

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI GENUS *Sphingomonas* DARI DAUN PADI (*Oryza sativa*) DI AREA PERSAWAHAN CIBINONG

Gabriela Christy Sabbathini <sup>1)\*</sup>, Sri Pujiyanto <sup>1)\*</sup>, Wijanarka <sup>1)\*</sup> dan Puspita Lisdiyanti <sup>2)\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Universitas Diponegoro  
<sup>2</sup>Laboratorium Mikrobiologi Terapan, LIPI, Cibinong

### ABSTRAK

Kemampuan unik bakteri dengan genus *Sphingomonas* seperti mendegradasi kontaminan yang tahan terhadap panas, sebagai bakteri antagonis terhadap fungi fitopatogenik, dan dapat mensekresi eksopolisakarida gellan yang sangat berguna membuat bakteri ini dapat berperan penting dalam berbagai bidang industri. Eksploitasi kemampuan metabolisme dari bakteri genus *Sphingomonas* dapat menyediakan keuntungan komersial yang penting bagi bioteknologi. Spesies dari *Sphingomonas* sering ditemukan berasosiasi dengan tanaman padi sebagai salah satu bakteri endofitik yang dapat dikultur. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri lokal yang dapat menghasilkan gellan gum dari daun tanaman padi (*Oryza sativa*). Proses isolasi dilakukan dengan metode cawan sebar suspensi dari daun padi pada media *Nutrient Dextrose Agar* (NDA). Koloni tunggal bakteri yang dapat diisolasi kemudian diidentifikasi dengan metode PCR koloni untuk dilanjutkan pada proses sekuensing. Hasil sekuensing yang dilanjutkan dengan penyetaraan sekuens pada program BLAST menunjukkan empat isolat dengan genus *Sphingomonas* yaitu isolat XA1, XA2, XA6, XA12 dengan hasil *Sphingomonas* sp. Fse41, *Sphingomonas* sp. Fse41, *Sphingomonas sanguinis* strain L4-317 dan *Sphingomonas* sp. MLB01

*Kata kunci* : bakteri endofit, padi, *Sphingomonas*

### ABSTRACT

The unique ability of the genus *Sphingomonas* bacteria as degrade the contaminants refractory contaminants, to serve as the antagonists bacteria to phytopathogenic fungi, and capable to secrete highly useful exopolysaccharide gellan make these bacteria may play an important role in various industrial fields. Exploitation of the metabolic capabilities by genus *Sphingomonas* bacteria can provide significant commercial advantages for biotechnology. The species of *Sphingomonas* are often found associated with the rice plant as one of the endophytic bacteria that can be cultured. This study aims to isolate the local bacteria that can produce gellan gum from the leaves of the rice plant (*Oryza sativa*). The isolation process is done with a spread plate method suspension of rice leaves on *Nutrient Dextrose Agar* (NDA) media. Single colonies of bacteria that can be isolated then identified by colony PCR method to proceed at sequencing process. Sequencing followed by equalization sequences on the BLAST program shows four isolates of the genus *Sphingomonas* which isolates XA1, XA2, XA6, XA12 with the results are *Sphingomonas* sp. Fse41, *Sphingomonas* sp. Fse41, *Sphingomonas sanguinis* L4-317 strain and *Sphingomonas* sp. MLB01

*Keywords*: endophytic bacteria, padi, *Sphingomonas*

---

### PENDAHULUAN

Genus *Sphingomonas* didefinisikan oleh Yabuuchi *et al.* (1990) sebagai kelompok Gram negatif, berbentuk batang, chemoheterotrophic, aerobik, serta mengandung glikosphingolipid (GSLs) lipopolisakarida dalam amplop sel mereka, dan biasanya menghasilkan koloni berpigmen kuning. Terdapat lebih dari 20 spesies yang

cukup beragam dalam hal filogenetik, ekologi, dan sifat fisiologis. *Sphingomonas* dibagi menjadi empat genera: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* dan genera yang disebut secara kolektif sebagai "sphingomonads" (Balkwill *et al.*, 2006). Sphingomonads dapat menggunakan bahan organik yang terdapat di alam termasuk kontaminan lingkungan yang tahan terhadap panas. Kemampuan Sphingomonads dalam

biodegradatif dan biosintetik membuat bakteri genus ini dapat digunakan dalam aplikasi bioteknologi secara luas. Mulai dari bioremediasi dari kontaminan lingkungan sampai produksi ekstraseluler polimer yang dapat digunakan secara luas dalam industri makanan dan lainnya.

