

KOMUNITAS BAKTERI RHIZOSFER TEH MELALUI APLIKASI BIOIMUNIZER (*Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp.) DENGAN METODE TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP)

Elin Safitri Aviani¹, Dwi Ningsih Susilowati², Siti Nur Jannah¹, Hermin Pancasakti
Kusumaningrum¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

²Bidang Mikrobiologi, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor
email : elin.safitri.elinsafitri.aviani@gmail.com

ABSTRACT

Types of bacteria from the rhizosphere communities actually have been developed as bioimmunizer but their consistency is still need further experiment about indigenous bacteria associated with rhizosphere of plants. This study aims to identification on the tea plant rhizosphere bacterial communities which in previous studies has been infected with *E. vexans* Masee and given bioimmunizer as well as the checking existence *Chryseobacterium* sp. and *Alcaligenes* sp. The result research showed that communities of bacteria on control samples obtained through culturing *Bacillus* sp. (51.91%), *Acidobacteria bacterium* (39.42%) and *Actinobacteria* sp. (8.66%). Control sample through metagenom obtained *Gemmatimonas aurantiaca* (5.80%), *Bacillus* sp. (42.55%), *Acidobacteria bacterium* (23.45%) and *Actinobacteria* sp. (28.20%). Communities of bacteria in the samples treated by culturing obtained *Gemmatimonas aurantiaca* (3.58%), *Bacillus* sp. (30.76%), *Pseudomonas* sp. (5.55%) *Acidobacteria bacterium* (13.94%) and *Actinobacteria* sp. (46.16%). Communities of bacteria in the samples treated by metagenom found *Bacillus* sp. (10.66%), *Acidobacteria bacterium* (4.22%), *Actinobacteria* sp. (5.48%), *Uncultured bacterium* (1.49%), *Alcaligenes* sp. (36.95%) and *Chryseobacterium* sp. (46.82%). The existence of *Alcaligenes* sp. and *Chryseobacterium* sp. show consistency bioimmunizer composition is applied. Communities of bacteria on metagenom have diversity and evenness level higher than the culturing approach.

Keywords: *bacterial communities, T-RFLP, Chryseobacterium* sp., *Alcaligenes* sp.

ABSTRAK

Jenis bakteri yang berasal dari komunitas rhizosfer sebenarnya sudah banyak dikembangkan sebagai bioimmunizer namun konsistensinya masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai bakteri *indigenous* yang berasosiasi dengan rhizosfer tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi mengenai komunitas bakteri rhizosfer tanaman teh yang pada penelitian sebelumnya telah diinfeksi *E.vexans* Masee lalu diberikan bioimmunizer serta memeriksa keberadaan *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. Penelitian ini menunjukkan bahwa komunitas bakteri pada sampel kontrol melalui pengkulturan diperoleh *Bacillus* sp. (51,91%), *Acidobacteria bacterium* (39,42%) dan *Actinobacteria* sp. (8,66%). Sampel kontrol melalui metagenom diperoleh *Gemmatimonas aurantiaca* (5,80%), *Bacillus* sp. (42,55%), *Acidobacteria bacterium* (23,45%) dan *Actinobacteria* sp. (28,20%). Komunitas bakteri pada sampel perlakuan melalui pengkulturan diperoleh *Gemmatimonas aurantiaca* (3,58%), *Bacillus* sp. (30,76%), *Pseudomonas* sp. (5,55%) *Acidobacteria bacterium* (13,94%) dan *Actinobacteria* sp. (46,16%). Komunitas bakteri pada sampel perlakuan melalui metagenom ditemukan *Bacillus* sp. (10,66%), *Acidobacteria bacterium* (4,22%), *Actinobacteria* sp. (5,48%), *Uncultured bacterium* (1,49%), *Alcaligenes* sp (36,95%) serta *Chryseobacterium* sp. (46,82%). Keberadaan *Alcaligenes* sp. dan *Chryseobacterium* sp. menunjukkan konsistensi komposisi *bioimmunizer* yang diaplikasikan.

Komunitas bakteri pada metagenom memiliki tingkat keanekaragaman dan kemerataan (*evenness*) yang lebih tinggi dibandingkan dengan pendekatan pengkulturan.

Kata kunci: komunitas bakteri, *T-RFLP*, *Chryseobacterium* sp., *Alcaligenes* sp.

PENDAHULUAN

Teh merupakan salah satu komoditas perkebunan yang memiliki arti penting bagi perekonomian Indonesia. Berdasarkan data ekspor yang diperoleh, tahun 2011 Indonesia berhasil mengekspor sebanyak 75.450 ton, tahun 2012 sebanyak 70.092 ton dan 2013 sebanyak 70.840 ton. Penurunan ekspor ini disebabkan karena adanya penurunan produksi teh Indonesia pada tahun 2012 mencapai 152.219 ton, tahun 2013 sebesar 145.460 ton, tahun 2014 sebesar 143.751 ton dan tahun 2015 sebesar 143.001 ton (Ditjenbun, 2014). Produksi teh di Indonesia yang terhambat ini diantaranya disebabkan oleh salah satu faktor yaitu adanya serangan jamur *E. vexans* Masee yang meyerang pucuk dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 40-50% dan menurunkan kualitas teh hingga dibawah 35% (Saravanakumar *et al.*, 2006).

Upaya mengahadapi produktivitas yang menurun ini salah satunya yaitu dengan penggunaan *bioimunizer* yang dapat dikembangkan dari komunitas mikroba rhizosfer tanaman teh itu sendiri. Jenis bakteri yang berasal dari komunitas rhizosfer sebenarnya sudah banyak dikembangkan sebagai *bioimunizer* namun hasil terkadang masih diragukan. Pernyataan tersebut didukung oleh Upadhyay *et al.*, (2011) dalam Hidayati (2015) yang menyatakan bahwa strain mikroba yang dijadikan *bioimunizer* kemungkinan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bahkan dapat merusak tanaman yang sama jika diterapkan pada kondisi tanah dan iklim berbeda. Jenis bakteri komunitas bakteri teh perlu diteliti agar dapat dikembangkan menjadi *bioimunizer* yang berpotensi.

