pemotongan dengan ketiga enzim restriksi tersebut telah cukup menghasilkan keragaman yang besar. Pola ARDRA dari 11 *Pseudomonas* sp. CRB menunjukkan adanya variabelitas berdasarkan situs pemotongan enzim restriksi.

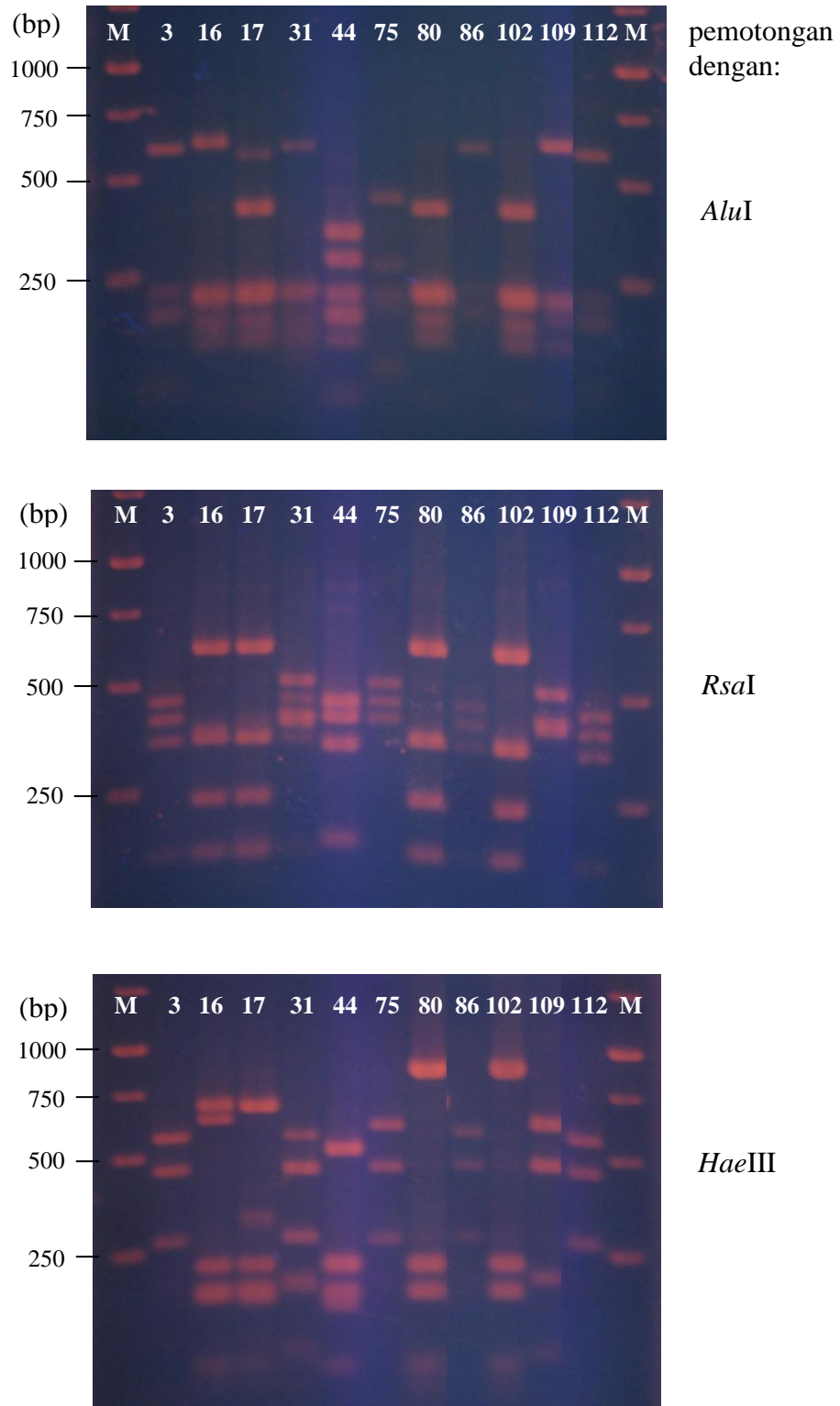


Gambar 3. Elektroforesis 16S rDNA 11 isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan dengan nomer isolat: 3, 16, 17, 31, 44, 75, 80, 86, 102, 109 dan 112. M = Marker 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Pemotongan 16S rDNA dengan enzim restriksi menghasilkan fragmen dengan ukuran pita DNA seperti pada Tabel 3, setelah dilakukan estimasi ukuran pita DNA dibandingkan dengan ukuran pita DNA *marker*. Ukuran fragmen hasil pemotongan dengan tiga enzim restriksi endonuklease *AluI*, *RsaI* dan *HaeIII* merupakan data yang digunakan untuk analisis pengelompokan (kluster). Dalam analisis kluster ini, metode *neighbour-joining* digunakan untuk membuat dendrogram. Pada metode *neighbour-joining*, urutan-urutan variabel yang memiliki kesamaan di