



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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

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

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

ISOLASI BAKTERI *ACINETOBACTER* PENGHASIL IAA DARI TANAH MASAM DAN UPAYA TRANSFORMASI GENETIKNYA

TESIS



**LILY SYUKRIANI
07201002**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

**Judul Penelitian : ISOLASI BAKTERI ACINETOBACTER
PENGHASIL IAA DARI TANAH MASAM DAN
UPAYA TRANSFORMASI GENETIKNYA**

Nama Mahasiswa : LILY SYUKRIANI

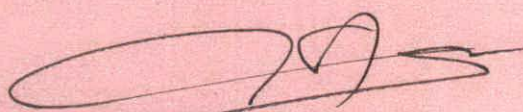
Nomor Buku Pokok : 07 201 002

Program Studi : AGRONOMI

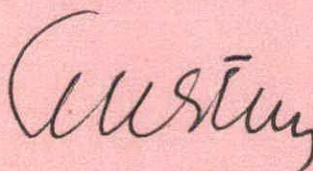
**Tesis ini telah diuji dan dipertahankan di hadapan sidang panitia ujian akhir
Magister Pertanian pada Program Pascasarjana Universitas Andalas dan
dinyatakan lulus pada tanggal 24 Januari 2011**

Menyetujui

1. Komisi Pembimbing



Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Jamsari, MP
Ketua



Dr. Ir. Gustian, MS
Anggota

2. Ketua Program Studi



Prof. Dr. Ir. Zulfadly Syarieff, MS
NIP. 195303131984011001



3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Novirman Djamarun, MSc
NIP. 195511061980031001

ISOLASI BAKTERI *ACINETOBACTER* PENGHASIL IAA DARI TANAH MASAM DAN UPAYA TRANSFORMASI GENETIKNYA

Lily Syukriani
BP. 07201 002

Di bawah Bimbingan Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Jamsari, MP sebagai pembimbing I
dan Dr. Ir. Gustian, MS. sebagai pembimbing II

RINGKASAN

Luas daerah Sumatera Barat adalah 3,67 juta ha dimana 635.500 ha merupakan tanah ultisol yang bereaksi masam. Masalah utama yang dihadapi pada tanah masam adalah kelarutan Al yang tinggi sehingga dapat bersifat meracun bagi tanaman. Disamping Al, sering pula dijumpai kelarutan besi (Fe) dan mangan (Mn) yang cukup tinggi. Kedua unsur ini dibutuhkan tanaman dalam jumlah sedikit (mikro), dan bila berlebih akan bersifat meracun. Keberadaan kation-kation Al, Fe dan Mn pada tanah masam menyebabkan unsur fosfor (P) kurang tersedia bagi tanaman. Keracunan Al menyebabkan pembelahan sel, fosforilasi, serapan hara dan pertumbuhan akar terhambat. Akibatnya pertumbuhan bagian atas dan produksi tanaman berkurang.

Beberapa solusi yang telah berhasil dilakukan untuk mengatasi permasalahan pada ultisol seperti menaikkan pH melalui pengapuran, pengikatan Aluminium dengan penambahan pupuk P yang banyak dan khelat Al dengan penambahan bahan organik masih kurang efektif dan efisien karena besarnya biaya pembelian kapur dan pupuk serta biaya pengangkutan.

Upaya lain yang dapat dilakukan untuk mengatasi besarnya biaya yang harus dikeluarkan adalah menggunakan pupuk hayati. Pupuk hayati ini mengandung berbagai macam mikroorganisme yang dapat memacu pertumbuhan tanaman melalui produksi hormon pertumbuhan seperti auksin, giberelin dan sitokinin.

Auksin sangat berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman terutama dalam perbesaran dan pembelahan sel, mempengaruhi permeabilitas membran sel, peningkatan respirasi pada jaringan tanaman, memacu sintesis messenger RNA serta protein-enzim berupa protein struktural, inisiasi pembentukan akar. Biosintesis auksin tidak hanya terbatas pada tanaman tingkat tinggi, tetapi juga terdapat pada mikroorganisme.

Kemampuan rhizobakteri dalam menghasilkan fitohormon, antibiotik dan senyawa-senyawa metabolit lainnya, dapat dimanfaatkan untuk perbaikan atau meningkatkan pertumbuhan dan hasil tanaman melalui teknologi rekayasa genetika. Salah satu strategi untuk memperoleh gen penghasil IAA tersebut dapat dilakukan dengan cara penyusunan pustaka DNA genomik rhizobakteri tersebut

Pustaka genom dibuat untuk mengambil gen pembawa sifat spesifik dari organisme dan mempelajari sifat-sifat dasar biologi molekuler seperti struktur dan fungsi gen. Gen yang diperoleh dari pustaka genom dapat digunakan untuk memproduksi senyawa tertentu dalam jumlah besar. Tidak kalah pentingnya dalam upaya penyusunan pustaka DNA ini adalah keberhasilan dalam mentransformasikan fragmen DNA rekombinan ke dalam inangnya untuk dapat diperbanyak. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat-isolat bakteri yang mampu menghasilkan IAA yang tinggi dari tanah masam. Mendapatkan prosedur preparasi untuk kegiatan transformasi DNA bakteri penghasil IAA dari tanah masam.

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu, tahap pertama ialah isolasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri penghasil IAA. Pengambilan sampel tanah dilakukan secara acak. Sampel tanah dari rhizosfir tumbuhan yang sama dicampurkan untuk selanjutnya diisolasi. Isolat bakteri yang terpilih adalah isolat yang mampu menghasilkan IAA tertinggi dibandingkan isolat lainnya. Tahap kedua yaitu transformasi genetik.

Pengambilan sampel tanah dilakukan di daerah sekitar kebun percobaan kampus Unand Limau Manih, pada beberapa rhizosfir tanaman seperti alang-alang (*Imperata cylindrica*), sikaduduk (*Melastoma malabathricum*), karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*), paku resam (*Dicranopteris linearis*), pimping

(*Thiobacillus thiooxidans*) dan *Polystyricum* sp. Kegiatan ini memperoleh 50 isolat bakteri yang diseleksi berdasarkan bentuk dan warna koloni. Pengujian kemampuan bakteri dalam memproduksi IAA menunjukkan hasil bahwa semua isolat yang diisolasi dari tanah masam mampu menghasilkan IAA yang terlihat dari perubahan warna merah yang dihasilkan setelah penambahan pereaksi Salkowsky. Sejumlah 50 isolat bakteri yang mampu menghasilkan IAA selanjutnya dipilih enam (6) isolat terbaik untuk melihat pertumbuhan dan kemampuan isolat rhizobakteria tersebut dalam menghasilkan IAA setiap 4 jam. Isolat Alang-alang-10 diketahui memiliki kemampuan menghasilkan IAA paling tinggi dibandingkan lima isolat yang lain. Oleh sebab itulah maka isolat bakteri Alang-alang-10 dipilih untuk dikarakterisasi lebih lanjut secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Berdasarkan analisis BLAST menunjukkan bahwa isolat bakteri Alang-alang-10 merupakan bakteri dari genus *Acinetobacter*. Transformasi genetik fragmen DNA genomik bakteri Alang-alang-10 telah berhasil dilakukan dengan terinsersinya fragmen sekitar 897 bp pada vektor *pUC18*.

