Yo

Jurnal Mikrobiologi Indonesia, September 2002, hlm. 39-43
ISSN 0853-358X
Vol. 7, No. 2

Keragaman Genetika Bakteri Tanah dari Rizosfer Kapas Transgenik dan Nontransgenik di Soppeng, Sulawesi Selatan

Soil Bacterial Genetic Diversity from Rhizosfer of Transgenic and Nontransgenic Cotton Plantation in Soppeng, South Sulawesi

MUHAMMAD YUSUF[1], YUSMINAH HALA[2] & ANTONIUS SUWANTO[1,3*]

[1]*Seameo-Biotrop, Jalan Raya Tajur, Bogor 16001*
[2]*Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Makassar, Jalan Daeng Tata Raya, Makassar 90224*
[3]*Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16144*

Techniques based on amplification of 16S-rRNA genes for comparing bacterial communities are now widely used in microbial ecology. In this study, we compared bacterial genetic diversity of transgenic and nontransgenic cotton plantation soil samples to examine the effect of transgenic cotton on soil bacterial diversity. The primer 63f and 1387r specific for bacteria were used to amplify DNA extracted from two soil samples. The PCR products were cloned into pGEM-T Easy and transformed into *Escherichia coli* DH5-α. Total transformants of transgenic and nontransgenic obtained from cotton plantation soil samples were 138 and 123 respectively. Twenty transformants containing 16S-rRNA genes were selected randomly from each library to reveal their amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns employing restriction enzymes *Hha*I, *Rsa*I, and *Hae*III. The results indicated that there were 16 and 14 different ARDRA profiles derived from transgenic and nontransgenic cotton plantation, respectively.

Key words: bacterial diversity, ARDRA, transgenic and nontransgenic cotton

Pada umumnya untuk mempelajari bentuk morfologi, struktur sel, dan sifat biokimia bakteri yang berasal dari lingkungan dilakukan dengan cara isolasi dan karakterisasi melalui kultur (Reeve 1994). Masalah yang dihadapi ialah tidak semua jenis mikrob dapat dikulturkan. Hanya 1% mikrob dari sampel tanah diperkirakan dapat dikulturkan (Suwanto 1994). Kegagalan teknik kultivasi, terutama disebabkan karena kebutuhan nutrisi dan kondisi pertumbuhan bakteri tanah sangat beragam dan kebergantungan intrinsik dari banyak mikroorganisme (Felske *et al.* 1998). Padahal jenis mikrob yang belum dapat dikulturkan juga merupakan komponen utama dari komunitas mikrob secara keseluruhan. Oleh karena itu, teknik kultivasi tidak dapat dijadikan standar untuk mempelajari keragaman bakteri (Borneman *et al.* 1996).

Aplikasi teknik molekuler untuk menganalisis keragaman mikrob, seperti analisis gen 16S-rRNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR) mampu menampilkan keragaman genetika mikrob, baik yang dapat dikulturkan maupun tidak. Gen 16S-rRNA merupakan pilihan karena gen ini terdapat pada semua prokariota dan memiliki bagian atau sekuen konservatif dan sekuen lainnya yang sangat bervariasi (Madigan *et al.* 1997).

* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-323848, Fax. +62-251-315107, E-mail: asuwanto@indo.net.id

Analisis keragaman genetika yang cepat, sederhana, dan murah, dapat dilakukan dengan teknik *amplified ribosomal DNA restriction analysis* (ARDRA) atau *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). ARDRA dapat digunakan untuk analisis populasi bakteri dan perkiraan perubahan genetika dalam waktu tertentu di antara dua lokasi dengan kondisi lingkungan yang berbeda (Deya *et al.* 1995). Analisis ini dilakukan dengan cara mengamplifikasi gen 16S-rRNA dengan menggunakan primer yang disesuaikan dengan sampel DNA yang akan diamplifikasi (Borneman *et al.* 1996). Marchesi *et al.* (1998) telah mendesain primer 63f dan 1387r untuk amplifikasi gen 16S-rRNA yang memungkinkan untuk menduga keragaman bakteri yang berasal dari lingkungan.

