

**IDENTIFIKASI BAKTERI ANAEROBIK ASAL TANAH SULFAT
MASAM KALIMANTAN SELATAN DENGAN ANALISIS
SEKUENSING 16S rRNA**

ORAL

Wahida Annisa dan Yuli Lestari

Balai Penelitian Pertanian Lahan Rawa (BALITTRA)

e-mail: annisa_balittra@yahoo.com

ABSTRAK

*Penelitian laboratorium dimaksudkan untuk mengidentifikasi bakteri anaerobik yang ada di tanah sulfat masam potensial, Kebun Percobaan Belandean, Kalimantan Selatan menggunakan metode sekuensing terhadap 16S rRNA. Sampel tanah diambil dari pertanaman padi baik yang dikelola secara intensif dan tidak. Isolasi bakteri menggunakan medium NA dengan metode cawan sebar, kemudian inkubasi secara anaerobik. Isolat bakteri yang diperoleh dimurnikan kemudian diidentifikasi secara molekuler berdasarkan 16S rRNA. Kemudian hasil sekuensing disejajarkan dengan sekuen referensi dari perpustakaan bank gen dengan program BLAST. Hasil analisis sekuensing terhadap 4 isolat bakteri anaerobik menunjukkan isolat 2FB dan 6FB terdeteksi sebagai *Bacillus circulans*, isolat 4FB terdeteksi sebagai *Paenobacillus*, sedangkan isolat 5FB tidak termasuk kelompok manapun.*

Kata kunci: tanah sulfat masam potensial, bakteri anaerobik, gen 16S rRNA

PENDAHULUAN

Peningkatan produk pertanian yang berdaya saing tinggi dapat dilakukan dengan meningkatkan produktivitas pertanian. Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas pertanian dengan cara ekstensifikasi pertanian yaitu meningkatkan produktivitas melalui perluasan lahan pertanian. Perluasan lahan pertanian terutama diarahkan pada pemanfaatan lahan di luar pulau Jawa seperti di Kalimantan yang salah satu jenis tanahnya adalah tanah sulfat masam. Tanah sulfat masam mempunyai reaksi yang tergolong masam akibat oksidasi pirit (penciri utama tanah sulfat masam). pH tanah sulfat masam berkisar pada pH 4 (Sulfaquents) dan pH <3,5 (Sulfaquepts). Pada kondisi ini tidak banyak mikroba yang dapat beradaptasi, sehingga populasi dan jenis mikrobanya tergolong rendah dan bervariasi menurut tipe vegetasi dan pengelolaan tanah. Dalam bidang pertanian mikroba mempunyai peran yang sangat penting, terutama dalam siklus hara dan keseimbangan biologi dalam tanah.

Salah satu jenis mikroba yang mempunyai peran penting dalam siklus hara dan geokimia seperti karbon, nitrogen dan fosfor adalah bakteri. Beberapa bakteri yang sangat menguntungkan dalam bidang pertanian diantaranya bakteri pelarut P, penambat N, perombak bahan organik, antagonis penyakit dan pelarut K. Panhwar *et al.*, (2014) telah berhasil mengisolasi bakteri *Burkholderia thailandensis*, *Spingomonas pituitosa* dan *Burkholderia seminal* dari tanah sulfat masam aktual (*Typic sulfaquept*). Isolat-isolat tersebut mampu memproduksi asam

indol asetat (AIA) sebagai pemacu tumbuh, asam organik yang dapat menurunkan ketersediaan Al melalui proses pembentukan khelat, melarutkan fosfat dan meningkatkan pH karena produksi eksopolisakarida.

Selain itu pada tanah sulfat masam terdapat bakteri pereduksi sulfat yang mampu meimobilisasi sulfat dan besi sehingga mampu menurunkan tingkat kemasaman dan keracunan Fe. Namun demikian pada kondisi tergenang bakteri metanogen sebagai penghasil metana yang mempunyai efek gas rumah kaca juga berkembang dengan baik. Oleh karena itu perlu dilakukan identifikasi mikroba yang berkembang pada tanah sulfat masam untuk mengetahui keragamannya.