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi tesis yang ditulis dengan judul **“Isolasi Bakteri *Acinetobacter* Penghasil IAA pada Tanah Masam dan Upaya Transformasi Genetiknya”** adalah hasil kerja/karya saya sendiri dan bukan merupakan jiplakan dari hasil kerja/karya orang lain, kecuali kutipan pustaka yang sumbernya dicantumkan. Jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Januari 2011
Yang membuat pernyataan



Lily Syukriani
BP. 07 201 002

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Duri (Riau) pada tanggal 8 September 1980, merupakan anak ketiga dari lima bersaudara dari pasangan Bapak H.Azwarman dan Hj. Yurnaini. Penulis menamatkan SD pada tahun 1993 di SDN 001 Duri, SMP pada tahun 1996 di SMPN 02 Duri, dan SMA pada tahun 1999 di SMAN 01 Duri. Pada tahun 1999 melalui Ujian Masuk Perguruan Tinggi Negeri (UMPTN) penulis melanjutkan pendidikan di Fakultas Pertanian Universitas Andalas dan menyelesaikannya pada tahun 2004.

Pada tanggal 1 Januari 2005 penulis diterima sebagai staf pengajar di Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Penulis menikah dengan Muhammad Sadan pada tahun 2006 dan saat ini telah dikaruniai dua orang putri yang bernama Maharani Eka Putri dan Mulyasari Dwi Putri.

Pada tahun 2007 penulis mendapat kesempatan untuk melanjutkan pendidikan di Jurusan Agronomi Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang. Kesempatan sekolah ini diperoleh dari dana bantuan DIKTI BPPS.

ISOLASI BAKTERI *ACINETOBACTER* PENGHASIL IAA DARI TANAH MASAM DAN UPAYA TRANSFORMASI GENETIKNYA

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat-isolat bakteri yang mampu menghasilkan IAA yang tinggi dari tanah masam dan mendapatkan prosedur preparasi transformasi DNA bakteri penghasil IAA ke dalam *E.coli* DH5 α . Berdasarkan pengujian kemampuan bakteri dalam memproduksi IAA sebanyak 50 isolat bakteri yang diisolasi dari tanah masam mampu menghasilkan IAA berkisar dari 2,8-31,7 ppm. Isolat Alang-alang 10 mampu menghasilkan IAA tertinggi yaitu 31,7 ppm. Identifikasi isolat Alang-alang-10 secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat Alang-alang-10 merupakan bakteri *Acinetobacter*. Transformasi genetik fragmen DNA genomik bakteri *Acinetobacter* ini ke dalam *E.coli* DH5 α telah berhasil dilakukan dengan terinsersinya fragmen sekitar 897 bp pada vektor *pUC18*.

ISOLATION OF IAA PRODUCING BACTERIA *ACINETOBACTER* FROM ACID SOIL AND GENETIC TRANSFORMATION EFFORTS

ABSTRACT

This study was aimed to obtain bacterial isolates that capable to produce high IAA from acid soils and to optimize DNA into *Eschericia coli* DH5 α . Based on the ability of bacteria assay to produce IAA, 50 bacteria isolates which isolated from acid soils, are able to produce IAA. IAA producing was from 2,8 to 31.7 ppm. Alang-alang 10 was the best isolate that could produce the highest IAA and identified as *Acinetobacter* based on PCR based 16S rRNA gene. Genetic transformation of *Acinetobacter* bacterial genomic DNA fragments into *E. coli* DH5 α was successfully performed with fragment insert approximately 897 bp in *pUC18* vector.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis telah dapat menyelesaikan penulisan tesis ini yang berjudul **"Isolasi Bakteri *Acinetobacter* Penghasil IAA dari tanah Masam dan Upaya Transformasi Genetiknya"**. Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memenuhi persyaratan dalam memperoleh gelar Magister pada Program Studi Agronomi pascasarjana Universitas Andalas Padang.

Ucapan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang sebesar-besarnya penulis tujukan kepada Bapak Prof.Dr. Sc. Agr. Ir. H. Jamsari, MP sebagai pembimbing I dan Bapak Dr. Ir. Gustian, MS sebagai pembimbing II, yang telah banyak memberikan arahan dan bimbingan selama penelitian dan penulisan tesis ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada keluarga dan kedua orang tua yang selalu memberi doa dan dukungannya baik secara moril maupun materil dalam penyusunan tesis ini, serta semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Saran dari semua pihak untuk perbaikan tesis ini sangat penulis harapkan dan semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pertanian khususnya dan ilmu pengetahuan pada umumnya.

Padang, Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan	3
1.4. Hipotesis	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Rhizobakteri Penghasil IAA	5
2.2. Auksin (IAA)	6
2.3. Permasalahan Tanah Masam	9
2.4. Pustaka Genom	10
2.5. Seleksi Transforman dan Seleksi Rekombinan	11
III. BAHAN DAN METODE	
3.1. Waktu dan Tempat	13
3.2. Metode Penelitian	13
3.3. Bahan dan Alat	13
3.3.1. Identifikasi dan Karakterisasi Rhizobakteri	13
3.3.2. Optimasi Transformasi Genetik	14
3.4. Pelaksanaan	15
3.4.1. Identifikasi Morfologi dan Fisiologi	15
3.4.2. Identifikasi secara Molekuler	17
3.4.3. Optimasi Transformasi Genetik	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Isolasi Bakteri dari Tanah Masam	26
4.2. Karakterisasi Morfologi Bakteri	28
4.3. Karakterisasi Secara Fisiologi	29
4.3.1. Uji Reaksi Gram	29
4.3.2. Uji Pigmen Fluorescen	31
4.3.3. Uji Kemampuan Bakteri dalam Menghasilkan IAA	31

3.4.3.1. Uji Kemampuan Produksi IAA Isolat Bakteri Terpilih	...	34
4.4. Karakterisasi Molekuler Isolat Terpilih		37
4.4.1. Isolasi DNA Genomik		37
4.4.2. Amplifikasi Gen 16S rRNA		39
4.4.3. Analisis Data		40
4.5. Optimasi Preparasi Transformasi Genetik		45
4.5.1. Isolasi DNA Genomik <i>Acinetobacter</i> (Alang-alang 10)		45
4.5.2. Restriksi Enzimatis DNA Genomik Bakteri		47
4.5.3. Preparasi DNA Plasmid <i>pUC18</i>		49
4.5.4. Dephosphorilasi DNA Plasmid		50
4.5.5. Ligasi Vektor <i>pUC18</i> dengan Fragmen DNA		51
4.5.6. Pembuatan Sel Kompeten <i>E.coli</i> DH5 α dan Transformasi		52
4.5.7. Seleksi Koleksi Rekombinan dan Analisis Efisiensi Transformasi		54
4.5.8. Analisis ukuran <i>insert</i>		55
V. KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1. Kesimpulan		58
5.2. Saran		58
DAFTAR PUSTAKA		59
LAMPIRAN		63