Komunitas mikroba pada rhizosfer tanaman teh seperti yang telah dilaporkan dalam penelitian analisis bakteri tanah pada tanaman teh terdiri atas genus *Bacillus* yang dominan, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter* dan *Serratia* (Wafula, 2013) serta *Alcaligenes faecalis* yang memiliki daya antagonisme terhadap patogen teh (Napolean *et al.*, 2015). Fauziah *et al.* (2016) telah melakukan penelitian bagaimana potensi mikroba *indigenous* pada tanaman teh dalam pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman dan daya antagonis terhadap penyakit

cacar daun teh yang disebabkan *E.vexans*, hasilnya adalah kombinasi antara *Chryseobacterium* (75%) dan *Alcaligenes* (25%) dapat menekan penyakit cacar daun teh sebesar 1,27% serta berpengaruh terhadap pertumbuhan teh menjadi lebih baik.

Pentingnya pencarian dan pengembangan komunitas mikroba pada tanaman teh mendorong untuk terus dilakukannya penelitian mengenai analisis komunitas mikroba rhizosfer teh dengan berbagai teknik, salah satunya menggunakan teknik molekuler 16S rRNA. Metode analisis yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah T-RFLP, dikarenakan lebih efektif, populer dan banyak digunakan. Menurut Caffaro-Filho *et al.* (2007), kelebihan T-RFLP dibanding metode lain yaitu dapat menganalisis sampel dalam jumlah banyak dengan cepat, tingkat ketelitian tinggi, serta data profil dapat dianalisis secara kualitatif maupun kuantitatif menggunakan berbagai metode statistik untuk memperoleh kesimpulan secara komprehensif.

Oleh sebab itu, penelitian ini akan membahas mengenai komunitas bakteri rhizosfer tanaman teh yang pada penelitian sebelumnya telah diinfeksi *E.vexans* Masee lalu diberikan *bioimunizer* dan konsistensi bakteri *bioimunizer* (*Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp.) yang telah diaplikasikan menggunakan metode T-RFLP. Keragaman bakteri dan keberadaan *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. yang ditemukan, diharapkan dapat digunakan untuk pengembangan penelitian selanjutnya untuk pupuk hayati bahkan pengendali hayati hama tanaman teh.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor. Sampel rhizosfer tanaman teh hasil penelitian sebelumnya yang terbagi atas rhizosfer dari tanaman teh kontrol (yang tidak diberi perlakuan apapun) dan tanaman teh yang sebelumnya telah diinfeksi jamur *E. vexans* Masee lalu diberi perlakuan *bioimunizer* yang mengandung bakteri *Chryseobacterium* sp. (A-21) dan *Alcaligenes* sp. (Endo-5), isolat bakteri

tunggal *Chryseobacterium* sp. (A-21), isolat bakteri tunggal *Alcaligenes* sp. (Endo-5).

Preparasi dan Pengambilan Sampel

Tanah yang berada disekitar perakaran teh (Gambar 1) diambil dan dijadikan dalam satu wadah, diambil secara acak hingga diperoleh massa sebanyak 10 g (dilakukan secara terpisah pada setiap sampel). Tanah tersebut dimasukan ke dalam botol kaca steril dan diberi label nama sampel. Akuades steril ditambahkan sebanyak 90 ml. Campuran dihomogenkan dengan *shaker* (2.000 rpm selama 15 menit). Campuran tersebut dimasukan ke dalam tabung falcon dan dipisahkan hingga mendapatkan pelet menggunakan sentrifuga (4000 rpm selama 10 menit). Pelet tanah yang diperoleh kemudian dikeringkan pada 60°C selama 30 menit. Pelet ini akan digunakan selanjutnya dalam tahap ekstraksi DNA genom dari sampel tanah. Campuran yang masih tersisa dalam botol kaca, digunakan untuk tahap selanjutnya dalam tahap ekstraksi DNA genom dari sampel kultur dan disimpan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Sampel tanah tersebut baik untuk pendekatan metagenom dan pengkulturan kemudian diberi kode sampel seperti yang tertera pada Tabel 1.



Gambar 1. Sampel tanah rhizosfer teh yang digunakan

Tabel 1. Kode sampel pada perlakuan

Kode Sampel	Keterangan
KB	Perlakuan Metagenom
DP	Perlakuan Metagenom
AB	Perlakuan Pengkulturan
DB	Perlakuan Pengkulturan
A21	Isolat Tunggal <i>Chryseobacterium</i> sp.
E5	Isolat Tunggal <i>Alcaligenes</i> sp.

Ekstraksi DNA Genom dari Sampel Tanah Rhizosfer Tanaman Teh

Sampel pelet tanah rhizosfer tanaman teh yang telah dipreparasi sebelumnya, diambil sebanyak 0,25 g tanah. Tanah diekstraksi dengan menggunakan kit ekstraksi DNA *Power Soil* (*PowerSoil*[®] *DNA Isolation Kit*) merk Mo Bio. Tahapan ekstraksi yang dilakukan sesuai manufaktur yang ada. DNA yang disimpan di *freezer* pada suhu -20°C .

Ekstraksi DNA dari Sampel Kultur (setelah dilakukan pencawanan)

Campuran yang masih tersisa dalam botol kaca, pada tahap preparasi selanjutnya digunakan dalam tahap ekstraksi DNA genom dari sampel kultur. Campuran tersebut dilakukan pengenceran secara serial (10^{-1} hingga pengenceran 10^{-4}) dan selanjutnya pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} disebar pada media *soil extract agar*. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 2-3 hari. Komunitas bakteri yang tumbuh pada setiap media kultur diambil dengan cara menuangkan 1 ml aquades steril di atas koloni. Koloni dikeruk dan dimasukan ke dalam tabung sentrifuga 50 ml kemudian dikeringkan pada 60°C selama 30 menit. Koloni yang telah kering dikumpulkan dan dicampur merata. Koloni kering sebanyak 0.25 g kemudian dijadikan sumber genom.