Salah satu metode yang bisa digunakan untuk identifikasi adalah berdasarkan gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA memiliki daerah yang *conserved* (lestari) sehingga tepat digunakan untuk analisis sekuensing untuk menentukan taksonomi, filogeni dan keanekaragaman antar spesies. Gen ini juga memiliki hypervariable region yang merupakan ciri khas tiap mikroorganisme. Analisis sekuensing gen 16S rRNA sudah banyak digunakan di bidang mikrobiologi. Keunggulan metode berbasis molekuler ini diantaranya adalah cepat dan akurat dalam mengidentifikasi bakteri (Rinanda, 2011).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman bakteri anaerobik di tanah sulfat masam.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada pada bulan Januari hingga April 2012.

Isolasi Bakteri Anaerobik

Bakteri anaerobik diisolasi dari lahan persawahan yang dikelola secara intensif dan tidak dengan jenis tanah sulfat masam *Typic Sulfaquent*. dari Kebun Percobaan (KP) Belandean, Kecamatan Alalak, Kabupaten Barito Kuala, Kalimantan Selatan. Isolasi dimulai dengan menimbang 1 gram tanah kemudian dimasukkan pada 9 ml larutan fisiologis NaCl (0,85%) dan dilakukan pengenceran serial menggunakan aquades. Kemudian sebanyak 0,1 ml suspensi diinokulasikan pada media Nutrien Agar dengan metode cawan sebar. Setelah diinkubasi secara anaerobik selama 7 hari, isolat bakteri yang tumbuh dimurnikan menggunakan media yang sama dengan metode cawan gores. Isolat bakteri yang menunjukkan koloni tunggal dipindahkan ke agar miring untuk pengujian selanjutnya.

Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri Anaerobik

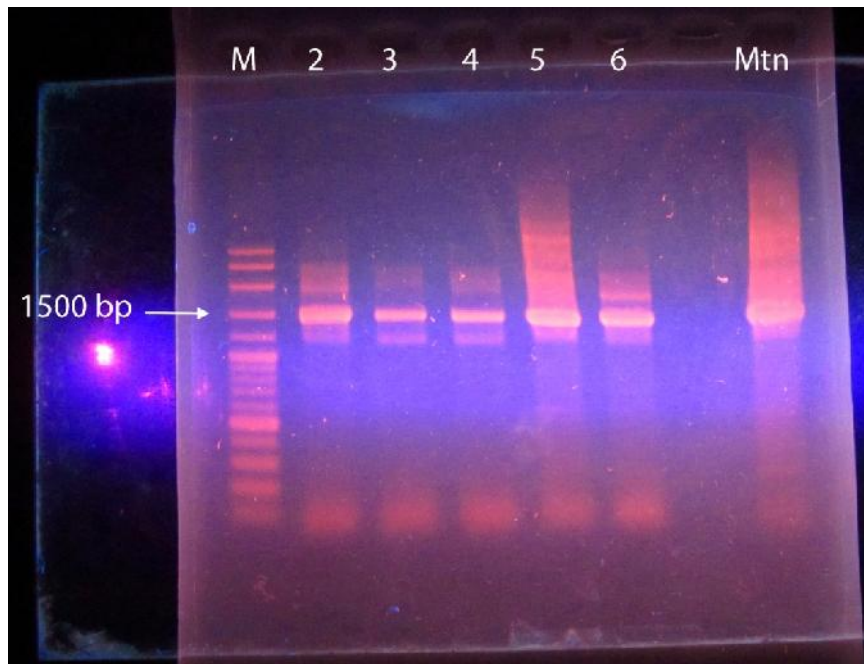
Identifikasi Molekuler isolat bakteri terdiri dari 4 tahap, yaitu Isolasi DNA genom bakteri, purifikasi DNA genom, amplifikasi gen 16S rRNA dan analisis sekuen gen 16SrRNA. Isolasi DNA genom bakteri anaerobik dilakukan sesuai dengan protokol Ausubel *et al.*, (2002). Purifikasi DNA genom dilakukan dengan menambahkan RNase dengan konsentrasi $10\mu\text{g}^{-1}$ pada DNA genom kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit (Sambrook, et al. 1989). Sedangkan amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan pada mesin PCR menurut protokol Halim (2012).