*Sphingomonas* tersebar secara luas di alam dan dapat diisolasi dari banyak lingkungan perairan maupun daratan termasuk dalam jaringan tanaman, specimen klinik, dan sumber lainnya (Balkwill, 2006). Spesies dari *Sphingomonas* sering ditemukan berasosiasi dengan tanaman (White *et al*, 1996). Spesies *Sphingomonas* dalam jaringan tanaman (biji, daun dan bunga) dapat terdeteksi dan terinci dengan amplifikasi dari bagian spesifik subunit kecil gen 16S rRNA dan ditemukan di 26 spesies tumbuhan yang termasuk dalam 11 famili (Kim *et al*, 1998). Salah satunya adalah ditemukannya spesies *Sphingomonas* pada tanaman padi sebagai salah satu bakteri endofitik yang dapat dikultur (Mano *et al*, 2007). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri genus *Sphingomonas* dari daun padi (*Oryza sativa*).

## REFERENSI

### 1. Bakteri Endofit Tanaman Padi

Bakteri endofit dapat diartikan sebagai bakteri yang berkolonisasi di dalam jaringan internal tanaman tanpa menunjukkan tanda eksternal dari infeksi atau pengaruh negatif lainnya pada inangnya (Holliday, 1989; Schulz & Boyle, 2006 dalam Ryan *et al*, 2007), dan hampir 300.000 spesies tanaman yang ada di bumi, setiap individu tanaman adalah inang untuk satu atau lebih mikroorganisme endofitik (Strobel *et al*, 2004 dalam Ryan *et al*, 2007). Bakteri endofit dapat diartikan sebagai bakteri yang berkolonisasi di dalam jaringan internal tanaman tanpa menunjukkan tanda eksternal dari infeksi atau pengaruh negatif lainnya pada inangnya (Holliday, 1989; Schulz & Boyle, 2006 dalam Ryan *et al*, 2007), dan hampir 300.000 spesies tanaman yang ada di bumi, setiap individu tanaman adalah inang untuk satu atau lebih mikroorganisme endofitik (Strobel *et al*, 2004 dalam Ryan *et al*, 2007).

Padi adalah tanaman yang paling penting di Asia sebagai sumber pangan utama dan bagi mereka yang bergantung pada

pertanian padi sebagai mata pencaharian (Craswell *et al*, 1981; Yoshida, 1981 dalam Hongrattipun *et al*, 2014). Padi (*Oryza sativa*) juga merupakan pangan biji padi-padian utama yang dikonsumsi oleh hampir setengah dari populasi dunia, menjadikannya tanaman paling penting untuk diproduksi. Sawah tropis menawarkan lingkungan biologis beragam dan dinamis untuk populasi mikroba dan bunga, invertebrata dan vertebrata (Ramakrishnan, 2005). Studi oleh Mano *et al* (2007) menunjukkan bakteri endofit yang dapat dikultur pada tanaman padi. Terdapat bakteri endofitik terkait dengan *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* dan *Pantoea* terisolasi dari daun, dan *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mycobacterium*, *Enterobacter*, dan *Chryseobacterium* terisolasi dari akar.

### 2. Genus *Sphingomonas*

Genus *Sphingomonas* pertama kali diusulkan oleh Yabuuchi *et al*. dan terdiri dari 5 spesies termasuk *S. paucimobilis* sebagai tipe spesies. Sebagian besar strain yang digunakan dalam penelitian mereka diisolasi dari pasien atau dari bahan klinis. Namun, *S. paucimobilis*, sebelumnya diklasifikasikan sebagai *Pseudomonas paucimobilis*, diketahui dapat diisolasi dari lingkungan non-klinis dan juga dari rizosfir tanaman padi (Kawahara *et al*, 1994). Genus *Sphingomonas* memiliki kriteria bakteri Gram negatif dengan sel *rod/curved rod*, 0,5µm-4,0µm, motil dan tidak motil, serta memiliki varian koloni dari tidak berwarna sampai berwarna jingga (Yabuuchi & Kosako, 2005). *Sphingomonas* tersebar secara luas di alam dan dapat diisolasi dari banyak lingkungan perairan maupun daratan termasuk dalam jaringan tanaman, specimen klinik, dan sumber lainnya. Strain *Sphingomonas* dikenal dapat menghasilkan biopolimer ekstraselular, termasuk eksopolisakarida terkait gellan (Balkwill, 2006).