Hasil amplifikasi 16S-rRNA ini kemudian dipotong dengan enzim restriksi. Pola hasil pemotongan dengan enzim restriksi ini dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah bakteri yang ada. Metode ini didasarkan pada prinsip pemotongan enzim restriksi yang sangat spesifik pada bagian tertentu dari gen 16S-rRNA sehingga dapat menunjukkan pola filogenetika yang berbeda untuk setiap jenis prokariota (Deya *et al.* 1995). Dari penelitian Moyer *et al.* (1996) yang menggunakan 10 enzim restriksi tetramerik pada analisis RFLP gen 16S-rRNA bakteri, diperoleh tiga enzim yang paling diskriminatif untuk mendeteksi dan membedakan gen 16S-rRNA bakteri. Ketiga enzim tersebut ialah *Rsa*I, *Hha*I, dan *Bst*UI yang kemudian direkomendasikan untuk penapisan pada studi keragaman genetika bakteri.

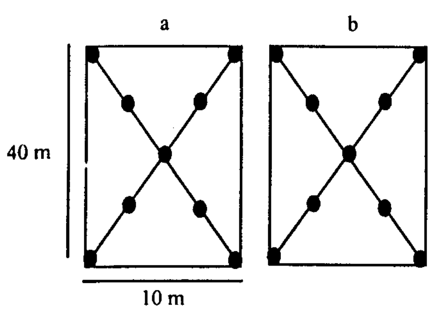
Kapas transgenik Bollgard (NuCOTN 35B) yang ditanam di sejumlah kabupaten di Sulawesi Selatan membawa gen penyandi protein *CrylA(c)* dari *Bacillus thuringiensis* dan gen penyandi resistensi terhadap antibiotik kanamisin (*nptII*) dan streptomisin/spektinomisin (*aad*) asal bakteri. Secara teoritis gen-gen dan protein yang diekspresikan dalam kapas Bollgard merupakan bagian dari aktivitas rutin sejumlah bakteri tanah seperti *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Actinomyces* sp. dan mikroorganisme penghasil antibiotik lainnya. Meskipun demikian, di Indonesia sendiri masih sangat sedikit bahkan belum ada data ilmiah mengenai kemungkinan pengaruh kapas transgenik terhadap mikrobiota tanah. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk membandingkan keragaman genetika bakteri dari tanah yang ditanami kapas transgenik dan nontransgenik menggunakan teknik ARDRA.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel. Contoh tanah diambil dari pertanaman kapas transgenik dan nontransgenik berumur tanam tiga bulan. Kapas transgenik yang dimaksud ialah Bollgard (NuCOTN 35B/BG) dan kapas nontransgenik ialah tanaman isogeniknya, yaitu kapas Delta Pine (DP). Kapas tersebut ditanam pada lahan khusus untuk analisis resiko lingkungan (ARL) di Desa Tetewatu, Kecamatan Lilirilau, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan. Kedua jenis kapas tersebut diperoleh dari PT Monagro Kimia, Jakarta, dan penanaman kedua jenis kapas dilakukan secara berseling. Lahannya memiliki struktur tanah yang agak liat dengan sedikit kandungan batu-batuan kecil. Pengambilan sampel pada kedua pertanaman kapas tersebut dilakukan pada sembilan titik (Gambar 1) masing-masing sekitar 100 g dengan kedalaman galian tanah (10 ± 2) cm. Selanjutnya sampel dari sembilan titik tersebut disatukan dan dihomogenkan untuk perlakuan selanjutnya.

Ekstrak DNA dari Tanah. Ekstrak DNA dari tanah dilakukan dengan menggunakan *ULTRA clean™ soil DNA isolation kit (Mo Bio Laboratory, California)*, sesuai dengan prosedur yang dianjurkan produsennya.