Analisis sekuen gen 16S rRNA dilakukan dengan cara melakukan sekuen hasil amplifikasi pengkode 16S rRNA menggunakan metode Sanger BigDye® Terminator v31. Proses sekuensing dilakukan oleh 1st BASE Sequencing, Singapura. Hasil sekuensing berupa file yang terdiri dari electropherogram dan text file urutan nukleotida DNA. Hasil sekuensing kemudian diolah menggunakan program MEGA5, dengan pilihan menu align by Clustal Wm dan disejajarkan dengan data dari Gen Bank menggunakan program BLAST (Basic Local Alignment Search) untuk mengetahui kemiripan spesies isolat yang diuji. Selanjutnya hasil sekuen gen 16S rRNA dari isolat uji dibuat pohon filogenetik dengan gen 16S rRNA dari Gen Bank yang mempunyai kemiripan antara 100% dan 99 untuk mengetahui hubungan kekerabatan menggunakan metode Neighbour-joining.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri anaerobik dari 5 contoh tanah sulfat masam yang diambil dari Belandean, Kalimantan Selatan diperoleh 12 isolat dan setelah dimurnikan tinggal 5 isolat. Diduga 5 isolat yang berhasil dimurnikan tersebut merupakan bakteri anaerobik fakultatif, sedangkan sisanya merupakan bakteri anaerobik obligat. Bakteri anaerobik fakultatif dapat hidup dengan baik pada kondisi adanya oksigen maupun tidak ada oksigen, sedangkan bakteri anaerobik obligat hanya dapat hidup dan berkembang pada kondisi tanpa oksigen. Pada penelitian ini terlihat bahwa pada saat pemurnian dengan metode cawan gores hanya 5 isolat yang berhasil dimurnikan. Sedangkan isolat lain yang tidak berhasil dimurnikan dengan metode cawan gores tergolong bakteri anaerobik obligat karena begitu terpapar ke oksigen tidak bisa tumbuh dan berkembang. Dalam bidang pertanian pemanfaatan bakteri anaerobik fakultatif ini sangat penting terutama untuk tanaman yang perlu kondisi aerobik dan anaerobik untuk pertumbuhannya. Seperti tanaman padi sawah untuk pertumbuhannya memerlukan kondisi tergenang, namun untuk mengefisienkan pemupukan seperti pupuk urea perlu kondisi yang tidak tergenang (macak-macak). Seperti halnya bakteri *Azospirillum* yang merupakan bakteri penambat N bersifat mikroaerofilik, yaitu perlu kondisi oksigen yang rendah dalam menambat N namun dapat hidup dan berkembang dengan baik pada kondisi aerobik.

Hasil amplifikasi menggunakan PCR terhadap gen pengkode 16S rRNA dari isolat bakteri anaerobik yang diuji menunjukkan teramplifikasi pada 1500 bp (Gambar 1). Setelah didapatkan amplifikasi gen pengkode 16S rRNA, selanjutnya dilakukan pembacaan pada amplifikasi gen yang didapat tersebut untuk dibandingkan dengan urutan gen 16S rRNA dari gene bank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).



Gambar 1. Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Pengkode 16S rRNA dari Isolat Uji

Hasil deteksi sekuen rRNA yang berupa urutan basa nukleotida dari 4 isolat bakteri anaerobik dari tanah sulfat masam potensial tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Bakteri Anaerobik Asal Tanah Sulfat Masam Potensial Berdasarkan Penyejajaran Sekuen 16S rRNA dengan Program BLAST.

Kode Isolat	Panjang basa nukleotida (bp)	Spesies referen terdekat
2FB	119	<i>Bacillus circulans</i>
4FB	866	<i>Paenibacillus</i>
5FB	786	-
6FB	136	<i>Bacillus circulans</i>

Keterangan: -tidak memiliki kemiripan

Tabel 1 menunjukkan, 2 isolat bakteri anaerobik asal tanah sulfat masam potensial teridentifikasi sebagai *Bacillus circulans* yaitu isolat 2FB dan 6FB yang masing-masing masing-masing mempunyai panjang basa nukleotida 119 dan 136 bp. Isolat 4FB teridentifikasi sebagai *Paenibacillus* dengan panjang basa nukleotida 866 bp, sedangkan isolat 5FB yang mempunyai panjang basa nukleotida 786 bp tidak memiliki kemiripan dengan kelompok bakteri manapun.