Genom diekstraksi menggunakan kit ekstraksi DNA *Power Soil* merk Mo Bio. Tahapan ekstraksi yang dilakukan sesuai manufaktur yang ada dan dilakukan sama seperti ekstraksi DNA genom dari sampel tanah. DNA disimpan pada *freezer* pada suhu -20°C . Genom dari isolat bakteri murni *Chryseobacterium* sp. (A-21) dan *Alcaligenes* sp. (Endo-5) selanjutnya diperlakukan sama seperti genom komunitas dari preparasi metagenom dan pengkulturan.

Amplifikasi dan Purifikasi Fragmen 16S rDNA

Fragmen 16S rDNA diamplifikasi menggunakan *primer* 27F berlabel 6-FAM *carboxyfluorescein* (5'-56-FAM/AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3') dan 1492R non

label (5'- TAC-GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-3'). Total volume PCR dibuat sebanyak 25 µl yang terdiri atas 12,5 µl GoTaq(R) Green (Promega), 1 µl (10 pmol) masing-masing *primer*, 2 µl (sekitar 200 ng) DNA *template* dan 8,5 µl *nuclease free water* (NFW). Ulangan dibuat sebanyak 3 kali. Kondisi untuk prosedur PCR yang dilakukan yaitu pra denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit 30 detik, annealing 55°C selama 45 detik, ekstensi 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir 72° selama 1 menit (29 siklus dari tahap denaturasi hingga ekstensi).

Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa konsentrasi 1% selama 45 menit. Produk PCR dimurnikan menggunakan kit purifikasi DNA *QIAquick*. Produk PCR murni dimasukkan dalam tabung mikrosentrifuga dan disimpan dalam wadah yang tertutup aluminium foil. DNA selanjutnya disimpan pada -20°C. Produk dari setiap media kultur dalam satu jenis sampel tanah yang sama digabung menjadi satu, untuk produk PCR murni dari preparasi pengkulturan.

Pemotongan Fragmen 16S rDNA dengan Enzim Restriksi

Hasil pemotongan fragmen 16S rDNA oleh enzim restriksi akan menghasilkan *terminal restriction fragmen* (T-RF). Ukuran T-RF yang ditargetkan dalam penelitian ini adalah antara 50 - 500 pb. Sebanyak dua enzim restriksi *RsaI* dan *MspI* (Thermo) dicobakan pada fragmen 16S rDNA komunitas. Reaksi pemotongan dilakukan secara terpisah untuk masing-masing enzim. Komposisi reaksi pemotongan yang disusun untuk enzim *RsaI* terdiri atas enzim restriksi *RsaI* (1-2 µl), 10x bufer Tango (2 µl), sampel hasil PCR berukuran ± 0,1 – 0,5 µg (10 µl) dan *nuclease-free water* (18 µl). Komposisi Komposisi reaksi pemotongan yang disusun untuk enzim *MspI* terdiri atas enzim restriksi *MspI* (1-2 µl), 10x bufer Tango (2 µl), sampel hasil PCR berukuran ± 0,1 – 0,5 µg (10 µl) dan *nuclease-free water* (18 µl). Sampel dihomogenkan dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam 30 menit, lalu dinonaktifkan dengan suhu 80°C selama 20 menit. Ulangan dibuat sebanyak 2 kali pada masing-masing reaksi enzim restriksi.

Hasil restriksi dielektroforesis pada gel agarosa konsentrasi 2% selama 1 jam. Produk hasil restriksi dimasukkan dalam wadah yang tertutup aluminium foil dan disimpan pada -20°C dan segera dianalisis.

Komunitas Bakteri dan Profil T-RF dengan T-RFLP

Produk hasil restriksi dikirim ke perusahaan jasa 1st Base Malaysia untuk analisis T-RFLP. Analisis T-RF dilakukan menggunakan *software* Peak Scanner v1.0. T-RF yang berukuran kurang dari 50 pb dan lebih dari 500 pb tidak digunakan dalam analisis. T-RF yang mempunyai selisih ukuran basa kurang dari 0.5 pb pada sampel yang sama yang dipotong dengan enzim yang sama dikelompokkan sebagai T-RF yang sama (Dunbar *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005). Ukuran T-RF kemudian dibulatkan ke puluhan terdekat. Selanjutnya, T-RF yang mempunyai luas area kurang dari 1% dari total area semua T-RF pada sampel yang sama dianggap sebagai pengotor sehingga tidak digunakan dalam analisis (Zhang *et al.*, 2008). Prediksi afiliasi filogenetik ukuran T-RF yang muncul dalam komunitas dilakukan dengan cara mencari padanannya dengan ukuran T-RF bakteri yang ada pada basis data *Ribosomal Database Project* (RDP) Soil database based on RDP r12u10 by RuLi dan (R10, U27)700.829 Good Quality (>1200 Bacterial) dan menggunakan program *Microbial Community Analysis III* (MICA3) *Vitual Digest* (ISPaR) (<http://mica.ibest.uidaho.edu/digest.php>).

Ukuran T-RF yang sama dengan ukuran T-RF pada basis data diprediksi mempunyai hubungan filogenetik yang sama.