antara organisme akan didekatkan atau disatukan. Pengelompokan berdasarkan ukuran fragmen hasil pemotongan enzim restriksi terhadap 16S rDNA (ARDRA) mengungkapkan adanya tingkat keragaman genetik yang tinggi di antara isolat-isolatnya karena terbentuk 7 kelompok yang disebut ribotipe 1-7 (Gambar 5). Hasil ini menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan dapat ditemukan di rizosfer tanaman kedelai dan tingkat keragaman genetik terbukti ada di antara spesies tersebut.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 4 Elektroforesis 16S rDNA setelah dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *AluI*, *RsaI* dan *HaeIII* dari 11 isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil anticendawan. M = Marker 1 kb DNA ladder (Fermentas).



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

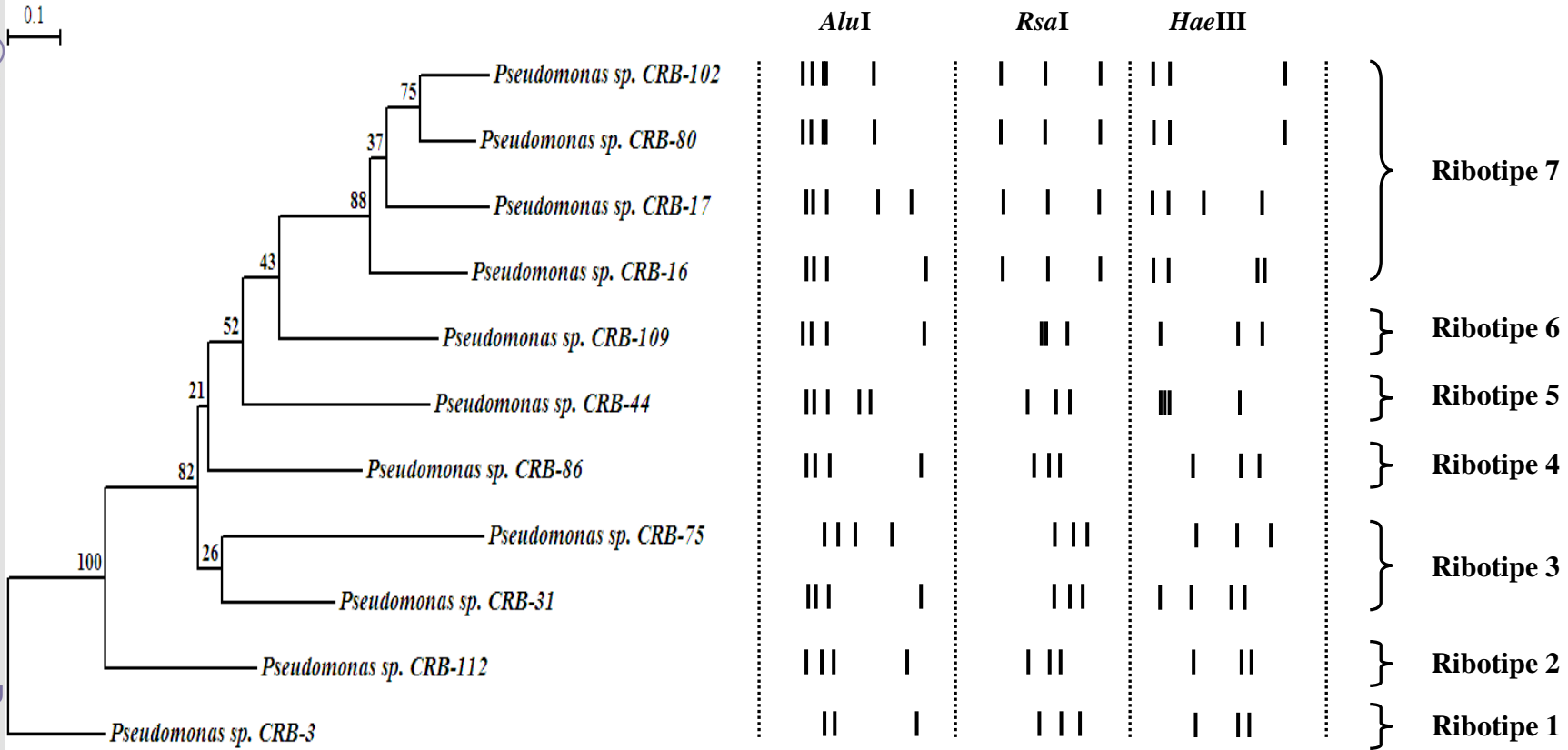
Tabel 3 Fragmen 16S rDNA (bp) hasil pemotongan dengan enzim restriksi *AluI*, *RsaI* dan *HaeIII* isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan.