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Morfologi isolat bakteri berdasarkan warna dan bentuk koloni	28
2. Karakterisasi enam (6) isolat bakteri terpilih	34
3. Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh enam (6) isolat bakteri terpilih ...	35
4. Data hasil analisis BLAST isolat bakteri terpilih Alang-alang-10	41
5. Perbedaan sekuen yang dimiliki dengan sekuen pada database gen Bank NCBI	43
6. Konsentrasi DNA dari isolasi DNA metode Jones dan Bartlet (1990) ...	46
7. Konsentrasi DNA dari isolasi DNA metode Leach <i>et al</i> (1990)	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Biosintesis IAA dari tryptophan	8
2. Jumlah isolat berdasarkan tanaman	26
3. Perbedaan susunan dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif	30
4. Histogram kemampuan masing-masing isolat bakteri menghasilkan IAA pada berbagai rhizosfir tanaman	32
5. Kurva pertumbuhan 6 (enam) isolat bakteri terpilih	35
6. Histogram 6 (enam) isolat bakteri terpilih dalam menghasilkan IAA setiap 4 jam	36
7. Elektroforegam isolasi DNA bakteri Alang-alang-10	38
8. Elektroforegam amplifikasi produk PCR	40
9. Grafik elektroforegam hasil sekuensing	40
10.A. Elektroforegam isolasi DNA bakteri metode Jones dan Bartlet (1990) ...	45
B. Elektroforegam isolasi DNA bakteri metode Leach <i>et al</i> (1990)	45
11. Elektroforegam restriksi menggunakan enzim <i>EcoRI</i>	48
12. Elektroforegam isolasi DNA <i>pUC18</i>	50
13. Hasil transformasi klon rekombinan dalam <i>E.coli</i> DH5 α	54
14. Elektroforegam isolasi plasmid rekombinan	55
15. Elektroforegam amplifikasi koloni rekombinan	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Identifikasi rhizobakteri secara morfologi dan fisiologi	63
2. Pensejajaran sekuens DNA Alang-alang-10 dengan ClustalW 1.83	64
3. Peta vektor plasmid <i>pUC18</i>	66
4. Prosedur pemberian <i>alkaline phosphatase</i>	67
5. Skema Penelitian	68

”

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Luas daerah Sumatera Barat adalah 3,67 juta ha dimana 635.500 ha merupakan tanah ultisol yang bereaksi masam (Fiantis, 2003). Permasalahan pada ultisol adalah ketersediaan hara makro (N, P, K, Ca, Mg) yang sangat rendah, sebaliknya ketersediaan hara mikro (Fe, Cu, Mn, Zn) pada tanah tersebut tinggi. Kelarutan Aluminium sangat tinggi sehingga dapat meracuni tanaman (Hardjowigeno, 2003; Fiantis, 2003).

Keracunan Aluminium dapat menghambat pembelahan sel akar tanaman. Akar tumbuh pendek-pendek dan tebal, sehingga akar sulit untuk menembus lapisan tanah dan menghambat serapan hara dan air. Pertumbuhan tanaman terganggu serta menurunkan produksi (Hakim, 2006), meskipun demikian ada beberapa tanaman yang mampu hidup pada tanah masam tersebut. Hal ini diduga selain disebabkan oleh struktur dari tanaman itu sendiri ada faktor lain seperti adanya mikroorganisme khususnya rhizobakteri yang mengkolonisasi akar tanaman tersebut. Rhizobakteria mengeluarkan suatu senyawa atau hormon yang dapat memacu pertumbuhan akar tanaman sehingga akar dapat tumbuh memanjang dan kebutuhan hara dapat terpenuhi.

Salah satu mekanisme yang dapat dilakukan oleh mikroorganisme dalam memacu pertumbuhan tanaman adalah produksi hormon pertumbuhan. Kemampuan fiksasi nitrogen dari udara untuk meningkatkan ketersediaan nitrogen tanah, serta penghasil osmoprotektan pada kondisi cekaman kekeringan (Kloepper dan Beauchamp 1992).

Hormon pertumbuhan tersebut adalah auksin, giberelin, etilen dan asam abisisi yang dapat mempengaruhi proses fisiologi tanaman meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah. Auksin sangat berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman terutama dalam perbesaran dan pembelahan sel, mempengaruhi permeabilitas membran sel, peningkatan respirasi pada jaringan tanaman, memacu sintesis messenger RNA serta protein-enzim berupa protein struktural, dan inisiasi pembentukan akar (Wattimena, 1992; Heddy, 1996).

Biosintesis auksin tidak hanya terbatas pada tanaman tingkat tinggi, tetapi juga terdapat pada mikroorganisme seperti fungi, bakteri, actinomycetes dan alga. Beberapa bakteri yang dapat memproduksi IAA (*Indole Acetic Acid*) ialah *Agrobacterium* spp., *Azospirillum* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Pantoea agglomerans*, *Xanthomonas* spp., dan lain-lain (Frankenberger dan Arshad, 1995).

Kemampuan rhizobakteri dalam menghasilkan fitohormon, antibiotik dan senyawa-senyawa metabolit lainnya, dapat dimanfaatkan untuk perbaikan atau meningkatkan pertumbuhan dan hasil tanaman melalui teknologi rekayasa genetika. Salah satu strategi untuk memperoleh gen penghasil IAA tersebut dapat dilakukan dengan cara penyusunan pustaka DNA genomik rhizobakteri tersebut.

Pustaka genom merupakan kumpulan seluruh informasi genetik suatu organisme yang terdapat dalam klon plasmid, fag atau kosmid. Klon plasmid, fag atau kosmid ini mengandung molekul DNA rekombinan. Pustaka genom sangat bermanfaat dalam usaha isolasi dan karakterisasi suatu gen. Peluang untuk mendapatkan suatu gen yang diinginkan dari suatu perpustakaan genom dipengaruhi oleh representatifnya fragmen DNA yang terklon dan tingkat kompleksitas genomnya (Nasir, 2002; Suharsono, 2002; Jamsari, 2007).

Pustaka genom dibuat untuk mengambil gen pembawa sifat spesifik dari organisme dan mempelajari sifat-sifat dasar biologi molekuler seperti struktur dan fungsi gen. Gen yang diperoleh dari pustaka genom dapat digunakan untuk memproduksi senyawa tertentu dalam jumlah besar (Shahib, 1990). Tidak kalah pentingnya dalam upaya penyusunan pustaka DNA ini adalah keberhasilan dalam mentransformasikan fragmen DNA rekombinan ke dalam inangnya untuk dapat diperbanyak.

Berdasarkan uraian diatas maka telah dilakukan penelitian yang berjudul 'Isolasi bakteri *Acinetobacter* penghasil IAA dari tanah masam dan upaya transformasi genetiknya'

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan yaitu (1) Apakah bakteri yang hidup dan berkembang di daerah rizosfir tanaman (rhizobakteri) dapat menghasilkan IAA dari tanah masam. (2) Perlu adanya prosedur preparasi untuk kegiatan transformasi DNA bakteri penghasil IAA dari tanah masam

1.3. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk (1) Mendapatkan isolat-isolat bakteri yang mampu menghasilkan IAA yang tinggi dari tanah masam. (2) Mendapatkan prosedur preparasi untuk kegiatan transformasi DNA bakteri penghasil IAA dari tanah masam.

1.4. Hipotesis

Adapun hipotesis dari penelitian ini adalah (1) Adanya isolat bakteri yang mampu menghasilkan IAA yang tinggi dari tanah masam. (2) Adanya prosedur preparasi untuk kegiatan transformasi DNA bakteri penghasil IAA dari tanah masam.

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan akan dapat bermanfaat sebagai (1) Koleksi isolat-isolat bakteri yang mampu menghasilkan IAA dari tanah masam. (2) Dengan diperolehnya informasi mengenai prosedur preparasi untuk kegiatan transformasi DNA bakteri penghasil IAA dari tanah masam maka konstruksi pustaka DNA genomik dapat lebih mudah untuk dilaksanakan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Rhizobakteri Penghasil IAA

Pengaruh PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) yang baik untuk pertumbuhan tanaman melalui mekanisme produksi fitohormon, pelarut phospat, dan fiksasi nitrogen secara asimbiotik. Beberapa spesies PGPR mampu memproduksi fitohormon seperti auxin, sitokinin, giberelin dan etilen (Frankenberger and Arshad, 1995).