Kelimpahan Relatif, Keanekaragaman (Shannon Diversity) dan Kemerataan (Evenness) Komunitas Bakteri

Kelimpahan relatif (%) ukuran T-RF tertentu merupakan banyaknya proporsi T-RF tersebut dalam komunitasnya. Kelimpahan relatif dihitung berdasarkan luas wilayah puncak (*peak area*) dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Luas peak area T-RF ukuran tertentu}}{\text{Total luas peak area seluruh ukuran T-RF}} \times 100\%$$

Keanekaragaman komunitas ditentukan berdasarkan keanekaragaman jenis T-RF yang muncul. Keanekaragaman komunitas dihitung menggunakan indeks Shannon (H') sebagai berikut:

$$H' = - (P_i \times \log P_i)$$

$$P_i = n_i N^{-1},$$

n_i adalah *peak area* dan N adalah jumlah total *peak area*

Kemerataan (*evenness*) komunitas ditentukan berdasarkan tingkat sebaran T-RF dalam komunitasnya. Kemerataan (*evenness*) komunitas dihitung menggunakan indeks Pielous (J) (*Pielou's evenness index*) sebagai berikut:

$$E' = H'/\ln(S)$$

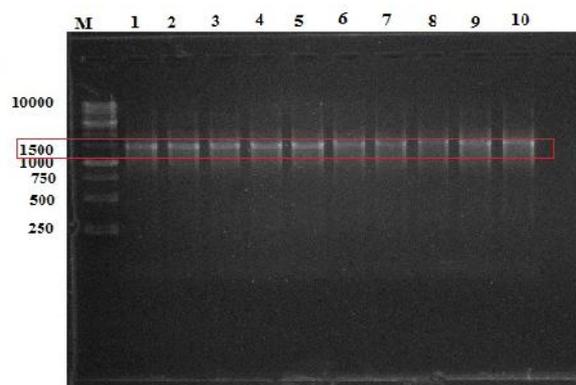
S adalah jumlah total T-RF

dimana untuk nilai indeks *Shannon* (H') antara 1.0 dan 6.0 serta nilai indeks *Evenness* (E') diantara 0 dan 1.0 (Stiling, 1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA dari Sampel Rhizosfer Tanaman Teh dan Sampel Kultur

Hasil amplifikasi disajikan pada Gambar 2. DNA yang berasal dari lingkungan dan seluruh koloni yang dikulturkan lewat pencawanan dalam penelitian ini digunakan sebagai DNA cetakan dalam melakukan amplifikasi daerah gen 16S rRNA. DNA populasi bakteri rhizosfer tanaman teh diperoleh dengan menggunakan primer *forward* universal 27F yang diberi label 6-FAM *carboxyfluorescein* dan primer *reverse* 1492 nonlabel. Penggunaan primer ini berlabel FAM ditujukan sebagai penanda pada ujung 5' dari fragmen yang telah diamplifikasi dan didigesti sehingga nantinya akan terbaca oleh alat analisis T-RFLP. Amplifikasi fragmen 16S rDNA komunitas bakteri dari masing-masing sampel menghasilkan fragmen berukuran sekitar 1.500 pb.



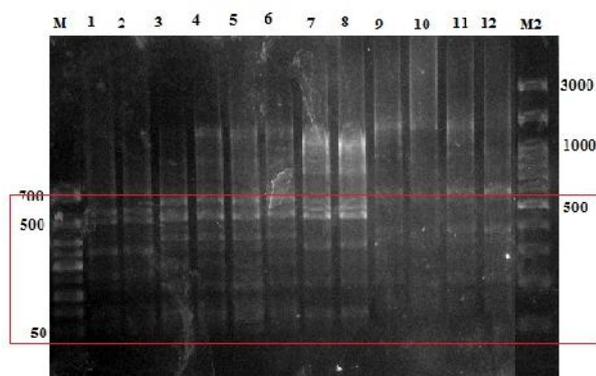
Gambar 2. Elektroforesis Hasil Amplifikasi DNA Rhizosfer Teh dalam Gel Agarose 1% dengan Marker 1000 pb (1- 2 = AB, 3-4 = DB, 5-6 = KB, 7-8 = DP, 9 = A21, 10 = E5)

Purifikasi dan Pemotongan Fragmen 16S rDNA

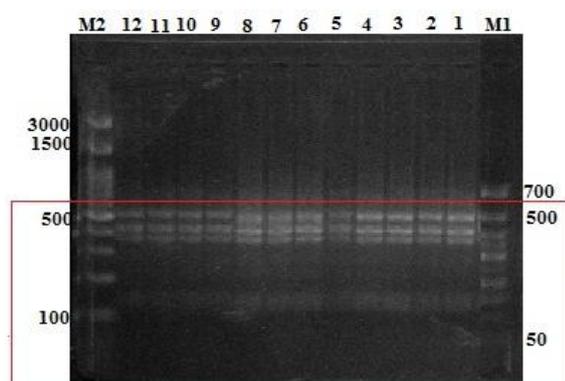
Konsentrasi DNA hasil dari purifikasi komunitas mikroba pada sampel kontrol (KB) dan sampel perlakuan (DP) pada pendekatan metagenom; kontrol (AB) dan sampel perlakuan (DB) pada pendekatan pengkulturan serta isolat tunggal sampel A21 (*Chryseobacterium* sp.) dan E5 (*Alcaligenes* sp.) diperoleh berkisar 193,0 hingga 232,9 ng/ μ L, dimana rasio $A_{260/280}$ yang diperoleh berkisar antara 1,84 hingga 1,88. Konsentrasi dan kemurnian yang dihasilkan memiliki kualitas yang baik untuk dilanjutkan dalam proses digesti. Sesuai dengan protokol enzim restriksi yang digunakan (Thermo), konsentrasi DNA yang akan didigesti harus memiliki rentang konsentrasi antara 0,5 hingga 1 μ g/ μ L.