Isolat	Ukuran fragmen hasil pemotongan enzim restriksi		
	<i>AluI</i>	<i>RsaI</i>	<i>Hae III</i>
CRB 3	630, 200, 140	540, 480, 380	600, 500, 270
CRB 5	700, 200, 110, 80	720, 440, 230	740, 690, 210, 130
CRB 7	650, 430, 200, 110, 80	720, 440, 230	720, 330, 210, 130
CRB 11	670, 200, 110, 80	590, 520, 480	620, 500, 280, 160
CRB 14	380, 290, 200, 110, 80	520, 480, 400	570, 210, 200, 180
CRB 16	470, 270, 230, 150	590, 520, 480	740, 510, 280
CRB 20	430, 200, 200, 110, 80	720, 440, 230	890, 210, 140
CRB 26	670, 200, 110, 80	480, 440, 380	640, 530, 280
CRB 32	430, 200, 200, 110, 80	720, 440, 230	890, 220, 180
CRB 39	700, 200, 110, 80	520, 440, 410	650, 510, 190
CRB 42	590, 150, 80	480, 440, 340	600, 500, 270

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 5 Dendrogram pengelompokan dan elektroforegram *Pseudomonas sp. CRB* yang mempunyai karakter biokontrol, berdasarkan profil restriksi dengan tiga enzim endonuklease *AluI*, *RsaI* dan *HaeIII*. Masing-masing ribotipe ditandai dengan kurung kanan.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Keragaman sekuen gen 16S rRNA

Sekuen gen 16S rRNA dari tiap *Pseudomonas* sp. CRB dapat diperoleh dari hasil sekuensing. Berdasarkan sekuen gen 16S rRNA (600 nukleotida), isolat *Pseudomonas* sp. CRB mempunyai kemiripan yang tinggi (83-100%) terhadap berbagai spesies dalam genus *Pseudomonas* (Tabel 4). Tingkat kemiripan yang beragam menunjukkan keragaman isolat-isolat antagonis *Pseudomonas* sp. CRB.