### 3. Isolasi

Mikroorganisme pada suatu lingkungan alami merupakan populasi campuran dari berbagai jenis, baik mikroorganisme pada tanah, air, udara, makanan, maupun yang terdapat pada tubuh hewan maupun tumbuhan. Pemisahan bakteri diperlukan untuk mengetahui jenis, mempelajari kultural, morfologi, fisiologi, dan

karakteristik. Teknik pemisahan tersebut disebut isolasi yang disertai dengan pemurnian. Pengertian isolasi bakteri yaitu suatu proses mengambil bakteri dari medium atau dari lingkungan asalnya lalu menumbuhkannya di medium buatan sehingga diperoleh biakan yang murni (Singleton & Sainsbury, 2006).

Prinsip dari isolasi mikroba adalah memisahkan satu jenis mikroba dengan mikroba lain yang berasal dari campuran bermacam-macam mikroba. Hal ini dapat dilakukan dengan menumbuhkannya dalam media padat, sel-sel mikroba akan membentuk koloni sel yang tetap pada tempatnya. Beberapa cara atau metode untuk memperoleh biakan murni dari suatu biakan campuran. Dua diantaranya yang paling sering digunakan adalah metode cawan gores dan metode cawan tuang. Yang didasarkan pada prinsip pengenceran dengan maksud untuk memperoleh spesies individu. Dengan anggapan bahwa setiap koloni dapat terpisah dari satu jenis sel yang dapat diamati (Afrianto, 2004).

#### 4. Identifikasi

Proses identifikasi bakteri secara konvensional berdasarkan karakter fenotip bakteri seperti pewarnaan Gram, morfologi koloni, dan aktivitas enzim seringkali tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan adanya evolusi. Kesalahan identifikasi seringkali terjadi dikarenakan hadirnya karakteristik fenotip bakteri yang tidak biasa ataupun kurangnya pengalaman dalam menginterpretasikan data karakter fenotip. Hal ini menimbulkan hadirnya metode identifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Hal ini juga mengurangi prasangka penafsiran dan menyingkirkan kebutuhan untuk kemungkinan "pretest" mengenai klasifikasi mikroorganisme untuk pemeriksaan langsung dan pemilihan database (Petti *et al.*, 2005).

Proses identifikasi bakteri secara konvensional berdasarkan karakter fenotip bakteri seperti pewarnaan Gram, morfologi koloni, dan aktivitas enzim seringkali tidak bersifat statis dan dapat berubah seiring dengan adanya evolusi. Kesalahan identifikasi seringkali terjadi dikarenakan hadirnya karakteristik fenotip bakteri yang tidak biasa ataupun kurangnya pengalaman dalam menginterpretasikan data karakter fenotip. Hal ini menimbulkan hadirnya metode identifikasi

secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Hal ini juga mengurangi prasangka penafsiran dan menyingkirkan kebutuhan untuk kemungkinan "pretest" mengenai klasifikasi mikroorganisme untuk pemeriksaan langsung dan pemilihan database (Petti *et al.*, 2005).

Gen 16S rRNA adalah gen yang digunakan dalam menentukan filogenetik dan taksonomi dari bakteri secara molekuler. Penggunaan 16S rRNA sekuensing gen di laboratorium klinis menjadi umum untuk mengidentifikasi bakteri biokimia tak dikenal atau menyediakan referensi identifikasi untuk strain yang tidak biasa. (Janda & Abbott, 2007). Penggunaan gen 16S rRNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) memungkinkan untuk mengidentifikasi bakteri amilolitik dengan cepat dan spesifik. PCR merupakan suatu metode enzimatik untuk melipat gandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro* (Yuwono, 2006).

### METODELOGI

#### 1. Isolasi Bakteri dari Daun Padi

Daun padi diambil dari persawahan Cibinong. Sampel daun kemudian dicuci dengan aquades steril. Daun dipotong menjadi bagian yang lebih kecil dan disterilisasi menggunakan ethanol 70% selama 30 detik dan di bilas dua kali menggunakan aquades steril. Daun yang telah steril tersebut kemudian dipotong dengan gunting steril secara aseptik menjadi bagian yang lebih kecil dan direndam dalam larutan garam fisiologis 0,85%. Suspensi bakteri diencerkan hingga 10<sup>-3</sup> dan disebar menggunakan metode cawan sebar pada media NDA (Peptone 5 g/L, dextrose 20 g/L, yeast extract 1,5g/L, NaCl 5 g/L, beef extract 1,5 g/L, dan agar 15 g/L ). Langkah pemurnian koloni dilakukan dengan metode gores kuadran hingga diperoleh koloni tunggal, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C serta dilakukan KOH test. Koloni tunggal yang telah diperoleh disimpan dalam gliserol stock 10%.