Amplifikasi Gen 16S-rRNA. Isolat DNA sebanyak 1 µl dimasukkan dalam tabung PCR yang berisi 18 µl ddH_20, 0.5 µl dNTP 10 mM, 1 µl enzim Taq polimerase 5 U/µl, 1 µl bufer Taq



Gambar 1. Ilustrasi 9 titik pengambilan sampel pada pertanaman kapas: a. transgenik, b. nontransgenik.

polimerase, 1 µl primer 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAA GTC) 5 pmol, 1 µl primer 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC) 5 pmol (Marchesi *et al.* 1998). PCR dilakukan menggunakan mesin PCR GeneAmp® PCR System 2400, Perkin Elmer, USA dengan kondisi: *pre start* 94°C 2 menit; denaturasi 92°C 2 menit, *annealing* primer 55°C 30 detik, *extention* 75°C 1 menit yang dilakukan sebanyak 30 siklus; *post* PCR 72°C 20 menit. Setelah itu, suhu diturunkan dan diakhiri pada 4°C.

Klon Gen 16S-rRNA. Gen 16S-rRNA hasil PCR diklon ke plasmid pGEM-T Easy vector (Promega, Wisconsing) dan selanjutnya ditransformasi ke dalam *E. coli* DH5α (Sambrook & Russell 2001) diikuti dengan seleksi di atas media Luria-Bertani agar-agar (LA) (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g ekstrak khamir, 20 g agar-agar, 1 liter akuades) yang telah dibubuhi ampisilin 100 µg/ml dan X-gal 40 µg/ml.

ARDRA. Dua puluh koloni putih dipilih secara acak dari masing-masing sampel dan diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer M13*forward* (5'-GTAAAACGACGGCC AG) dan primer M13 *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) untuk ARDRA. Komposisi pereaksi PCR ialah 18 µl ddH_2O, 2.5 µl 10X bufer Taq polimerase, 1 µl M13f 10 pmol, 1 µl M13r 10 pmol, 0.5 µl dNTP 10 mM, 1 µl Taq polimerase 5 U/µl. Selanjutnya PCR dilakukan pada kondisi: *pre start* 94°C 10 menit untuk melisis sel dan menonaktifkan nuklease; denaturasi 94°C 1 menit, pelekatan primer 55°C 1 menit, dan pemanjangan 72°C 1 menit, dilakukan sebanyak 25 siklus; dan *post* PCR 72°C 10 menit. Selanjutnya suhu diturunkan dan diakhiri pada 4°C.

Hasil amplifikasi gen 16S-rRNA dari masing-masing sampel dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *Hha*I (5'-GCG'C), *Rsa*I (5'-GT'AC), dan *Hae*III (5'-GG'CC) (New England, *BioLabs®Inc.*). Setiap reaksi pemotongan terdiri atas 7 µl hasil PCR (gen 16S-rRNA), 2 µl 10X bufer enzim restriksi, 1 µl enzim restriksi 2 unit/µl, dan 10 µl ddH_2O. Selanjutnya setiap tabung yang berisi reaksi di atas diinkubasi 37°C selama 24 jam, kemudian ditambahkan *blue juice* (Sambrook & Russell 2001). Hasil pemotongan kemudian dilarikan dalam agarosa 2.5% dengan kuat arus 60 volt selama 1 jam. Selanjutnya gel agarosa direndam dalam larutan etidium bromida 0.1% selama 10 menit, dalam akuades 5 menit, dan diamati di atas lampu UV untuk melihat pola ARDRA. Pola ARDRA ini dijadikan data biner sebagai input untuk konstruksi pohon filogenetika.

Konstruksi Pohon Filogenetika dari Pola ARDRA. Data biner hasil pemotongan dengan tiga macam enzim restriksi digabungkan untuk masing-masing sampel dan dimasukkan dalam program *Treecon software copyright (c) Yves Van de Peer* (Belgia) untuk konstruksi pohon filogenetika.