Tabel 4. Taxon spesies dalam pusat data *GenBank* dengan sekuen gen 16S rRNA yang paling mirip dengan sekuen parsial (600 nukleotida) masing-masing isolat *Pseudomonas* sp. CRB.

Nama Isolat	Kemiripan	Identitas (%)	No Akses
CRB-1	<i>Pseudomonas monteilii</i> galur R23	95	DQ095885.1
CRB-5	<i>Pseudomonas</i> sp. m41	96	EU375659.1
CRB-7	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> galur NyZ12	99	EF544606.2
CRB-11	<i>Pseudomonas</i> sp. CL3.1	83	FM173664.1
CRB-14	<i>Pseudomonas</i> sp. YF3	98	EU220236.1
CRB-15	<i>Pseudomonas putida</i> galur FWC30	92	EU833948.1
CRB-80	<i>Pseudomonas</i> sp. RD9SR1	98	AM911646.1
CRB-86	<i>Pseudomonas</i> sp. G12	91	FJ211222.1
CRB-102	<i>Pseudomonas</i> sp. KLP2	100	AM911670.1
CRB-109	<i>Pseudomonas monteilii</i> galur SeaH-As4w	89	FJ607352.1
CRB-112	<i>Pseudomonas</i> sp. BFF-1	95	EF031081.1

Identifikasi molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rRNA terhadap isolat *Pseudomonas* sp. CRB mengarah ke nama spesies yang berbeda dengan hasil identifikasi berdasarkan sifat fisiologi menggunakan Microgen™ yang telah dilakukan. Meskipun demikian, hasilnya menunjukkan kemiripan dengan spesies-spesies dalam genus *Pseudomonas*. *Pseudomonas* CRB-3 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas monteilii* galur R23 yang diisolasi dari lahan persawahan (Rajendran *et al.* 2005). *Pseudomonas* sp. CRB-16 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. m41 yang diisolasi oleh

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University (Ahn *et al.* 2008). *Pseudomonas* sp. CRB-17 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas plecoglossicida* galur NyZ12 yang merupakan isolat *Pseudomonas plecoglossida* baru pendegradasi sikloheksilamin (Shen *et al.* 2008). *Pseudomonas* sp. CRB-31 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. CL3.1 yang merupakan bagian dari komunitas bakteri yang ada di sampel penggalian dari formasi tufa (Cousin 2008). *Pseudomonas* sp. CRB-44 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. F3 yang merupakan bakteri pendegradasi fluoroglikofen etil (Qiu 2007). *Pseudomonas* sp. CRB-75 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas putida* galur FWC30, merupakan bakteri yang berasosiasi dengan spora cendawan mikoriza arbuskular (Bharadwaj *et al.* 2008). *Pseudomonas* sp. CRB-80 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. RD9SR1 dan *Pseudomonas* sp. RB-102 dengan *Pseudomonas* sp. KLP2 yaitu *Pseudomonas* fluoresen yang diisolasi dari rizosfer tanaman padi (Steindler *et al.* 2008). *Pseudomonas* sp. RB-86 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. G12 yang merupakan bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan ayam (Wang & Shen 2008). *Pseudomonas* sp. CRB-109 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas monteilii* galur SeaH-As4w yaitu bakteri dari bekas tambang yang terkontaminasi arsenik sampai daerah muara Kwangyang, Republik Korea (Chang *et al.* 2009). *Pseudomonas* sp. CRB-112 mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas* sp. BFF-1, koleksi dari *College of Life Science*, China.