#### 2. Identifikasi Bakteri

Identifikasi isolat bakteri dilakukan secara molekuler dengan analisis gen 16S rRNA. Satu koloni tunggal pada setiap isolat

dimasukan kedalam PCR *tube* menggunakan tusuk gigi steril. Sel bakteri kemudian ditambahkan dengan 50µL campuran reaksi PCR mix yang berisi 25µL taq RM (KAPA), 0,4µL 100 pmol primer 9F (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), 0,4µL 100 pmol primer 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') dan 24,2 µL H<sub>2</sub>O.

Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: pre denaturasi 96°C selama 5 menit, denaturasi 96°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, pre-elongasi 72°C selama 1 menit, elongasi 72°C selama 7 menit sebanyak 30 kali siklus (Sheu *et al*, 2000). Hasil dari PCR divisualisasikan dengan alat elektroforesis menggunakan 1% agarose dalam larutan buffer 1X TAE. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 100V, 400A selama 30 menit.

Gel hasil elektroforesis kemudian direndam dalam larutan EtBr selama 30 menit kemudian dicuci dalam akuades. Hasil elektroforesis kemudian diamati diatas gel iluminator menggunakan sinar UV. Produk PCR selanjutnya disekuensing di PT Macrogen, Korea Selatan untuk mengetahui urutan basanya. Hasil sekuensing selanjutnya diujarkan pada data yang terdapat di GenBank menggunakan BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide*) dari situs NCBI (*National Centre fo Biotechnology Information*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan melakukan isolasi bakteri endofit dari daun tanaman padi di daerah persawahan Cibinong Science Centre, Cibinong, Bogor, Jawa Barat. Pemurnian dan pemilihan bakteri yang diisolasi dari daun dengan media NDA dilakukan terhadap bakteri yang memiliki ciri morfologi koloni berbentuk bulat, cembung, berlendir dan berwarna kuning sehingga diperoleh 15 isolat bakteri. Untuk mengetahui spesies tiap isolat, dilakukan identifikasi molekuler pada kelima belas isolat dengan menggunakan metode PCR koloni pada gen 16s rRNA yang sebelumnya di cek terlebih dahulu jenis Gramnya secara cepat dengan menggunakan KOH string test. Koloni bakteri yang diberi larutan KOH dan dicampur, setelah 60 detik apabila koloni bakteri diangkat sekitar 1cm keatas menunjukkan hasil seperti

lendir maka bakteri tersebut merupakan bakteri Gram negatif (Buck, 1982). Hasil dari KOH *test* kelima belas isolat menunjukkan Gram negatif sehingga dapat dilanjutkan pada proses PCR koloni.

Isolat bakteri kemudian di identifikasi dengan identifikasi molekuler analisis gen 16S rRNA dengan teknik PCR koloni. Metode PCR koloni dilakukan pada penelitian ini dikarenakan dapat menghasilkan hasil amplifikasi yang lebih cepat tanpa perlu melakukan ekstraksi gen secara terpisah, sehingga proses lisis sel termasuk kedalam siklus PCR. Primer yang digunakan adalah 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') dengan perlakuan suhu dan waktu seperti pada Tabel 1 sebanyak 30 siklus. Hasil amplifikasi kemudian diproses dengan elektroforesis gel agarosa menggunakan marka *Geneaid* 1 Kb DNA *ladder*, 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis diamati menggunakan gel iluminator dibawah sinar UV yang dilanjutkan dengan proses sekuensing.