HASIL

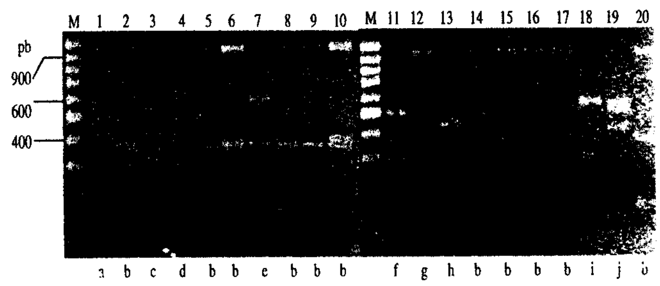
Hasil Transformasi. Total transforman dari sampel BG ialah 138 klon dan dari sampel DP sebanyak 123 klon. Sebanyak 20 klon dari masing-masing sampel diamplifikasi gen 16S-rRNAnya dengan PCR, fragmen gen 16S-rRNA yang dihasilkan memiliki ukuran 1500 bp (data tidak ditampilkan).

Pola ARDRA dari Sampel Tanah BG. Gen 16S-rRNA hasil PCR setelah dipotong dengan enzim restriksi *Rsa* I dari sampel BG didapatkan 13 pola ARDRA, yaitu pola a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, dan m (Gambar 2). Pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi *HhaI* juga menghasilkan 13 pola, yaitu pola A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, dan M (Gambar 3), sedangkan dengan enzim restriksi *HaeIII* menghasilkan 10 pola, yaitu pola I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, dan X (Gambar 4).

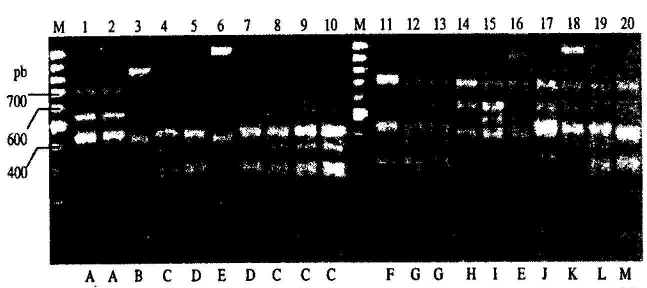
Pola ARDRA dari Sampel Tanah DP. Pemotongan gen 16S-rRNA dari sampel tanah DP dengan enzim restriksi *RsaI* menghasilkan 10 pola ARDRA, yaitu a, b, c, d, e, f, g, h, i, dan j (Gambar 5). Pemotongan dengan enzim restriksi *HhaI* juga menghasilkan 10 pola ARDRA, yaitu A, B, C, D, E, F, G, H, I, dan J (Gambar 6), sedangkan pemotongan dengan enzim restriksi *Hae* III menghasilkan sembilan pola ARDRA, yaitu I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, dan IX (Gambar 7).

Pohon Filogenetika. Hasil konstruksi pohon filogenetika bakteri dari sampel tanah BG terdiri atas 16 filotipe dari 20 klon gen 16S-rRNA yang dipilih secara acak (Gambar 8), sedangkan sampel tanah DP terdiri atas 14 filotipe (Gambar 9).

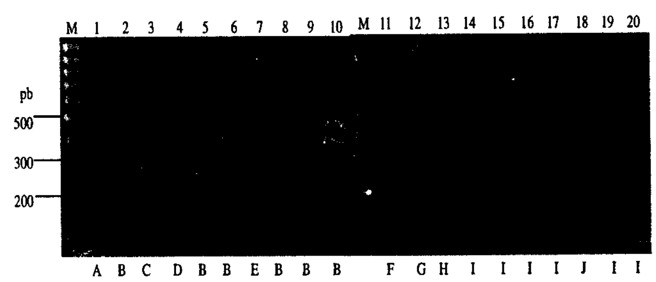
Gambar 2. Elektroforesis gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *RsaI* untuk 20 klon bakteri dari sampel tanah BG. M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler™* DNA *ladder* 50 pb, Fermentas); 1-20: urutan nomor klon; a-m: pola ARDRA.