Kelompok rhizobakteria yang bermanfaat bagi pertumbuhan tanaman secara langsung adalah kelompok penghasil zat pengatur tumbuh. Beberapa kelompok rhizobakteri yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi tanaman adalah : (a) *Rhizobium* (bakteri penambat N₂ yang bersimbiosis dengan kacang-kacangan, (b) *Azotobacter*, *Azospirillum* (bakteri penambat N₂ yang tidak bersimbiosis dengan tanaman, (c) *Bacillus subtilis*, *B. polymixa* (bakteri penghasil senyawa yang dapat melarutkan fosfat tanah), (d) *Clostridium* dan (e) *Pseudomonas fluorescens* dan *P. putida* (bakteri penghasil IAA) (Klopper, 1993).

Isolat *Azotobacter* juga mampu menghasilkan zat pengatur tumbuh, seperti *Indole Acetic Acid* (IAA) (Wedhastri, 1999). Sifat inilah yang menjelaskan pengaruh menguntungkan *Azotobacter* sehubungan dengan peran IAA dalam meningkatkan perkembangan dan pembelahan sel tanaman. IAA merangsang perkembangan akar dan memperbanyak bulu-bulu akar tanaman padi (Razie dan Anas, 2005). Strain *Azospirillum* Az15 dan Az44 memiliki kemampuan yang tinggi dalam memproduksi IAA, masing-masing sebesar 57,93 µg/ml pada umur 12 hari dan 40,42 µg/ml pada umur 7 hari (Lestari, et al. 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Yasmin, *et al.* (2007), berhasil memperoleh lima belas isolat bakteri yang menghasilkan IAA berasal dari rhizosfir tanaman ubi jalar. Bakteri penghasil IAA juga telah diisolasi dari rhizosfir beberapa tanaman *Brassica juncea* L. (Asghar, *et al.* 2002). Berbagai hasil penelitian melaporkan bahwa beberapa kelompok mikroba mampu menghasilkan senyawa yang dapat mempercepat pertumbuhan tanaman. Sebagai contoh, bakteri *Rhizobium* yang terseleksi mampu menstimulasi pertumbuhan, baik pada tanaman *Legumonoceae* (tanaman kacang-kacangan) maupun yang bukan *Legumonoceae* pada skala lapangan. Bakteri tersebut terbukti mampu memproduksi fitohormon yaitu sitokinin dan auksin (Hoflich and Kuhn, 1994).

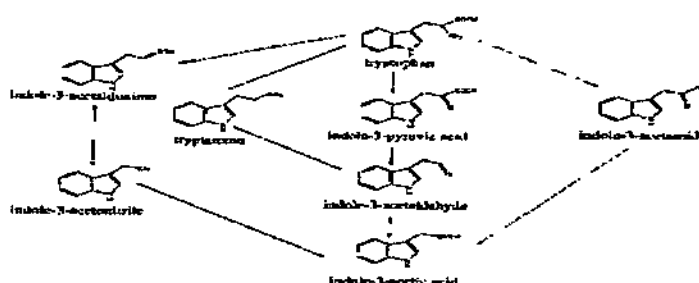
2.2. Auksin (IAA)

Auxin adalah asam indol asetat (IAA) atau $C_{10}H_9O_2N$ (Heddy, 1996). Auksin diproduksi dalam jaringan meristematik yang aktif (yaitu tunas, daun muda dan buah). Auksin dibiosintesis dari asam amino prekursor triptopan, dengan hasil perantara sejumlah substansi yang secara alami mirip auksin (analog) tetapi mempunyai aktivitas lebih kecil dari IAA seperti IAN (*Indolaseto nitril*), TpyA (asam indol piruvat) dan IAAId (*Indol Asetat Dehid*). Proses biosintesis auksin dibantu oleh enzim IAA-oksidadase (Gardner *et al.*, 1991). Hormon ini disintesis dari tryptophan melalui salah satu dari lintasan metabolit, yaitu :

- a. Lintasan *Indoleacetamide* yang melibatkan 2 jenis enzim kunci yaitu *tryptophan monooxygenase* dan *indoleacetamidehydrolase*
- b. Lintasan *indolepyruvate* menghasilkan senyawa perantara yaitu *indole-3-pyruvate* dan *indole-3-acetaldehyde* (Habazar dan Rivai, 2004).

Lintasan *indoleacetamide* merupakan jalur utama dalam produksi auxin oleh bakteri sedangkan lintasan *indolepyruvate* merupakan sintesis auxin pada sel-sel tumbuhan tingkat tinggi (Habazar dan Rivai, 2004). Jalur *indole-3-acetamide* (IAM) adalah jalur biosintesis yang terdapat dalam bakteri. Jalur ini terdiri dari dua langkah yang pertama adalah triptophan dikonversikan ke IAM oleh enzim *tryptophan-2-monooxygenase* (IaaM), dikode oleh gen IaaM. Langkah kedua IAM dikonversi menjadi IAA oleh enzim *IAM hydrolase* (IaaH), dikode oleh gen IaaH. Jalur IAM ini spesifik ditemukan pada bakteri bukan pada tanaman. Jalur *indole-3-piruvat* (IPyA) diperkirakan menjadi jalur utama untuk biosintesis IAA pada tanaman. Namun, enzim dan gen yang berperan dalam jalur ini, belum teridentifikasi pada tanaman.

Pada bakteri, produksi IAA melalui jalur IPyA telah diketahui. Langkah pertama jalur ini adalah konversi tryptophan ke IPyA oleh *aminotransferase* (transaminasi). Jalur IPyA adalah dekarboksilase untuk *indole-3-asetaldehida* (IAAId) oleh *indole-3-piruvat dekarboksilase* (IPDC). Pada langkah terakhir IAAId dioksidasi menjadi IAA. Gen *iaaM* and *iaaH* telah diklon dan dikarakterisasi dari berbagai bakteri, diantaranya *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* (Sekine et al., 1989; Clark et al., 1993; Morris, 1995; Theunis et al., 2004) cit Spaepen, et al. (2007).



Gambar 1. Biosintesis IAA dari Tryptophan (Nohebel et al. 1993 cit Normanly et al. 1995).

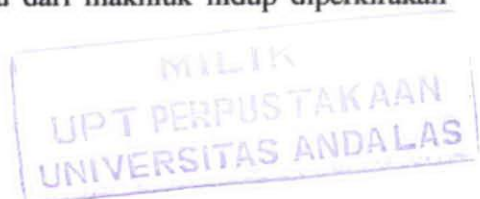
2.3. Permasalahan Tanah Masam

Kemasaman tanah merupakan masalah utama yang sering dijumpai pada tanah-tanah di wilayah beriklim tropika basah seperti Indonesia. Tanah masam menempati sebagian besar wilayah Indonesia dan tersebar diberbagai pulau. Masalah yang di hadapi pada tanah tanah tropika basah seperti halnya oxisol dan ultisol antara lain adalah fiksasi P yang tinggi, keracunan Al, kekurangan unsur unsur hara penting dan kapasitas memegang air yang rendah. Pada wilayah iklim tropika basah memiliki curah hujan tinggi setiap tahun yang mengakibatkan basa-basa mudah tercuci, mineral Al-silikat membebaskan ion Al sebagai penyumbang kemasaman melalui hidrolisis. Disamping itu pelapukan bahan organik, asam sulfat dan nitrat dari pupuk atau bahan organik juga penyebab kemasaman tanah.