Dua enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *MspI* dan *RsaI* (dilakukan digesti secara terpisah untuk setiap sampel). Enzim *MspI* dan *RsaI* digunakan dalam penelitian ini sebab kedua enzim ini cukup spesifik hasil digestinya. Kedua enzim ini berpotensi menghasilkan filogenetik T-RF dalam jumlah besar dan cukup sehingga disarankan untuk digunakan dalam metode analisis T-RFLP. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Dunbar *et al.* (2001) yang menganalisis resolusi filogenetik dari fragmen T-RF dari berbagai enzim dan kombinasi enzim dan ditemukan bahwa 68% dari *RsaI* dihasilkan T-RF panjang yang spesifik untuk empat spesies dari genus yang

sama sedangkan Engebretson *and* Moyer (2003) mengungkapkan bahwa dari 18 enzim restriksi yang diuji pada metode T-RFLP *MspI* memiliki frekuensi tinggi yang dapat membedakan populasi tunggal dalam model komunitas. Hasil digesti dengan enzim *MspI* dalam penelitian ini menghasilkan resolusi yang lebih (menghasilkan jumlah T-RF lebih banyak) dibandingkan *RsaI*. Namun, dalam hal pencocokan potongan T-RF untuk mendapatkan spesies bakteri rhizosfer dan analisis lainnya tetap menggunakan hasil dari kedua enzim tersebut. Hasil restriksi yang diperoleh memiliki ukuran TRF dengan kisaran 50 pb hingga 500 pb yang dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Elektroforesis Hasil Restriksi DNA Rhizosfer Teh dengan *MspI* dalam Gel Agarose 2% dengan M1= marker 50 pb M2= marker 100 pb (1-2 = AB, 3-4 = DB, 5-6 = KB, 7-8 = DP, 9-10 = A21, 11-12 = E5)



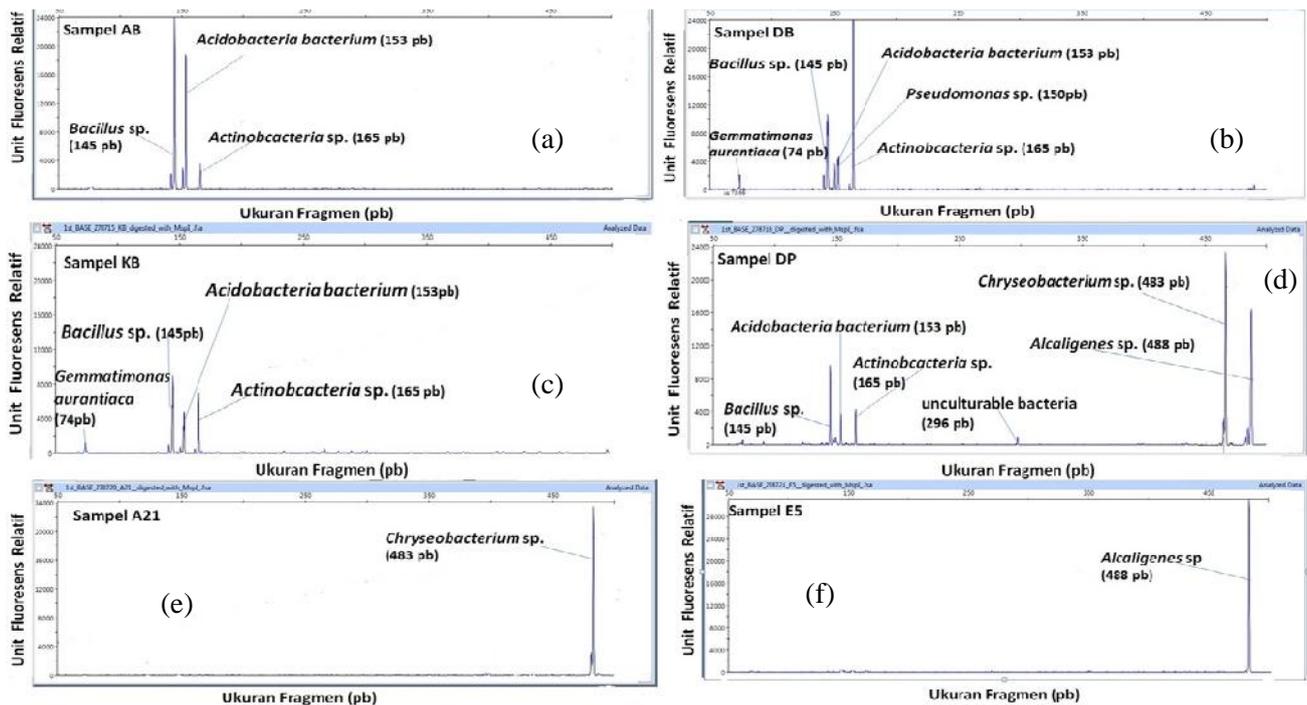
Gambar 4. Elektroforesis Hasil Restriksi DNA Rhizosfer Teh dengan *RsaI* dalam Gel Agarose 2% dengan M1= marker 50 pb M2= marker 100 pb (1-2 = AB, 3-4 = DB, 5-6 = KB, 7-8 = DP, 9-10 = A21, 11-12 = E5)

Komunitas Bakteri dan Profil T-RF

Data sampel yang didapatkan berupa ukuran *Terminal Restriction Fragment* (T-RF) yang berukuran 50 hingga 500 pb. Ukuran fragmen tersebut sangat baik dan sangat disarankan dalam metode T-RFLP. Dunbar *et al.*, (2001) dan Blackwood *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa T-RF yang berukuran lebih atau sama dengan 50 pb dan tinggi lebih dari 50 *fluorant unit* (FU) yang dianggap sebagai fragmen yang memenuhi syarat, kurang dari itu dianggap T-RF palsu.

Ukuran T-RF yang sama dari hasil potongan oleh enzim restriksi tertentu, dapat dimiliki oleh beberapa genus bakteri sehingga kemungkinan identitas T-RF tersebut masih cukup banyak. Oleh karena itu, digunakanlah dua enzim restriksi atau lebih agar mengurangi jumlah kemungkinan identitas dari masing-masing T-RF sehingga hasil yang didapatkan benar-benar sesuai. Menurut Dunbar *et al.*, (2001) keterbatasan dalam teknik T-RFLP dalam menganalisis komunitas bakteri yang kompleks dengan kisaran bakteri yang memiliki ukuran T-RF yang tidak beragam, permasalahan ini dapat diatasi dengan penggunaan dua enzim restriksi atau lebih agar dapat mengurangi jumlah kemungkinan identitas dari masing-masing T-RF.