Tabel 1. Progam PCR Koloni

Fase	Suhu	Waktu
Pre-Denaturasi	96°C	5 menit
Denaturasi	96°C	30 detik
Anneling	55°C	30 detik
Pre-Elongasi	72°C	1 menit
Elongasi	72°C	7 menit

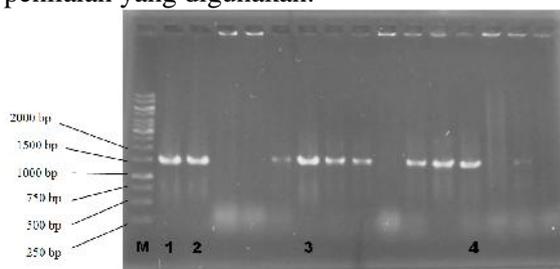
Sekuensing dilakukan dengan mengirimkan produk amplifikasi isolat ke PT Macrogen, Korea Selatan untuk memperoleh urutan basa produk. Informasi urutan basa yang diperoleh dari sekuensing kemudian diperbaiki terlebih dahulu dengan melakukan *trimming* data sekuensing menggunakan program *Bioedit*. Koreksi ini dilakukan untuk menghilangkan urutan basa yang tidak diperlukan dan memperbaiki urutan basa sehingga dapat dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Hasil urutan basa isolat yang telah diedit kemudian disejajarkan melalui BLAST serta menunjukkan dari 15 isolat yang dapat diidolasi terdapat 4 isolat yang memiliki genus *Sphingomonas* yaitu isolat XA1, XA2, XA6 dan XA12 seperti pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil analisa *alignment* sekuens isolat menggunakan *BLAST*.

KI	Deskripsi	MS	TS	QC (%)	EV	I (%)
XA1	<i>Sphingomonas</i> sp. Fse41	2386	2386	100	0.0	99
XA2	<i>Sphingomonas</i> sp. Fse41	1912	1912	100	0.0	93
XA3	<i>Pantoea ananatis</i> strain RNS02	2303	2303	100	0.0	97
XA4	<i>Pantoea agglomerans</i> strain IDOD21	2355	2355	100	0.0	99
XA5	<i>Bacterium</i> strain BPIC1	2303	2303	100	0.0	97
XA6	<i>Sphingomonas sanguinis</i> strain L4-317	2379	2379	100	0.0	99
XA7	<i>Pantoea agglomerans</i> strain IDOD21	2169	2169	100	0.0	99
XA8	<i>Pantoea agglomerans</i> strain IDOD21	2344	2344	100	0.0	98
XA9	<i>Pantoea</i> sp. SBT-4	2061	2061	99	0.0	94
XA10	<i>Bacterium</i> strain BPIC1	774	774	90	0.0	80
XA11	<i>Pantoea</i> sp. CC-10P2	2355	2355	100	0.0	99
XA12	<i>Sphingomonas</i> sp. MLB01	2294	2294	100	0.0	99
XA13	<i>Pantoea agglomerans</i> strain IDOD21	2263	2263	100	0.0	98
XA14	<i>Pantoea agglomerans</i> strain IDOD21	2278	2278	100	0.0	99
XA15	<i>Pantoea agglomerans</i> strain IDOD21	2329	2329	100	0.0	99

Keterangan: Kode Isolat (KI); Max Score (MS); Total Score (TS); Query Cover (QV); E-Value (EV); Identity (I).

Produk amplifikasi dari keempat isolat pada Gambar 1 dengan ukuran 1,500 bp yang menunjukkan bahwa amplifikasi isolat berhasil. Pada hasil BLAST, nilai *E-value* memberikan indikasi signifikansi statistik dari *alignment* sekuens yang di seajarkan serta mencerminkan ukuran dari database dan sistem penilaian yang digunakan.



Gambar 1. Visualisasi marka dan produk PCR isolat terpilih pada Agarosa 1%.

Keterangan : M: Marka 1 Kb DNA Ladder; 1: Isolat XA1; 2: Isolat XA2; 3: Isolat XA6; 4: Isolat XA12

Semakin rendah *E-value*, akan menunjukkan semakin signifikan hasil BLAST dengan penjajaran sekuens bukan karena kebetulan. Urutan sekuens yang memiliki *E-value* 0,05 berarti bahwa kesamaan ini memiliki 5 dalam 100 (1 dalam 20) kemungkinan yang muncul dengan kesempatan yang ada (Madden, 2013) sehingga nilai 0,0 mengartikan sekuens dari isolat tidak memiliki kemungkinan lain pada kesempatan penjajaran sekuens yang dilakukan. Hasil dari alignment yang dilakukan pada BLAST menunjukkan hasil keempat isolat dengan genus *Sphingomonas* dan memiliki *E-value* (*expect value*) 0,0 yang berarti signifikan secara statistik, sehingga pada hasil BLAST selalu diambil hasil indentifikasi dengan nilai max score dan nilai indentifikasi tertinggi. Hasil BLAST dari tiap isolat menunjukkan max score yang sama dengan total score dengan nilai yang tinggi serta nilai indentifikasi diatas angka 90% sehingga dapat diartikan data sekuens isolat memiliki data yang baik dan penyejajaran yang signifikan. Setelah dilakukan indentifikasi molekuler dan dilakukan BLAST pada hasil sekuensing tiap isolat, terdapat 4 isolat terpilih dengan hasil indentifikasi termasuk dalam genus *Sphingomonas*.