Masalah utama yang dihadapi pada tanah masam adalah kelarutan Al yang tinggi sehingga dapat bersifat meracun bagi tanaman. Disamping Al, sering pula dijumpai kelarutan besi (Fe) dan mangan (Mn) yang cukup tinggi. Kedua unsur ini dibutuhkan tanaman dalam jumlah sedikit (mikro), dan bila berlebih akan bersifat meracun. Keberadaan kation-kation Al, Fe dan Mn pada tanah masam menyebabkan unsur fosfor (P) kurang tersedia bagi tanaman. Keracunan Al menyebabkan pembelahan sel, fosforilasi, serapan hara dan pertumbuhan akar terhambat. Akibatnya pertumbuhan bagian atas dan produksi tanaman berkurang (Nyakpa *et al.* 1998).

2.4. Pustaka Genom

Sejalan dengan berkembangnya teknik-teknik molekuler, penemuan gen-gen esensial terkait dengan karakter-karakter tertentu dari makhluk hidup diperkirakan



akan terus menjadi objek kajian yang menarik. Pencarian gen atau yang dikenal dengan istilah "*gene discovery*" ini tentu tidak lepas dari upaya untuk mengkoleksi gen-gen makhluk hidup dalam suatu pustaka ("*library*"), baik berupa pustaka genom maupun pustaka cDNA. Keberhasilan pembacaan susunan asam nukleat DNA yang membangun genom ('*structural genomics*') pada beberapa mikroba, khamir, tanaman, hewan dan manusia pada tahun-tahun terakhir ini membuka peluang perunutan fungsi gen (*gene discovery/gene hunting*) dan pemahaman sistem biologi dalam tatanan molekul pada era pasca pembacaan struktur genom (Muladno, 2002).

Suatu perpustakaan gen dapat diartikan sebagai sekumpulan sekuens (urutan) DNA dari suatu organisme yang masing-masing telah diklon ke dalam vektor tertentu untuk memudahkan pemurnian, penyimpanan, dan analisisnya. Pada dasarnya terdapat dua macam perpustakaan gen yang dapat dikonstruksi, bergantung kepada sumber DNA digunakan. Jika DNA yang digunakan adalah DNA genomik/kromosom, maka perpustakaan yang dihasilkan disebut pustaka genom. Sementara itu, jika DNA yang digunakan merupakan hasil transkripsi balik suatu populasi mRNA seperti yang umum dijumpai pada eukariot, maka perpustakaan yang diperoleh dinamakan perpustakaan cDNA (Jamsari, 2007).

Hal yang perlu diperhatikan ketika kita melakukan konstruksi suatu perpustakaan gen adalah bahwa perpustakaan tersebut harus merepresentasikan semua gen yang ada di dalam sumber DNA asalnya. Dengan perkataan lain, suatu perpustakaan gen dikatakan representatif apabila berisi semua sekuens aslinya. Selain itu, jika suatu perpustakaan tidak mengandung klon dalam jumlah yang mencukupi, maka sangat dimungkinkan hilangnya beberapa gen tertentu (Nasir, 2002).

Pada dasarnya upaya untuk mendapatkan suatu produk yang diinginkan melalui teknologi DNA rekombinan melibatkan beberapa tahapan tertentu. Tahapan-tahapan tersebut adalah isolasi DNA genomik/kromosom yang akan diklon, pemotongan molekul DNA menjadi sejumlah fragmen dengan berbagai ukuran, isolasi DNA vektor, penyisipan fragmen DNA ke dalam vektor untuk menghasilkan molekul DNA rekombinan, transformasi sel inang menggunakan molekul DNA rekombinan, reisolasi molekul DNA rekombinan dari sel inang, dan analisis DNA rekombinan (Brown, 1991).

2.5. Seleksi Transforman dan Seleksi Rekombinan

Kita harus melakukan seleksi untuk memilih sel inang transforman yang membawa DNA rekombinan, karena DNA yang dimasukkan ke dalam sel inang bukan hanya DNA rekombinan. Selanjutnya, di antara sel-sel transforman yang membawa DNA rekombinan masih harus dilakukan seleksi untuk mendapatkan sel yang DNA rekombinannya membawa fragmen sisipan atau gen yang diinginkan.

Pada dasarnya ada tiga kemungkinan yang dapat terjadi setelah transformasi dilakukan, yaitu (1) sel inang tidak dimasuki DNA apa pun atau berarti transformasi gagal, (2) sel inang dimasuki vektor religasi atau berarti ligasi gagal, dan (3) sel inang dimasuki vektor rekombinan dengan/tanpa fragmen sisipan atau gen yang diinginkan. Untuk membedakan antara kemungkinan pertama dan kedua dilihat perubahan sifat yang terjadi pada sel inang. Jika sel inang memperlihatkan dua sifat marker vektor, maka dapat dipastikan bahwa kemungkinan kedualah yang terjadi. Selanjutnya, untuk membedakan antara kemungkinan kedua dan ketiga dilihat pula perubahan sifat yang terjadi pada sel inang. Jika sel inang hanya memperlihatkan salah satu sifat di antara

kedua marker vektor, maka dapat dipastikan bahwa kemungkinan ketigalah yang terjadi (Brown, 1991)

Seleksi sel rekombinan yang membawa fragmen yang diinginkan dilakukan dengan mencari fragmen tersebut menggunakan fragmen pelacak (*probe*), yang pembuatannya dilakukan secara *in vitro* menggunakan teknik reaksi polimerisasi berantai atau *polymerase chain reaction* (PCR). Pelacakan fragmen yang diinginkan antara lain dapat dilakukan melalui cara yang dinamakan hibridisasi koloni. Koloni-koloni sel rekombinan ditransfer ke membran nilon, dilisis agar isi selnya keluar, dibersihkan protein dan remukan sel lainnya hingga tinggal tersisa DNANYa saja. Selanjutnya, dilakukan fiksasi DNA dan perendaman di dalam larutan pelacak. Posisi-posisi DNA yang terhibridisasi oleh fragmen pelacak dicocokkan dengan posisi koloni pada kultur awal (*master plate*). Dengan demikian, kita bisa menentukan koloni-koloni sel rekombinan yang membawa fragmen yang diinginkan (Jamsari, 2007).

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan mulai bulan Mei 2009 – Mei 2010, di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Jurusan BDP Faperta Unand.

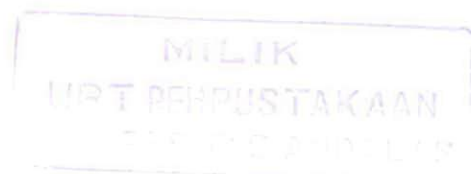
3.2. Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu, tahap pertama ialah isolasi, identifikasi dan karakterisasi bakteri penghasil IAA. Pengambilan sampel tanah dilakukan secara acak. Sampel tanah dari rhizosfir tumbuhan yang sama dicampurkan untuk selanjutnya diisolasi. Isolat bakteri yang terpilih adalah isolat yang mampu menghasilkan IAA tertinggi dibandingkan isolat lainnya. Tahap kedua yaitu transformasi genetik.

3.3. Bahan dan Alat

3.3.1. Identifikasi dan Karakterisasi Rhizobakteri

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah dari rizosfir tumbuhan sikaduduk (*Melastoma malabathricum*), alang-alang (*Imperata cylindrica*), karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*), paku resam (*Dicranopteris linearis*), pimping (*Themeda gigantea*) dan *Polysticum* sp, keseluruhan tanaman tersebut tumbuh di Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Bahan-bahan kimia yang dipergunakan antara lain FeCl_3 0.5M + H_2SO_4 (Pereaksi Salskowsky), 0.05 g IAA, larutan fisiologis (NaCl) 0,85 %, media King's B (Protease pepton 20 g/L, Glyserol 10 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/L, Bacto agar 15 g/L), nutrient agar (HIMEDIA-India), aquades, KOH 3 %, beef extract (HIMEDIA-India), peptone



TBE, *ethyidium bromide*, *bromo phenol blue* (BPB), DNA lambda, bead RTG-PCR (GE-Health care-UK), kertas label, aluminium foil, plastik wrap dan spiritus, alat tulis, Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison), 3% X-Gal, 100 mM IPTG, dan 100mg/ml Ampicilin.