Gambar 5. Elektroforesis gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *RsaI* untuk 20 klon bakteri dari sampel tanah DP. M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler™* DNA *ladder* 100 pb, Fermentas); 1-20: urutan nomor klon; a-j: pola ARDRA.

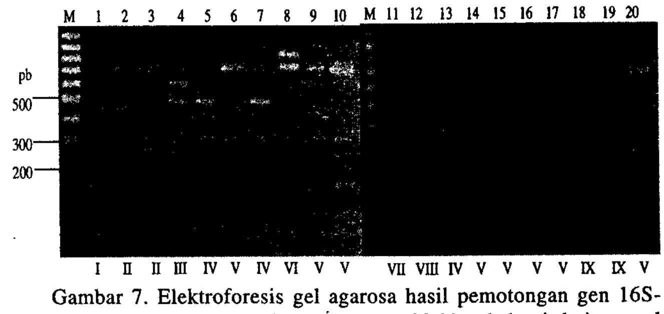


Gambar 3. Elektroforesis gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *HhaI* untuk 20 klon bakteri dari sampel tanah BG. M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler™* DNA *ladder* 50 pb, Fermentas); 1-20: urutan nomor klon; A-M: pola ARDRA.



Gambar 6. Elektroforesis gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *HhaI* untuk 20 klon bakteri dari sampel tanah DP. M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler™* DNA *ladder* 100 pb, Fermentas); 1-20: urutan nomor klon; A-J: pola ARDRA.

Gambar 4. Elektroforesis gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *HaeIII* untuk 20 klon bakteri dari sampel tanah BG. M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler™* DNA *ladder* 50 pb, Fermentas); 1-20: urutan nomor klon; I-X: pola ARDRA.

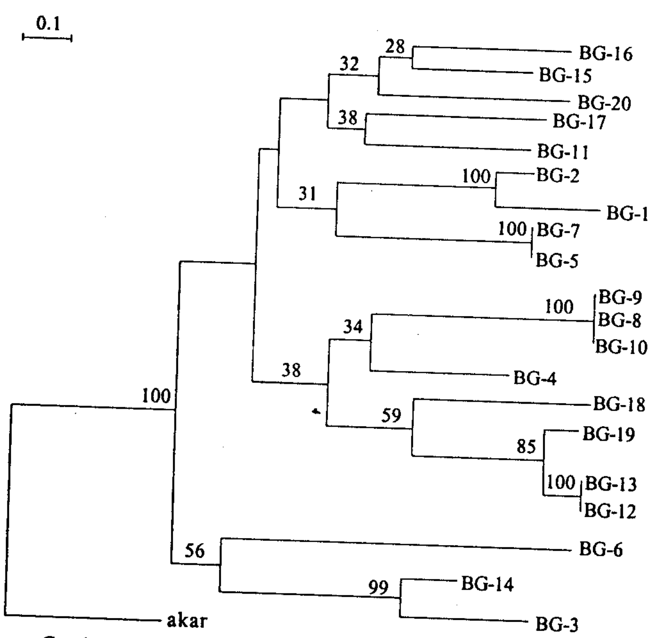


Gambar 7. Elektroforesis gel agarosa hasil pemotongan gen 16S-rRNA dengan enzim restriksi *HaeIII* untuk 20 klon bakteri dari sampel tanah DP. M: standar ukuran molekul (*Gene Ruler™* DNA *ladder* 100 pb, Fermentas); 1-20: urutan nomor klon; I-IX: pola ARDRA.