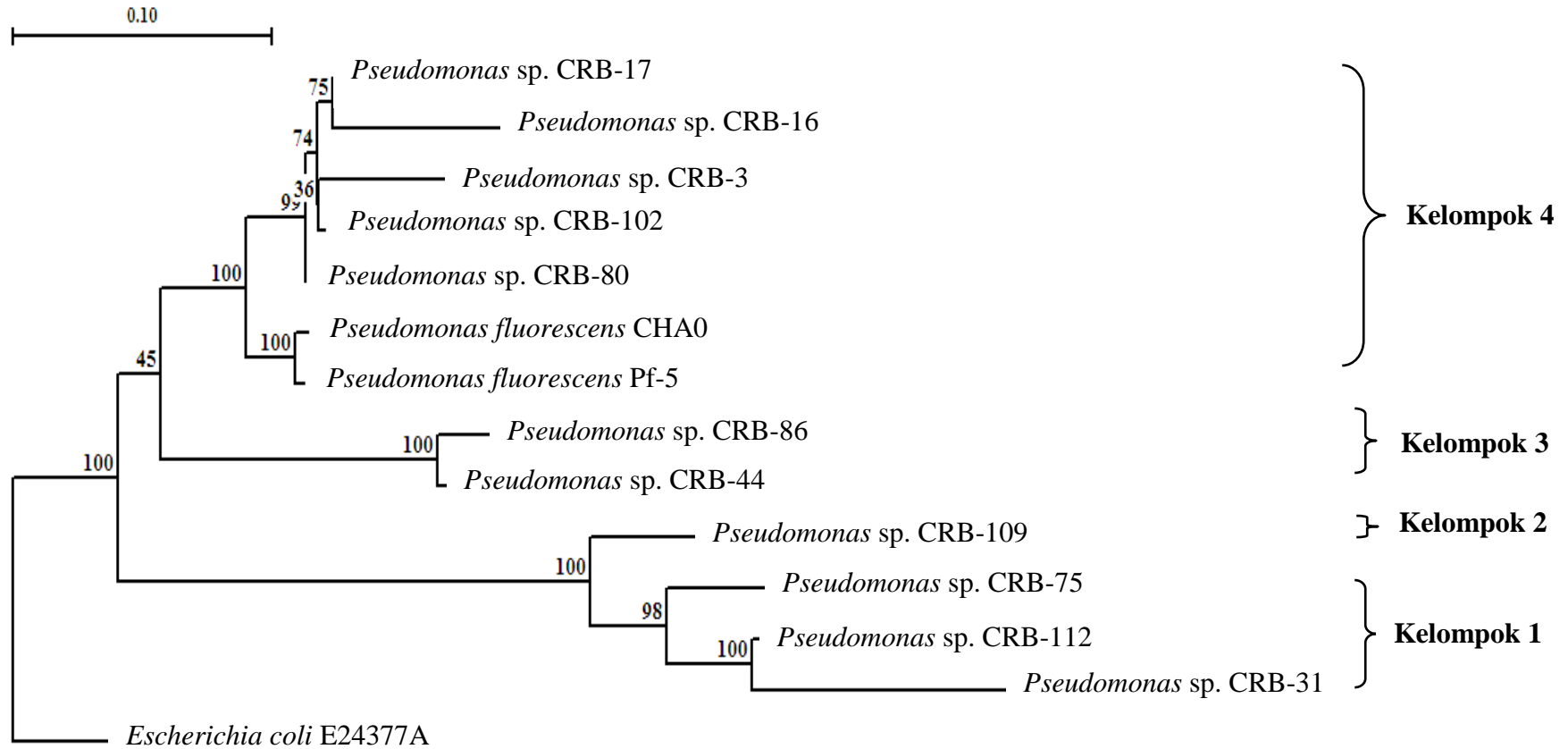
Hubungan kekerabatan di antara 11 *Pseudomonas* sp. CRB digambarkan sebagai dendogram kekerabatan (Gambar 6). Dendogram menunjukkan 4 kelompok. Kelompok 1, 2 dan 3 yaitu *Pseudomonas* sp. CRB 31, 75, 109, 111, dan 112 terpisah dengan isolat yang lain. Kelompok 4 yaitu *Pseudomonas* sp. CRB (3, 16, 17, 80, 82, and 102) berada dalam satu kelompok dengan strain referensi *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Pf-5, hal ini menunjukkan bahwa mereka mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat. Ada tumpang tindih antara kelompok kekerabatan berdasarkan ARDRA dengan kelompok kekerabatan berdasarkan sekuen gen 16S rRNA. Seperti terlihat pada ribotipe ARDRA 7 dengan kelompok filogenetik 4. Oleh karenanya, pada kelompok ARDRA yang sama, mereka berkerabat dekat satu dengan yang lain.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang meminumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 6 Pohon filogenetik di antara sebelas isolat *Pseudomonas* sp. CRB dengan galur referensi yang mempunyai sifat biokontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (No akses AJ278812), Pf-5 (CP000076.1) dan *Escherichia coli* (E24377A) sebagai kelompok γ proteobacteria berdasarkan sekuen parsial (600 nukleotida) gen 16S rRNA.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengurniakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Pembahasan