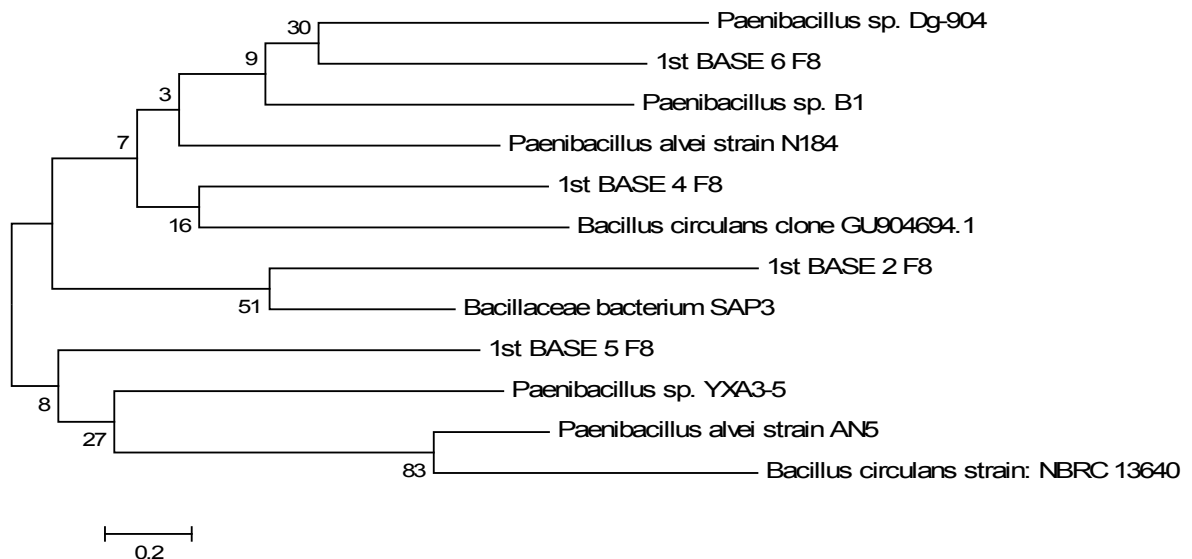
Menurut Wolf dan Barker (1968), bakteri yang tergolong genus *Bacillus* pada umumnya berbentuk batang, membentuk endospora berbentuk oval dan sporangia yang membedakan dengan swollen, membentuk spora dengan adanya oksigen, dan bersifat anaerobik fakultatif. Kandungan G+C pada DNA genus *Bacillus* bekisar 33 mol% dan 65 mol% (Priest, 1981).

Secara kemotaksonomi, *Bacillus circulans* dicirikan oleh kandungan G+C DNA 43,2 mol%, bersifat anaerobik fakultatif, yang mampu memfermentasi berbagai macam gula. Bakteri ini juga mampu mensekresikan sejumlah karbohidrat ekstraseluler, seperti amilase dan β -glukanase termasuk selulase, pektinase dan pullulanases (Dragutinovic, 2012). Genus *Paenibacillus* pertama kali di kemukakan oleh Ash *et al.* (1993) dan selanjutnya diamended oleh Shida *et al.*, (1997). *Paenibacillus* sebelumnya merupakan bagian dari genus *Bacillus*, namun memiliki ketidakmiripan berdasarkan konsesus region 16S rRNA. Ciri-ciri yang membedakan genus *Paenibacillus* dengan *Bacillus* diantaranya adalah sel bakteri berbentuk batang dengan flagelum, menghasilkan spora berbentuk elip dengan swollen sporangia, menunjukkan reaksi katalase positif, tidak menghasilkan H_2S , reaksi oksidase bervariasi, kandungan G+C pada DNA berkisar 45 mol% dan 54 mol% dengan anteiso-C15:0 sebagai asam lemak seluler, asam meso-diaminopimelic teridentifikasi sebagai asam diamino dan lebih 89,6% intra-genus similarity in 16S rRNA gene sequence (Ash *et al.*, 1993).