Alat yang digunakan adalah gelas ukur, gelas objek, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, korek api, *Laminar Air Flow Cabinet*, bunsen, autoclave, kompor listrik, magnetic stirrer, oven suhu 37°C, lemari es, *colony counter*, kamera digital, vortex, tabung *ependorf* 2 dan 1,5 ml, botol reagen, botol media, pipet mikro, mesin PCR (Biometra Jerman), alat sentrifus, elektroforesis horizontal, tissue, *gel documentasi system*, lampu UV, spektrofotometer, nampan plastik, tusuk gigi, dan alat-alat lainnya.

3.4. Pelaksanaan

3.4.1. Identifikasi morfologi dan fisiologis

3.4.1.1. Pengambilan sampel tanah

Pengambilan sampel tanah rhizosfir dilakukan dengan cara menggali tanah disekitar perakaran secara perlahan-lahan menggunakan sendok tanah. Akar dipisahkan dari bongkahan tanah besar dan membiarkan sebanyak mungkin tanah yang melekat pada akar. Pengambilan sampel tanah rhizosfir berikutnya dari jenis tanaman yang berbeda dilakukan setelah semua peralatan bersih dan steril.

3.4.1.2. Isolasi bakteri

Isolasi bakteri menggunakan teknik pengenceran seri, dengan cara sebagai berikut : 1 gram sampel tanah rizosfer dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi

9 ml akuades steril, dan dihomogenkan menggunakan vortex. Suspensi ini diencerkan secara seri sampai 10^{-7} , 1 ml suspensi dari masing-masing seri (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) dipindahkan ke dalam cawan petri yang telah berisi medium NA dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang.

3.4.1.3. Uji Reaksi Gram

Reaksi gram bertujuan untuk mengetahui apakah isolat tersebut bersifat gram negatif atau gram positif. Pengujian dilakukan dengan meneteskan satu tetes KOH 3% di atas kaca objek kemudian satu koloni bakteri diambil dengan jarum ose dan disuspensikan. Bakteri gram negatif menunjukkan penggumpalan suspensi, sedangkan gram positif tidak menunjukkan penggumpalan.

3.4.1.4. Uji Pigmen Fluorescen

Uji pigmen fluoresen dilakukan dengan menggunakan medium king's B. Satu koloni bakteri digoreskan pada medium king's B, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Bila terbentuk warna kuning kehijauan di sinar UV, berarti bakteri tersebut menghasilkan pigmen fluorescen.

3.4.1.5. Uji Kemampuan bakteri dalam memproduksi IAA

Pengujian kemampuan isolat dalam menghasilkan IAA dilakukan menggunakan metode Colorimetric Bric *et.al* (1990) yang dimodifikasi oleh Maira (2000). Satu koloni isolat rhizobakteri yang tumbuh pada media king's B agar dimasukkan ke dalam 5 ml media king's B cair dengan menggunakan jarum ose, kemudian dishaker selama 24 jam pada suhu ruang, setelah itu disentrifus selama 7 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Sebanyak 1 ml supernatan (cairan bening) dari

masing-masing isolat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 4 ml pereaksi salkowsky. Setelah 20-25 menit diamati warna supernatan, apabila berubah menjadi merah berarti bakteri tersebut mampu menghasilkan IAA. Absorban dari perubahan warna merah diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm. IAA murni digunakan sebagai standar dengan konsentrasi 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 dan 45 ppm.

Isolat yang menghasilkan IAA tertinggi selanjutnya yang akan dipergunakan untuk tahap kedua yaitu transformasi genetik.

3.4.2. Identifikasi secara molekuler

3.4.2.1. Isolasi DNA genomik

Satu koloni tunggal diinokulasikan ke dalam 10 ml media NA cair, dan dishaker semalaman. Kultur bakteri sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam ependorf dan disentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit. Pelet sel yang diperoleh diresuspensi dengan menambahkan 250 µl TE, kemudian tambahkan lisozym 5 µl (5µg/ml) dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya tambahkan NaCl 5M sebanyak 65 µl dan 80 µl CTAB, dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65°C. Kemudian ditambahkan C:I (24:1) dengan volume yang sama dan dishaker selama 30 menit pada kecepatan 150 rpm setelah itu disentrifus selama 15 menit. Fase atas yang terbentuk dipindahkan ke tabung ependorf baru dan ditambahkan 600 µl isopropanol dingin. Tabung dibolak-balik kemudian disentrifus kembali. Pelet dicuci dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 700 µl. Pelet dikeringkan menggunakan *hot plate*, kemudian pelet dilarutkan dengan menambahkan TE sebanyak 50 µl dan disimpan pada suhu 20°C.

3.4.2.2. Amplifikasi Gen 16S rRNA

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan menggunakan kombinasi primer yang didesain dari sekuen gen 16S rRNA. Kombinasi primer yang digunakan adalah 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'). Amplifikasi dengan primer ini diperkirakan menghasilkan produk amplifikasi PCR sekitar 1500 bp. Reaksi PCR dilakukan pada total volume 25 μ l yang terdiri dari 2 μ l DNA templet, 2 μ l kombinasi masing-masing primer 27F dan 1525R (5 pmol/ μ l), 21 μ l ddH₂O PCR dalam RTG-PCR Bead. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus pada mesin PCR (Biometra-Jerman). Kondisi PCR yang digunakan adalah: denaturasi (94°C) selama 1 menit, annealing pada suhu 57°C selama 1 menit, ekstensi selama 1 menit pada suhu 72°C. Ekstensi tambahan dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit.

3.4.2.3. Sekuensing

Sekuensing dilakukan di PT CPI (Charoen Phokphand Indonesia) di Jakarta. Sekuensing dilakukan satu arah (*one read direction*) menggunakan primer 1525R. Untuk keperluan sekuensing digunakan 20 μ l produk PCR dengan konsentrasi 25 ng/ μ l, sedangkan primer yang digunakan adalah 1525R dengan konsentrasi 5 pmol/ μ l dengan volume sebanyak 10 μ l.

3.4.2.4. Analisis Data

Hasil sekuensing digunakan untuk analisis spesies bakteri dengan membandingkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens-sekuens gen yang telah didepositkan ke dalam database publik secara *in-Silico*. Analisis dilakukan dengan

program BLAST yang dilakukan secara online pada web site NCBI (*National centre of Biotechnology Information*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