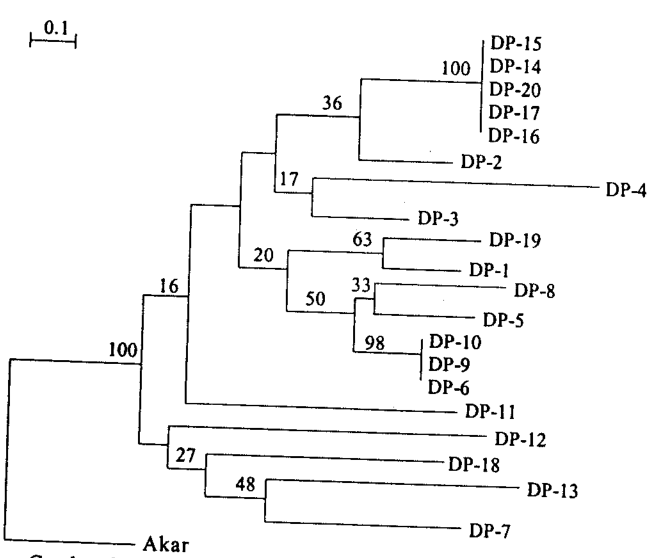
PEMBAHASAN

Jumlah bakteri transforman yang berhasil diperoleh termasuk tinggi (138 klon dari tanah BG dan 123 klon dari tanah DP). Jumlah bakteri transforman dari tanah pertanian di Wisconsin yang dilaporkan oleh Borneman *et al.* (1996) ialah 124 klon. Hasil amplifikasi dengan PCR pada 20 klon menunjukkan bahwa yang teramplifikasi ialah benar gen 16S-rRNA. Gen 16S-rRNA memiliki ukuran ± 1500 pasang basa (pb) (Madigan *et al.* 1997).

Hasil pemotongan ketiga enzim restriksi yang digunakan menunjukkan bahwa enzim *Rsa*I dan *Hha*I paling deskriminatif untuk menganalisis keragaman genetika bakteri. Hal ini sesuai dengan rekomendasi yang disampaikan oleh Moyer *et al.* (1996).



Gambar 8. Pohon filogenetika 20 klon bakteri dari sampel tanah BG dengan menggunakan enzim restriksi *RsaI*, *HhaI*, dan *HaeIII*.



Gambar 9. Pohon filogenetika 20 klon bakteri dari sampel tanah DP dengan menggunakan enzim restriksi *RsaI*, *HhaI*, dan *HaeIII*.

Keragaman Genetika Bakteri Tanah dari Rizosfer Kapas Transgenik. Hasil pemotongan ketiga enzim restriksi untuk gen 16S-rRNA sampel BG menunjukkan bahwa tidak ada pola yang dominan, sekalipun ada beberapa klon memiliki pola ARDRA yang sama, baik enzim *Rsa*I (Gambar 2), *Hha*I (Gambar 3), maupun *Hae*III (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa di antara 20 klon tersebut terdapat keragaman yang berbeda.

Dari pohon filogenetika tampak bahwa dari 20 klon dapat dibedakan 16 filotipe (Gambar 8), maka populasi bakteri pada pertanaman kapas transgenik sedikitnya terdiri atas 16 jenis bakteri yang berbeda dari segi keragaman genetikanya. Selain itu, terlihat pula bahwa ada beberapa klon yang memiliki filotipe yang sama, yaitu klon 5 dan 7, klon 8, 9, dan 10, serta klon 4, 12 dan 13 (Gambar 8). Klon yang memiliki filotipe yang sama ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut ialah sejenis.

Keragaman Genetika Bakteri Tanah dari Rizosfer Kapas Nontransgenik. Pemotongan dengan enzim restriksi *Rsa*I dari gen 16S-rRNA sampel tanah DP menunjukkan adanya pola yang dominan, yaitu pola b oleh klon 1, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, dan 20 (Gambar 5). Demikian pula dengan hasil pemotongan dengan *Hha*I juga menunjukkan adanya pola yang dominan, yaitu pola B oleh klon 2, 5, 6, 8, 9, dan 10, dan pola I oleh klon 14, 15, 16, 17, 19, dan 20 (Gambar 6). Hasil pemotongan dengan *Hae*III juga menunjukkan pola yang dominan, yaitu pola V oleh klon 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17, dan 20 (Gambar 7). Adanya klon yang dominan ini menunjukkan bahwa bakteri tanah pada pertanaman kapas nontransgenik ini didominasi oleh spesies yang memiliki pola yang sama tersebut.