Analisis ARDRA dari 11 *Pseudomonas* sp. CRB menunjukkan tujuh kelompok ribotipe. Hal ini berarti bahwa *Pseudomonas* sp. CRB mempunyai keragaman yang tinggi di antara isolat-isolatnya. Keragaman genetik berperan penting dalam bertahan hidup dan adaptasi dari suatu spesies. Ketika terjadi perubahan lingkungan, variasi genetik yang tidak begitu banyak diperlukan untuk menghasilkan perubahan dalam organisme yang dapat digunakan untuk beradaptasi dan bertahan hidup. Suatu spesies yang mempunyai tingkat keragaman genetik yang tinggi di antara populasinya akan mempunyai variasi variasi di antaranya yang dapat dipilih, yang paling sesuai. Oleh karenanya, keragaman genetik *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan yang tinggi memberikan keuntungan untuk dapat memilih isolat yang paling baik yang sesuai dengan kemampuannya untuk menekan penyakit dan kompetensinya berada di rizosfer atau mengembangkan semuanya sekaligus. Selanjutnya, pola potongan pita 16S rDNA dapat dijadikan pustaka profil ARDRA yang dapat digunakan sebagai referensi untuk beberapa *Pseudomonas* yang berasal dari rizosfer dan mempunyai sifat biokontrol. ARDRA dapat menunjukkan keragaman genetik berdasarkan pola pemotongan 16S rDNA tetapi masih perlu dilengkapi dengan melihat sekuen gen penyandi 16S rRNA untuk menentukan nama spesiesnya.

Sekuen gen 16S rRNA adalah sekuen yang mempunyai panjang sekitar 1.550 bp dan mempunyai daerah yang terkonservasi dan daerah yang variabel. Gen ini cukup besar dengan polimorfisme antar spesies sehingga dapat digunakan sebagai alat untuk membedakan antar spesies (Woese 2006; Clarridge 2004). Sekuen basa nukleotida gen yang mengkode 16S rRNA merupakan standar yang penting untuk identifikasi bakteri. Bakteri yang berbeda mempunyai sekuen 16S rRNA tertentu. Identifikasi didasarkan pada sekuen yang paling cocok dari bakteri yang akan diidentifikasi dengan semua sekuen gen 16S rRNA yang telah diketahui di pusat data *GenBank*.

Sekuen gen penyandi 16S rRNA dari semua isolat mempunyai kemiripan dengan *Pseudomonas*. Hal ini menunjukkan bahwa sifat molekuler sesuai dengan sifat fenotifnya yang menunjukkan sifat-sifat genus *Pseudomonas*. Meskipun

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



nama spesies yang teridentifikasi berbeda. Sifat molekuler melengkapi sifat fenotif yang sangat bervariasi tetapi tidak cukup sebagai pembeda antar spesies. Seperti hasil identifikasi berdasarkan sifat fisiologis pada bab 2. *Pseudomonas* sp. CRB-3, CRB-80 dan CRB-86 dan CRB-112 teridentifikasi sebagai *Pseudomonas pseudomallei* dengan kemiripan yang sama yaitu 99.99%, meskipun hasil uji biokimianya tidak identik. Tingkat kemiripan yang beragam terhadap berbagai spesies *Pseudomonas* menunjukkan keragaman spesiesnya.