## KESIMPULAN

Pada penelitian ini diperoleh 15 isolat dari daun padi dan setelah dilakukan indentifikasi molekuler 16S rRNA bakteri, terdapat empat isolat yang memiliki kemiripan dengan genus *Sphingomonas* yaitu isolat XA1 dengan hasil *Sphingomonas* sp. Fse41, XA2 hasil *Sphingomonas* sp. Fse41, XA6 hasil *Sphingomonas sanguinis* strain L4-317 dan XA12 hasil *Sphingomonas* sp. MLB01.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Puspita Lisdiyanti, M.Agr.Chem. selaku pembimbing di laboratorium Mikrobiologi Terapan LIPI atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium Bioteknologi LIPI, Cibinong untuk arahan dan

bimbingan beliau selama berlangsungnya penelitian serta kepada Dr. Sri Pujiyanto, S.Si, M.Si dan Dr. Drs.Wijanarka, M.Si atas bimbingan dan arahan selama proses penulisan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, L., 2004, *Menghitung Mikroba Pada Bahan Makanan*, Cakrawala (Suplemen Pikiran Rakyat untuk Iptek), Farmasi FMIPA ITB. Bandung
- Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K., Romine, M.F. 2006. *Sphingomonas* and Related Genera. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
- Buck, J.D. 1982. Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 4(44): 992-993
- Hongrittipun, P., Youpensuk, S., Rerkasem, B. 2014. Screening of Nitrogen Fixing Endophytic Bacteria in *Oryza sativa* L. *Journal of Agricultural Science* 6 (6) : 66-74
- White, David C., Sutton, Susan D., Ringelberg, David B. 1996. The genus *Sphingomonas* : Physiology and Ecology. *Current Opinion in Biotechnology* 7 : 301-306.
- Janda, J.M., dan Abbot, S.L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in The Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 07 (45): 2761-2764.
- Kawahara, K., Mizuta, I., Katabami, W., Koizumi, M., Wakayama, S. 1994. Isolation of *Sphingomonas* Strains from Ears of Rice and Other Plants of Family Gramineae. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 3 (58) : 600 – 601.
- Kim, H., Nishiyama, M., Kunito, T., Senoo, K., Kawahara, K., Murakami, K., Oyaizu, H. 1998. High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *Journal of Applied Microbiology* 85 : 731-736..
- Madden, T. 2013. The BLAST Sequence Analysis Tool dalam *The NCBI Handbook 2nd edition*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. USA.
- Mano, H., Tanaka, F., Nakamura, C., Kaga, H., Morisaki, H. 2007. Culturable Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Leaves and Roots of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. *Microbes and Environments* 22 (2): 175-185.
- Petti, C.A., C.R. Polage dan P. Schreckenberger. 2005. The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 12 (43) : 6123-6125.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N. 2007. Bacterial Endophytes : Recent Developments and Applications. In: Staples, Richard. (Ed). *Federation of European Microbiological Societies*. Blackwell, UK.
- Sheu, D.Y., Wang, Y.T, Lee, C.Y. 2000. Rapid Detection Of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria Isolated from The Environment by Colony PCR. *Microbiology* 146 : 2019-2025.
- Yabuuchi, E., dan Y. Kosako. 2005. Order IV. *Sphingomonadales ord. nov.* In : Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T (Eds). *Bergeys Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition*. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University. USA.
- Yabuuchi, E., dan Y. Kosako. 2005. Order IV. *Sphingomonadales ord. nov.* In : Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T (Eds). *Bergeys Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition*. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University. USA
- Singleton, P., dan Sainsbury, D. 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. Edisi ke-3. John Wiley & Sons Ltd. UK
- Yuwono, T. 2006. *Biologi Molekular*. Erlangga. Jakarta.