Beberapa strain *Paenobacillus* mempunyai kemampuan menambat nitrogen seperti *P. polymixa*, *P. macerans*, *P. durus*, *P. peoriae*, *P. borealis*, *P. Brasiliensis*, *P. graminis*, *P. adarifer*, *P. wynnii*, *P. massilensis* dan *P. abinae* (Beneduzi *et al.*, 2010, Xie *et al.*, 2014). Selain berperan dalam penambatan nitrogen genus *Paenobacillus* juga diketahui memproduksi siderofor dan mampu melarutkan mineral tanah (Timmusk, 2003). Akhir-akhir ini juga dilaporkan, bahwa beberapa spesies *Paenibacillus* juga menghasilkan zat pemacu tumbuh tanaman seperti *P. polymixa* (Timmusk dan Wagner, 1999), *P. brasiliense* (von der Weid *et al.* 2002), *P. borealis* (Elo *et al.*, 2001), *P. illinoisensis* (Jung *et al.*, 2005), *P. elgii* (Das *et al.* 2010), *P. ehinensis* (Naing *et al.*, 2013) dan *P. yonginensis* (Sukweenadhi *et al.*, 2015). Menurut Ahmad *et al.*, (2008) dan Yang *et al.*, (2009) bahwa secara tidak langsung bakteri pemacu tumbuh tanaman juga berkaitan dengan kemampuan untuk menginduce resistensi tanaman terhadap lingkungan biotik (sebagai agents biocontrol) dan stress abiotik (sebagai strengthener). Selain itu bakteri pemacu pertumbuhan tanaman juga dapat digunakan sebagai pupuk hayati (biofertilizer). (Nia *et al.*, 2012 dan Ramados *et al.*, 2013). Oleh karena itu bakteri *Paenibacillus* mempunyai potensi sebagai pupuk hayati yang dapat menurunkan keperluan pemupukan.

Studi filogenetik isolat bakteri anaerobik asal tanah sulfat masam menggunakan metode neighbour-joining dengan membandingkan sekuen gen 16S rRNA dengan isolat lain dari bank gen, menunjukkan bahwa urutan basa DNA pengkode 16S rRNA dari isolat 2FB memiliki kemiripan dengan urutan basa pengkode 16S rRNA spesies *Bacillia bacterium* dengan nilai bootstrap 51%. Urutan basa DNA pengkode 16S rRNA dari isolat 4FB dan 6FB masing-masing memiliki kemiripan dengan *Bacillus circulans* dan *Paenobacillus*, dengan nilai bootstrap masing-masing 16 dan 30%. Berdasarkan pohon filogenetik yang disusun menggunakan metode neighbour-joining menunjukkan bahwa urutan basa

DNA pengkode 16S rRNA dari isolat 5FB memiliki sangat banyak perbedaan dengan *Paenibacillus* dan *Bacillus circulans* (Gambar 2).



Gambar 2. Diagram Kekerabatan Bakteri Anaerobik Tanah Sulfat Masam Potensial

Diagram kekerabatan memberikan hasil yang kurang mendukung analisis BLAST, karena nilai bootstrapnya tergolong rendah, terutama untuk isolat 2FB, isolat 4FB dan isolat 6FB, sedangkan isolat 5FB tidak terdeteksi pada analisis BLAST maupun diagram kekerabatan. Hal ini berarti sekuen harus dikeluarkan dari analisis dan mencari pohon filogenetik lain yang dapat dipercaya.

KESIMPULAN

Isolasi bakteri anaerobik dari 5 contoh tanah sulfat masam potensial Belandean, diperoleh 12 isolat. Dari 4 isolat yang diidentifikasi secara molekuler berdasarkan 16S rRNA yang kemudian disejajarkan dengan spesies yang ada di Gen Bank menggunakan program BLAST menunjukkan 1 isolat tidak teridentifikasi dengan spesies manapun sedangkan yang lain tergolong *Paenibacillus* dan *Bacillus circulans*. Pada penelitian ini penggunaan metode Neighbour-joining kurang sesuai untuk analisis kekerabatan terhadap isolat bakteri anaerobik yang diuji.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, F., L. Ahmad, M. S. Khan. 2008. *Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities*. Microbiol. Res. 163:173-181.
- Ash, C. F. G. Priest & M. D. Collins. 1993. *Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash Farrow Wallbanks and Collins) using a PCR probe test*. Antonie van Leeuwenhoek. 64:253-260. Doi.10.1007/BF00873085.