Pola elektroforegram profil T-RFLP komunitas bakteri rhizosfer teh disajikan dalam Gambar 5. Bakteri yang dapat ditemukan hampir di semua pola T-RF baik dalam pendekatan pengkulturan dan metagenom adalah *Bacillus* sp., *Acidobacteria bacterium* dan *Actinobacteria* sp. Sampel kontrol (AB dan KB) baik pada pendekatan metagenom dan pengkulturan memiliki tiga pola ukuran T-RF yang sama yaitu 144 pb (*Bacillus* sp.), 153 pb (*Acidobacteria bacterium*) dan 165 pb (*Actinobacteria* sp.) tetapi dalam kelimpahan yang berbeda dimana *Actinobacter* lebih melimpah dari *Acidobacter* pada sampel metagenom maupun pengkulturan setelah pencawanan. Sementara itu sampel kontrol metagenom (KB) memiliki perbedaan dengan sampel pengkulturan (AB) yaitu ditemukan ukuran T-RF 74 pb (*Gemmatimonas aurantiaca*). Sampel kontrol (AB) dan sampel perlakuan pengkulturan (DB) memiliki pola



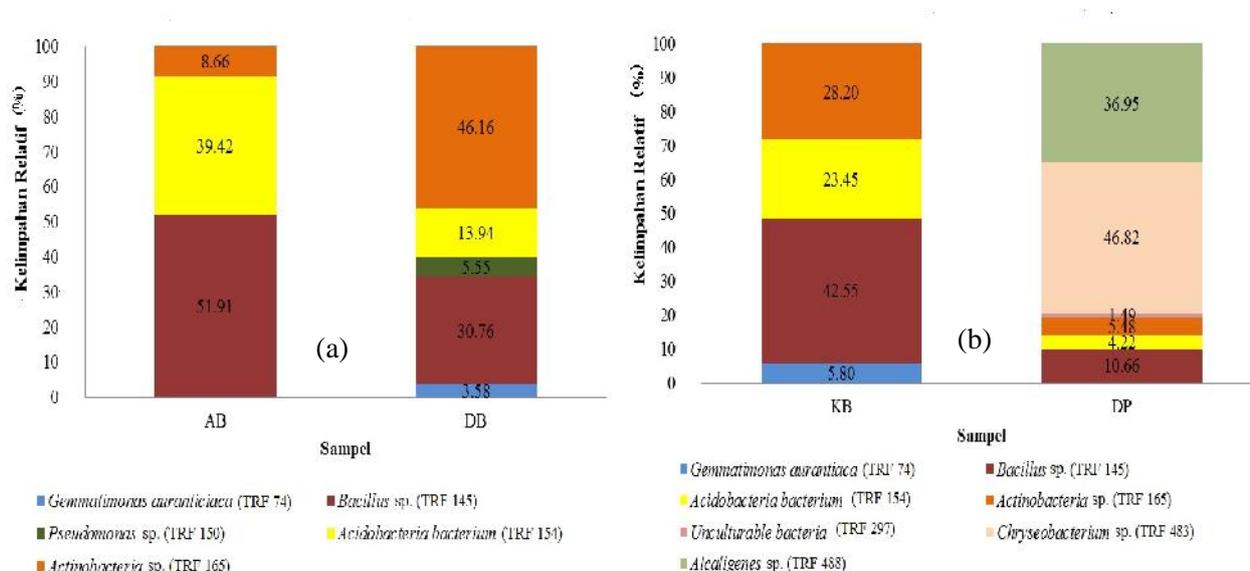
Gambar 5. Pola elektroforegram T-RF komunitas bakteri rhizosfer teh: (a) sampel kontrol (AB) melalui pengkulturan. (b) sampel perlakuan yang telah diberi *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. (DB) melalui pengkulturan. (c) sampel kontrol (KB) melalui metagenom. (d) sampel perlakuan yang telah diberi *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. (DP) melalui metagenom. (e) sampel isolat tunggal *Chryseobacterium* sp. (A21) melalui pengkulturan. (f) sampel isolat tunggal *Alcaligenes* sp. (E5) melalui pengkulturan.

Pendekatan metagenom dengan T-RFLP ini cocok digunakan untuk mengetahui jenis komunitas bakteri yang ada pada rhizosfer teh jika dilihat dari kesulitan dalam mengkultur semua bakteri dalam satu jenis media. *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. yang ditambahkan pada perlakuan sebagai bioimmunizer ternyata masih dapat ditemukan pada perlakuan metagenom DP, ini mengindikasikan bahwa kedua bakteri tersebut dapat berkompetisi dalam komunitas rhizosfer tanaman teh dan lingkungannya kemungkinan cocok untuk hidupnya.

Kelimpahan Relatif, Keanekaragaman dan Kemerataan (Evenness) Komunitas Bakteri

Status kelimpahan area relatif setiap ukuran T-RF dalam komunitas pada pendekatan metagenom dan pengkulturan

disajikan pada Gambar 6. Grafik kelimpahan relatif ini menunjukkan bahwa komunitas bakteri rhizosfer tanaman teh antara lain terdiri atas *Gemmatimonas aurantiaca*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acidobacteria bacterium*, *Actinobacteria* sp., *Alcaligenes* sp. dan *Chryseobacterium* sp. Kehadiran *Bacillus* sp., *Acidobacteria bacterium* dan *Actinobacteria* sp. ditemukan dalam jumlah yang cukup melimpah pada pendekatan pengkulturan namun jumlah kelimpahannya menurun pada pendekatan metagenom. *Pseudomonas* sp. juga ditemukan dalam pendekatan pengkulturan pada sampel perlakuan (DB) yaitu hanya 5,5%. *Alcaligenes* sp. (36,95%) dan *Chryseobacterium* sp. (46,82%) ditemukan paling melimpah pada pendekatan metagenom.