3.4.3. Optimasi Transformasi Genetik

3.4.3.1. Isolasi DNA genomik bakteri

Kegiatan isolasi DNA bakteri ini dimulai dengan cara mengkulturkan koloni bakteri isolat terpilih hasil biakan murni dengan menggunakan tusuk gigi ke dalam media NB (*Nutrient Broth*) yang kemudian dishaker pada kecepatan 150 rpm selama 24 jam (*over night*). Prosedur kerja isolasi DNA bakteri ini berdasarkan metode Jones dan Bartlet (1990). Prosedur kerjanya adalah menumbuhkan 6 ml kultur cair masing-masing isolat selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 2 ml dan disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 14.000 rpm untuk mendapatkan pelet. Pelet diresuspensi dengan 1 x TE (Tris-EDTA) sebanyak 500 μ L, lalu ditambahkan 40 μ L SDS 10% dan 5 μ L proteinase K (10 mg/mL). Campuran dibolak-balik hingga sempurna dan selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan dengan phenol:chloroform (PC) (24:24) sebanyak 1 x volume dan disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Supernatan (bagian atas) kemudian diambil dan transfer ke tabung eppendorf 2 ml, lalu ditambahkan sekali lagi PC sebanyak volume yang sama dan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Supernatan diambil dan ditransfer ke tabung eppendorf 1,5 ml yang baru lalu ditambahkan 1/10 volume natrium acetat 3 M serta ditambahkan juga 0,6 volume isopropanol dingin dan bolak-balik tabung sampai DNA terpresipitasi, kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 14.000

rpm. Pellet DNA tersebut dicuci dengan ethanol 70% dingin sebanyak 1 ml selama 30 detik dan dikeringkan dengan menggunakan *heater block* pada suhu 55°C selama 5 menit. Setelah itu pellet DNA disuspensikan dengan buffer 1 x TE sebanyak 100 µl. Kualitas dan kuantitas larutan DNA tersebut dianalisis dengan teknik elektroforesis.

Sedangkan prosedur isolasi DNA bakteri dengan menurut Leach, White, Rhoads dan Leung (1990) adalah seperti berikut ini:

Satu koloni tunggal diinokulasikan ke dalam 10 ml media NA cair, dan dishaker semalaman. Kultur bakteri sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam ependorf dan disentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit. Pelet sel yang diperoleh diresuspensi dengan menambahkan 250 µl TE, kemudian tambahkan lisozym 5 µl (5µg/ml) dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. NaCl 5M sebanyak 65 µl dan 80 µl CTAB ditambahkan ke dalam tabung ependorf, lalu inkubasi selama 20 menit pada suhu 65°C. C:I (24:1) kemudian ditambahkan dengan volume yang sama dan dishaker selama 30 menit pada kecepatan 150 rpm, setelah itu disentrifus selama 15 menit. Fase atas yang terbentuk dipindahkan ke tabung ependorf baru dan ditambahkan 600 µl isopropanol dingin, bolak-balik tabung kemudian disentrifus kembali. Pelet dicuci dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 700 µl. Pelet dikeringkan menggunakan *hot plate*, kemudian pelet dilarutkan dengan menambahkan TE sebanyak 50 µl dan disimpan pada suhu 20°C.

3.4.3.2. Restriksi DNA genom

DNA total bakteri direstriksi dengan enzim restriksi *EcoRI* pada suhu 37°C selama semalaman. DNA kromosom yang telah direstriksi dielektroforesis dengan gel agarose 1% pada tegangan 20V. Fragmen DNA divisualisasi dengan sinar UV.

3.4.3.3. Preparasi DNA plasmid

Vektor yang akan digunakan untuk konstruksi pustaka genom ini adalah vektor *pUC18*. Vektor *pUC18* diperoleh dengan cara membiakkan *E. coli* DH5 α yang mengandung plasmid *pUC18* dalam media LB cair yang mengandung ampicilin selama 12-16 jam pada suhu 37°C dan dishaker pada kecepatan 150 rpm. DNA plasmid diisolasi dari *E. coli* DH5 α dengan menggunakan Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison).

Koloni tunggal bakteri *E.coli* DH5 α transforman *pUC18* diinokulasikan ke dalam 10 ml medium LB cair dan diinkubasi di dalam shaker inkubator dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 16 jam (semalam). Sebanyak 2 ml kultur bakteri hasil inkubasi diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi dengan kecepatan 10.000xg selama 5 menit, agar pelet yang diperoleh lebih banyak perlakuan ini dapat diulang 2-3 kali. Pelet yang diperoleh ditambah dengan 250 μ l *Cell resuspension solution* kemudian di vortex, setelah pellet larut ditambahkan 250 μ l *cell lysis solution* dan inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Tambahkan 10 μ l *alkaline phosphatase solution*, setelah itu tabung dibolak-balik dengan hati-hati dan inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, kemudian ditambahkan 350 μ l *neutralization solution*, lalu tabung dibolak-balik dan inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 14.000xg selama 10 menit.

DNA dipurifikasi dengan cara memindahkan larutan ke dalam SV minicoloum yang telah terpasang dengan *collection tube*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000xg selama 1 menit. Cairan di dalam *collection tube* (flowthrough) dibuang dan *collection tube* dipasang kembali dengan SV minicoloum. Membrane wash solution ditambahkan sebanyak 750 μ l dan disentrifugasi kecepatan

14.000xg selama 1 menit, kemudian *flowthrough* dibuang. *Membran wash solution* ditambahkan kembali ke dalam SV minicoloum sebanyak 250 μ l, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000xg selama 2 menit, kemudian SV minicoloum dipindahkan ke tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml yang bersih. *Nuclease free water* sebanyak 100 μ l ditambahkan ke dalam tabung kemudian disentrifugasi ke 14.000xg selama 1 menit. hasil purifikasi ini disimpan pada suhu -20° C.

Vektor *pUC18* yang diperoleh dipotong dengan enzim *EcoRI* sebanyak 1 μ g *pUC18* direstriksi dengan 1,5 dan 2 unit enzim *EcoRI*. Campuran reaksi dihomogenkan, lalu diinkubasi pada 37° C selama semalaman. Selanjutnya plasmid *pUC18* linier dilakukan defosforilasi dengan 1 unit enzim fosfatase alkaline (CIAP).

3.4.3.4. Ligasi Fragmen ke dalam Vektor

Ligasi dilakukan dengan menggunakan 1 unit/ μ l enzim T4 ligase dan diinkubasi pada suhu 4° C selama 16 jam. Sel kompeten disiapkan dengan menginokulasi 10 ml LB medium yang telah ditambah ampisilin dengan koloni tunggal *Escherichia coli* DH5 α diinkubasi pada suhu 37° C selama 16-20 jam. Satu ml suspensi sel ditumbuhkan pada 10 ml LB medium selama 3 jam untuk mencapai fase logaritma. Sejumlah 2 ml suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit, pelet yang diperoleh ditambahkan 500 μ l 0,1M CaCl_2 dingin dan diinkubasi selama 20 menit dalam es, selanjutnya disentrifugasi kembali, dan diresuspensikan dalam 200 μ l 0,1M CaCl_2 dingin, diinkubasi kembali selama 20 menit. Sel siap untuk tahap transformasi.

3.4.3.5. Transformasi Vektor ke dalam Sel Inang

Sel kompeten sebanyak 50 μ l ditambahkan dengan hasil ligasi, tabung dicampur pelan-pelan dan ditaruh dalam es selama 20 menit. Tabung diinkubasi dalam *waterbath* 42°C selama 2 menit, dan segera dimasukkan dalam es kembali selama 2 menit. Sel selanjutnya dimasukkan pada medium LB diinkubasi selama 60-90 menit pada 37°C dan di shaker kecepatan 150 rpm.

3.4.3.6. Seleksi Koleksi Rekombinan

Rekombinan diseleksi menggunakan medium Luria agar yang telah ditambah 3% X-Gal, 100 mM IPTG, dan 100 mg/ml Ampicilin.

3.4.3.7. Analisis Efisiensi Transformasi

Efisiensi transformasi dianalisis dengan menghitung jumlah koloni berwarna biru dan putih. Koloni rekombinan adalah berwarna putih, sedangkan koloni non rekombinan berwarna biru.