- Ausubel, F. M., R. Brent, dan R. E. Kingston. 2000. *Short Protocols in Molecular Biology*. Academy Editions, California.
- Das, S. N. S. Duma, A. Kondreddy, N. Chilukori, S. V. S. R. N. Pullabborla, S. Vallamadi & A. R. Pudli. 2010. Plant growth-promoting chitinolytic *Paenibacillus elgi* responds positively to tobacco root exudates. *J. Plant Growth Regul.* 28:409-418.
- Dragutinovic, V., M.M. Vrvic, I. Swiecicka, O. Cretkovic, T. Beria & S. Stankovic. 2012. Characterisation of New *Bacillus circulans* strains isolated from oil shale. *Food Technol Biotechnol.* 50(1): 123-127.
- Elo, S., I. Soominen, P. Kampller, I. Juhania, W. Salkinoja-Salonen & K. Hazbrela. 2001. *Phaenibacillus borealis* sp. nov. A nitrogen fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:535-545.
- Jung, W. J., Yl L. Jin, K. Y. Kim, R. D. Park & T. H. Kimm. 2005. Changes to pathogenesis-related protein in pepper plant with regard to biological control of phytophthora blight with *Paenibacillus illinoisensis*. *BioControl.* 50:165-178.
- Naing, K. W., M. Annes, S. J. Kim, Y. Nam, Y. C. Kim, & K. Y. Kim. 2013. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN3B againsts soilborn phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic group. *Ann. Microbiol.* 65:55-63.
- Nia, S. H., M. J. Zarea, F. Rezali & A. Farma. 2012. Yield and Yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. *J. Saudi Soc Agris. Sci.* 11:113-121.
- Panwar, Q. A., U. A. Naher, S. Jusop, R. Othman, A. A. Latif & M. R. Ismail. 2014. Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. *PLOS one.* Vol. 9. Issue 10.
- Priest, F. G. 1981. *DNA homology in the genus Bacillus*. *Bacteriol Rev.* 41;711-753.
- Rabbani, H. 2012. Isolasi dan identifikasi bakteri patogen pada *Spodoptera litura* dari beberapa sampel tanah pertanian. *Skripsi.* Jurusan Mikrobiologi Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. p.74 hal..
- Rinanda, T. 2011. Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syah Kuala.* 3:172-177.
- Ramados, D., V. K. Lakineni, P. Bose, S. Ali, & K. Anapurna. 2013. *Mitigation salt stress in wheat seedling by halotolerant bacteria isolated from saline habitats*. Springer Plus. 2(6);1-7.

- Shida, O., H. Takagi, K. Kadowati, L. K. Nakamura & K. Komagata. 1997. Transfer of *Bacillus alganolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus cobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Phaenibacillus* and amended discription of the genus *Phaenibacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(2): 289-298.
- Sukweenaddi, I., Y. L. Kim, K. I. Lee, S. C. Koh, V. A. Hoang, N. L. Nguyen & D. C. Yang. 2014. *Phaenibacillus yonginensis* sp. nov. A potential plant growth promoting bacterium isolated from humus soil of Yongin forest. *Antonie van leuwenhoek. J. Microbiol.* 106: 935-945.
- Timmusk, S & E. C. Wagner. 1999. The plant growth promoting rhizobacterium *Phaenibacillus polymixainduce* changes *Arabidopsis thaliana* gene expression : a possible conection between biotic and abiotic stresses responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:951-959.
- Timmusk S. 2003. Mechanism of action of the plant growth promoting bacteriu *Phaenibacillus polymixa*. *Thesis*. Upsala Univertisas, Upsala Sweden.
- Yang, J., J. W. Kloeper dan C. M. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria heps plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14:1-4.
- Von de Weid, I. C. Frois Duarte, I. D. Van Elsas, j. Seldin. 2002. *Phaenibacillus brasiliensis* sp. nov. A novel nitrogen fixing species from the maize rhizosphere in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:2147-2153.
- Wolf, J and A. N. Barker. 1968. *The genus Bacillus: aids to identification of its species*. P. 93-111. In B. M. Gibbs and D. A. Shapton (ed). *Identification methods for microbiologists*. Academic Press Inc., New York.