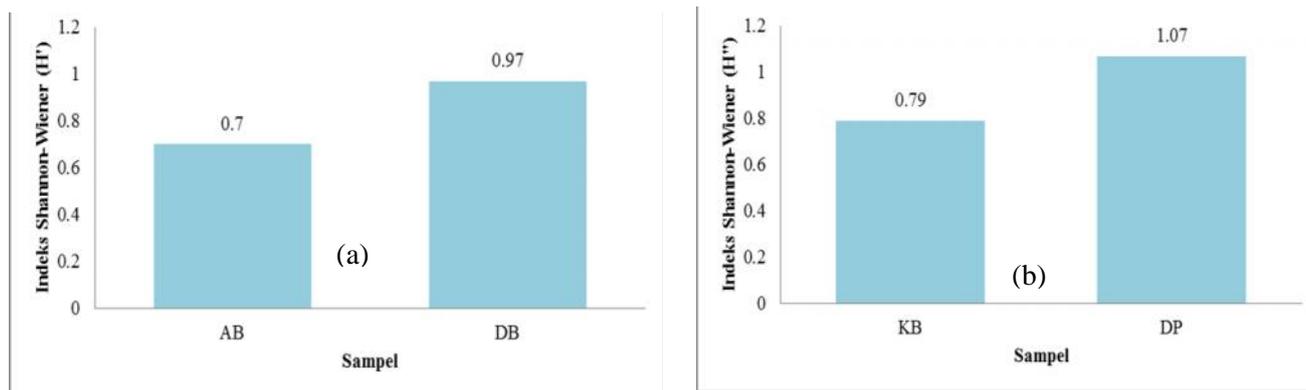


Gambar 6. Distribusi kelimpahan relatif setiap ukuran T-RF yang muncul dari komunitas bakteri rhizosfer melalui pendekatan (a) pengkulturan dan (b) metagenom

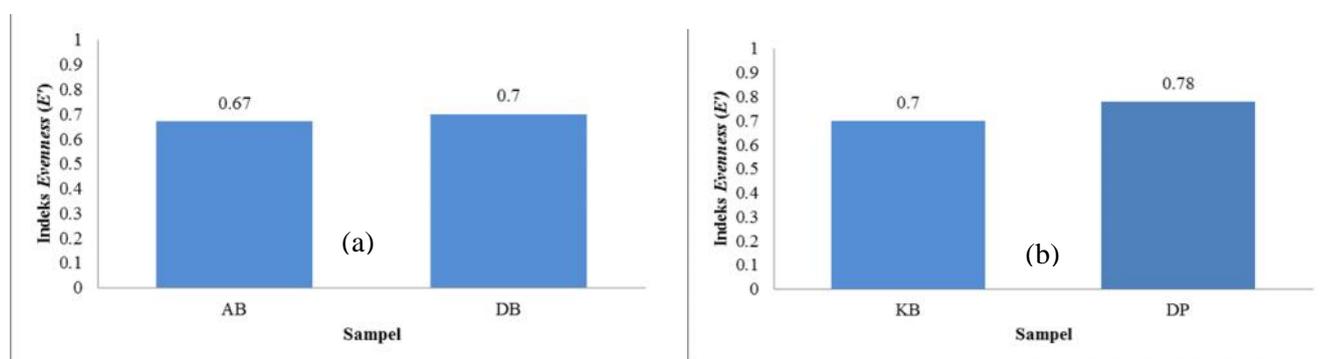
Bacillus sp. dan *Acidobacteria bacterium* ditemukan dengan presentase melimpah di beberapa isolat, hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wafula (2013) mengenai analisis bakteri tanah teh di Ngere, dimana genus *Bacillus* yang masuk kedalam kelompok Firmicutes merupakan bakteri dominan di tanah teh yaitu sekitar 45%, genus *Pseudomonas* hanya sekitar 23% dan genus lainnya seperti *Chryseobacterium* ditemukan dengan presentase 9%. Zhao *et al.* (2012), melaporkan dalam penelitiannya mengenai analisis komunitas bakteri tanpa pengkulturan pada teh menggunakan metode DGGE didapatkan bahwa *Acidobacteria* merupakan bakteri dominan dalam tanah rhizosfer teh dan penting dalam siklus nutrisi pada tanah teh yang bersifat asam. Çakmakçı *et al.*, (2010), melaporkan bahwa *Alcaligenes* sp. yang termasuk ke dalam golongan *Bacteroidetes* dan *Actinobacteria* juga dapat ditemukan dalam tanah rhizosfer teh.

Indeks keragaman Shannon Wiener (H') dan kemerataan (E') yang disajikan bertujuan untuk menggambarkan tingkat keanekaragaman dan kemerataan (*evenness*) sebaran T-RF yang muncul pada komunitas rhizosfer teh. Indeks keragaman Shannon Wiener (H') dan kemerataan (E') diperoleh dari data profil *MspI* dan *RsaI*. Perbandingan jumlah T-RF, tingkat

keanekaragaman dan kemerataan komunitas bakteri rhizosfer hasil analisis T-RFLP dengan pendekatan metagenom dan pengkulturan dapat dilihat pada grafik yang disajikan dalam Gambar 7 dan Gambar 8. Komunitas bakteri pada metagenom memiliki tingkat keanekaragaman dan kemerataan (*evenness*) yang lebih tinggi dibandingkan dengan pendekatan pengkulturan. Sampel yang sebelumnya telah diberi perlakuan bioimmunizer juga memiliki tingkat keanekaragaman yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol tanpa penambahan *bioimmunizer*. Keanekaragaman dan kemerataan (*evenness*) sampel pada pendekatan pengkulturan lebih rendah dibandingkan dengan pendekatan metagenom. Hal ini didasarkan pada nilai indeks Shannon antara 1.0 dan 6.0 serta nilai indeks *Evenness* diantara 0 dan 1.0 (Stiling, 1996). Rendahnya tingkat keanekaragaman pada sampel pengkulturan dapat disebabkan karena hanya bakteri yang dapat dikulturkan saja yang dijumpai pada data yang teranalisis sebagai sumber keanekaragaman. Sampel pendekatan metagenom, sumber keanekaragaman bersumber dari dua jenis komunitas yaitu bakteri yang dapat dikulturkan dan yang tidak dapat dikulturkan.