Perbandingan sekuen antara spesies yang berbeda memberikan tingkat kedekatan hubungan kekerabatan antara satu dengan lainnya. Perbedaan yang relatif lebih besar atau perbedaan yang relatif lebih kecil di antara dua spesies menunjukkan waktu yang lebih awal atau lebih akhir saat mereka berbagi suatu sifat asal usul yang sama. Pohon filogenetik membentuk empat kelompok hubungan kekerabatan (Gambar 6). Isolat-isolat yang berada dalam kelompok yang sama mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat. Oleh karenanya, *Pseudomonas* sp. CRB (3, 16, 17, 80 dan 102) yang berada dalam satu kelompok dengan galur biokontrol referensi *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Pf-5, mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat. Spesies-spesies yang mempunyai kekerabatan yang dekat dapat diperkirakan mempunyai sifat-sifat yang hampir sama yaitu sifat sebagai bakteri biokontrol. Keragaman genetik di antara isolatnya merupakan sumbangan untuk deposit gen di koleksi biakan yang dapat dikembangkan lebih jauh.

Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa pohon kekerabatan yang diperoleh dari sekuen gen 16S rRNA secara parsial atau sekuen penuh sangat mirip (Massana *et al.* 1997; Xiang *et al.* 2005). Karena hanya menekankan pada identifikasi dan determinasi kelompok *Pseudomonas*, analisis sekuen parsial dapat digunakan. Sejalan dengan alasan ini, hampir kebanyakan isolat bakteri klinis 500 bp sekuen awal memberikan hasil pembedaan yang mencukupi untuk identifikasi (Hall *et al.* 2003). Analisis sekuen gen 16S rRNA sekitar 600 bp memberikan identifikasi yang cepat isolat-isolat yang mengarah ke genus *Pseudomonas*. Akan tetapi untuk membedakan spesies-spesies yang berhubungan sangat dekat atau menemukan spesies baru, maka sekuen lengkap dari seluruh gen 16S rRNA sangat diperlukan. Penentuan kriteria identifikasi yang menggunakan kemiripan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

$\geq 95\%$ (Bosshard *et al.* 2003) atau $\geq 97\%$ adalah sama genus dan $\geq 99\%$ adalah sama spesies (Drancourt *et al.* 2000) juga menyebutkan perlunya sekuen lengkap gen 16S rRNA. Oleh karenanya, isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB hanya bisa disebut mempunyai kemiripan sekian persen dengan spesies-spesies dalam genus *Pseudomonas* seperti disebutkan dalam Tabel 4.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor) **mpulan**

1. Sebelas isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan mempunyai tingkat keragaman genetik tinggi dengan terbentuknya 7 kelompok ribotipe berdasarkan analisis kluster *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA).
2. Identifikasi molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rRNA isolat-isolat *Pseudomonas* sp. CRB penghasil senyawa anticendawan menunjukkan kemiripan yang tinggi antara 83-100% terhadap *Pseudomonas* sp. Sekuen gen 16S rRNA memperlihatkan keragaman genetik dengan tingkat kemiripan spesies yang beragam dalam genus *Pseudomonas*. Pohon filogenetiknya membentuk empat kelompok yang menunjukkan hubungan kekerabatan yang dekat di antara isolatnya. *Pseudomonas* sp. CRB (3, 16, 17, 80 dan 102) berada dalam satu kelompok dengan galur biokontrol referensi *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Pf-5. Spesies-spesies yang mempunyai kekerabatan yang dekat dapat diperkirakan mempunyai sifat-sifat yang hampir sama yaitu sifat sebagai bakteri biokontrol.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.