Dengan melihat pohon filogenetika yang terdiri dari 14 filotipe, menunjukkan bahwa populasi bakteri pada tanah pertanaman kapas nontransgenik terdiri dari 14 jenis bakteri yang berbeda dari segi keragaman genetikanya. Selain itu, terlihat juga ada beberapa klon yang memiliki filotipe yang sama, yaitu klon 14, 15, 16, 17, dan 20, dan klon 6, 9 dan 10 (Gambar 9). Hal ini juga menunjukkan bahwa bakteri yang memiliki filotipe yang sama kemungkinan merupakan bakteri yang sejenis.

Perbandingan Keragaman Genetika Bakteri Tanah antara Pertanaman Kapas Transgenik dan Nontransgenik. Perbandingan pola hasil pemotongan dengan tiga enzim restriksi, pada kedua sampel tanah pertanaman kapas menunjukkan bahwa keragaman genetika bakteri dalam tanah yang ditanami kapas transgenik tidak lebih rendah dibanding keragaman genetika bakteri dalam tanah yang ditanami kapas nontransgenik, baik dengan enzim restriksi *Rsa*I, *Hha*I, maupun *Hae*III. Pemotongan gen 16S-rRNA dari sampel tanah pertanaman kapas transgenik dengan enzim restriksi *Rsa*I menunjukkan 13 pola ARDRA, sedangkan dari tanah pertanaman kapas nontransgenik menunjukkan 10 pola ARDRA. Demikian halnya dengan enzim restriksi *Hha*I, gen 16S-rRNA dari tanah pertanaman kapas transgenik menghasilkan 13 pola ARDRA dan 10 pola ARDRA dari tanah pertanaman kapas nontransgenik. Pemotongan gen 16S-rRNA dari tanah pertanaman kapas transgenik dengan *Hae*III menunjukkan 10 pola ARDRA dan sembilan pola ARDRA dari tanah pertanaman kapas nontransgenik.

Secara keseluruhan, dari teknik ARDRA yang digunakan menunjukkan bahwa keragaman genetik bakteri tanah terdiri atas 16 filotipe dari pertanaman kapas transgenik dan 14 filotipe dari pertanaman kapas nontransgenik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari studi analisis risiko lingkungan (ARL) kapas transgenik di Sulawesi Selatan yang didanai oleh PT Monagro Kimia, Jakarta.

DAFTAR PUSTAKA

Borneman J, Skroch PW, O'Sullivan KM, Palus JA, Rumjanek NG, Jansen JL, Nienhuis J, Triplett EW. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 62:1935-1943.

Deya AAM, Odelson DA, Hiekey RF, Tiedje JM. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analisis (ARDRA). Di dalam: Akkermans ADL, Elsas JDV, Bruijn FJ. *Molecular Microbial Ecology Manual*. London: Kluwer Academic Publishers. hlm 3.3.2/1-3.3.2/6

Felske A, Wolterink A, Lis RV, Akkermans ADL. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S-rRNA sequence in Drentse a grassland soils (the Netherland). *Appl Environ Microbiol* 64:871-879.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1997. *Biology of Microorganisms*. Ed ke-8. New Jersey: Prentice-Hall.

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WE. 1998. Design and evaluation of useful bacterium spesific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:795-799.

Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM. 1996. A Computer simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrametric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl Environ Microbiol* 62:2501-2507.

Reeve JN. 1994. Thermophiles in New Zealand. *ASM News* 60:541-545.

Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning*. Ed ke-3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr.

Suwanto A. 1994. Evolusi mikroba dan kaitannya dengan sistematik molekuler. *Hayati* 1:26-31.