Gambar 7. Indeks keragaman Shanon-Wiener (H') komunitas bakteri rhizosfer melalui pendekatan (a) pengkulturan dan (b) metagenom



Gambar 8. Indeks kemerataan (E') komunitas bakteri rhizosfer melalui pendekatan (a) pengkulturan (b) metagenom

Kelimpahan relatif, keragaman dan kemerataan (*evenness*) komunitas rhizosfer teh yang berbeda antara sampel kontrol dan perlakuan dalam penelitian ini dipengaruhi oleh kondisi tanah teh yang diuji. Penelitian sebelumnya telah dilakukan pengaplikasian suspensi bakteri *bioimmunizer* ke dalam tanah sebanyak 50 ml/benih sebanyak tiga kali dengan interval waktu aplikasi 14 hari. Hal tersebut mungkin menjadi salah satu faktor bakteri *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. yang terkesan menekan jumlah populasi bakteri lain dalam komunitas. Selain itu, mungkin dalam hal ini terjadi kompetisi nutrisi dalam tanah sehingga *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. lebih banyak dibandingkan dengan bakteri lain. Kondisi tanah yang telah diaplikasikan ini tentu akan memiliki struktur komunitas yang berbeda dengan kondisi tanah alami tempat tumbuhnya tanaman teh. Penelitian mengenai struktur komunitas teh biasanya sampel tanah diambil dari perkebunan, seperti pada penelitian di teh Ngere (Wafula, 2013), Turki (Çakmakçı *et al.*, 2010) dan China (Zhao *et al.*, 2012). Hal

tersebut ditandai dengan keadaan pada sampel kontrol (baik pada pendekatan pengkulturan dan metagenom) memiliki struktur komunitas yang normal dengan komposisi yang terdiri atas *Bacillus* sp., *Acidobacteria bacterium* dan *Actinobacteria* sp. dalam jumlah yang cukup dominan dibandingkan dengan sampel perlakuan sedangkan pada sampel setelah perlakuan mengalami pengurangan jumlah. Penelitian ini membutuhkan uji lebih lanjut mengenai mekanisme interaksi antara bakteri *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. dalam menekan jamur *E.vexans* Masee maupun interaksi dengan populasi bakteri lainnya.

SIMPULAN

Komunitas bakteri rhizosfer teh dengan metode T-RFLP ini dibedakan atas sampel kontrol dan perlakuan. Keberadaan *Chryseobacterium* sp. dan *Alcaligenes* sp. yang ditemukan pada salah satu sampel menunjukkan konsistensi komposisi *bioimmunizer* yang diaplikasikan. Komunitas

bakteri pada metagenom memiliki tingkat keanekaragaman dan pemerataan (*evenness*) yang lebih tinggi dibandingkan dengan pendekatan pengkulturan. Metode berbasis gen 16S rRNA dengan metode TRFLP terbukti dapat digunakan untuk menguak komunitas rhizosfer teh.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis sampaikan ucapan terimakasih kepada Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik sebagai pemilik proyek penelitian yang dipimpin oleh ibu Dwi Ningsih Susilowati, Siti Nur Jannah serta Hermin Pancasakti Kusumaningrum atas bantuannya dalam menyelesaikan penelitian dan jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Blackwood, Christopher B, Terry Marsh, Sang-Hoon Kim and Eldor A. Paul. 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 926-932
- Caffaro-Filho, R.A, Fantinatti-Garboggini, F. and Durrant, L.R. 2007. Quantitative analysis of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: Peak height data showed to be more reproducible than peak area. *Brazilian J Microbiol.* 38: 736-738.
- Çakmakçı, Ramazan, Mesude Figen Dönmez, Ya ar Ertürk, Mustafa Erat, Ayhan Haznedar and Remzi Sekban. 2010. Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. *Plant Soil* 332: 299-318
- Ditjenbun. 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia (Teh 2013-2015)*. Direktorat Jendral Perkebunan, Jakarta.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O. and Kuske, A.R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 67(1): 190-197.
- Engbreton, Jeff J and Craig L. Moyer. 2003. Fidelity of Select Restriction Endonucleases in Determining Microbial Diversity by Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4823-4829.
- Fauziah, Fani, Mieke Rochimi S., Dwi Ningsih S., Eko Pranoto dan Yati R. 2016. Potency of Tea Palnt Indigeneous Microbe on Plant Growth and to Against Blister Blight Disease (Exobasidium Vexans Masee). *Jurnal Penelitian The dan Kina* 19(1): (Abstract)
- Hidayati, Ernin. 2015. Penapisan Komunitas Bakteri Rizosfer Secara In Planta Untuk Meningkatkan Pertumbuhan Jagung Di Lahan Kering. *Disertasi*. Program Doktor Program Studi Mikrobiologi Institut Pertanian Bogor.
- Napolean, Jayanthi R., Mareeswaran J. Radhakrishnan B. 2015. Plant Protection Development in Tea Plantations of South India in the Last Five Decades. *Journal of Tea Science Research* 5(7): 1-6.
- Saravanakumar, D., Charles, V., Kumar, N. and Samiyappan, R. 2007. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Journal Crop Protection.* 26: 556-565.
- Smith, C.J., Danilowicz, B.S., Clear A.K., Costello, F.J., Wilson, B. and Meijer, W.G. 2005. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiol Ecol.* 54: 375-380.
- Stiling, Peter D. 1996. *Ecology: Theories ad Applications*. Second Edition. Prentice Hall International, Inc., United States of America.
- Wafula, Eliud N. 2013. Analyses Of Soil Bacteria In Ngere Tea Catchment Area Of Murang'a County, Kenya. *Thesis*. Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology.
- Zhang R, T.V. and Qian, P. 2008. Evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis in contrasting marine environments. *FEMS Microbiol Ecol.*: 1-10.
- Zhao, Juan, Xiaobing Wu, Chuanpeng Nie, Ting Wu, Wanhong Dai, Hui Liu and Ruyi Yang. 2012. Analysis of unculturable bacterial communities in tea orchard soils based on nested PCR-DGGE. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1967-1979