3.4.3.8. Analisis Ukuran *Insert*

Ukuran *insert* dianalisis dengan cara mengisolasi plasmid dari klon yang diambil secara acak. Isolasi plasmid dilakukan menggunakan metode *Quick and Dirty*. Ukuran *insert* ditentukan menggunakan teknik PCR. Plasmid rekombinan diamplifikasi menggunakan RTG-PCR Bead dengan primer M13-F (GTA AAA CGA CGG CCA G) dan M13-R (CAG GAA ACA GCT ATG AC). Reaksi PCR dilakukan pada total volume 25 μ l yang terdiri dari 1 μ l plasmid rekombinan, 2 μ l kombinasi masing-masing primer, 22 μ l ddH₂O PCR dalam RTG-PCR Bead. Amplifikasi dilakukan sebanyak 25 siklus pada mesin PCR (Biometra-Jerman). Kondisi PCR

yang digunakan adalah: predenaturasi suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi (94°C) selama 1 menit, annealing pada suhu 55°C selama 1 menit, ekstensi selama 1 menit pada suhu 72°C . Ekstensi tambahan dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Bakteri dari Tanah Masam

Pengambilan sampel tanah dilakukan di daerah sekitar kebun percobaan kampus Unand Limau Manih pada beberapa rhizosfir tanaman seperti alang-alang (*Imperata cylindrica*), sikaduduk (*Melastoma malabathricum*), karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*), paku resam (*Dicranopteris linearis*), pimping (*Themeda gigantea*) dan *Polysticum* sp. Isolasi dilakukan menggunakan media natrium agar dengan teknik pengenceran seri selanjutnya dilakukan pemurnian untuk mendapatkan koloni tunggal. Kegiatan ini menghasilkan sebanyak 50 isolat bakteri yang diseleksi berdasarkan bentuk dan warna koloni. Jumlah isolat yang diperoleh berdasarkan jenis tanaman dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Jumlah isolat berdasarkan tanaman

Jumlah isolat bakteri yang diperoleh dari rhizosfir alang-alang 11 isolat, sedangkan dari rhizosfir sikaduduk diperoleh 8 isolat. Sebanyak 17 isolat bakteri diperoleh dari rhizosfir paku resam, dan 8 isolat dari rhizosfir pimping. Sementara itu 4 isolat dari rhizosfir karamunting dan 2 isolat dari rhizosfir *Polysticum* sp. Isolat

terbanyak ditemukan dari rhizosfir paku resam dan alang-alang. Hal ini diduga disebabkan karena kedua tanaman ini merupakan vegetasi dominan yang tumbuh pada ultisol Limau Manis. Pengambilan sampel tanah juga lebih banyak dilakukan pada kedua rhizosfir ini.

Menurut Sukardi, *et al.* (1993) dan Sitorus (2002) bahwa alang-alang tumbuh pada tanah yang marginal yang memiliki sifat fisika tanah yang buruk seperti ultisol. Paku resam merupakan jenis paku yang tumbuh pada daerah terbuka dan lembab (Lugrayasa dan Adjie, 2004) seperti daerah pada kebun percobaan kampus Unand Limau Manis ini yang memiliki curah hujan yang tinggi (100-200 mm/bulan) (Masdar, 2006). Sikaduduk adalah salah satu jenis tumbuhan yang dikenal mampu menyerap Al dalam jumlah yang tinggi dan tidak menunjukkan gejala keracunan Al pada tanaman. Hasil penelitian Watanabe *et al.* (1998) menunjukkan bahwa *Melastoma malabathricum* L. mampu mengakumulasi Al pada daun muda, dewasa, tua dan akar masing-masing sebanyak 8.000, 9.200, 14.400 dan 10.400 ppm Al dengan tidak menunjukkan keracunan Al. Penurunan kadar Al ini diharapkan juga akan meningkatkan ketersediaan P serta memperbaiki efisiensi serapan P oleh tanaman.

Alasan lain pengambilan sampel tanah pada rhizosfir pimping, karamunting dan *Polysticum* sp adalah karena tumbuhan ini merupakan tumbuhan yang tumbuh secara alami pada lahan kebun percobaan Limau Manis. Dalam hal ini diharapkan akan diperoleh rhizobakteria-rhizobakteria indigenus yang mampu bertahan hidup pada kondisi tanah masam seperti ultisol. Kemampuan suatu tanaman untuk tumbuh baik pada kondisi lingkungan yang miskin hara dipengaruhi oleh interaksi akar tanaman dengan mikroorganisme yang berada di dalam tanah. Akar tanaman akan

mengeluarkan sisa-sisa metabolisme (eksudat akar) yang oleh beberapa mikroorganisme dalam tanah seperti rhizobakteria akan dimanfaatkan untuk kelangsungan hidupnya (Husin, 2004). Salah satu sisa metabolisme yang dikeluarkan oleh akar tanaman adalah tryptophan, beberapa mikroorganisme ada yang memiliki kemampuan untuk mensintesis tryptophan menjadi IAA. IAA dapat meningkatkan pertumbuhan akar tanaman secara langsung dengan menstimulasi pemanjangan sel atau pembelahan sel (Patten dan Glick, 2002).

4.2. Karakterisasi Morfologi Bakteri

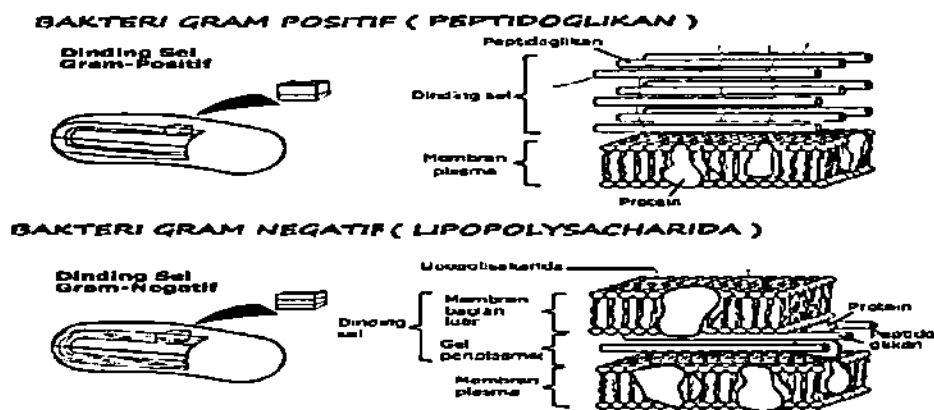
Hasil identifikasi bakteri secara morfologi berdasarkan warna koloni dan bentuk koloni bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Morfologi isolat bakteri berdasarkan warna dan bentuk koloni

Rhizosfir tanaman	Krem, bulat	Krem, tidak beraturan	Kuning, bulat	Kuning, tidak beraturan	Bening tidak beraturan	Putih, bulat
Alang-alang	7	2	-	1	1	-
Paku resam	7	4	3	-	-	4
Sikaduduk	5	1	-	1	-	1
Karamunting	2	1	1	-	-	-
Pimping	2	2	2	-	2	-
<i>Polysticum</i> sp	2	-	-	-	-	-

Isolat yang berwarna krem dengan bentuk bulat lebih banyak terdapat pada rhizosfir alang-alang dan paku resam yaitu sebanyak 7 isolat. Sedangkan pada rhizosfir sikaduduk terdapat 5 isolat dan pada rhizosfir karamunting, pimping dan *Polysticum* sp hanya terdapat 2 isolat. Isolat yang berwarna krem dengan bentuk yang tidak beraturan terdapat pada rhizosfir paku resam dengan 4 isolat, rhizosfir alang-alang dan pimping dengan 2 isolat dan masing-masing 1 isolat pada

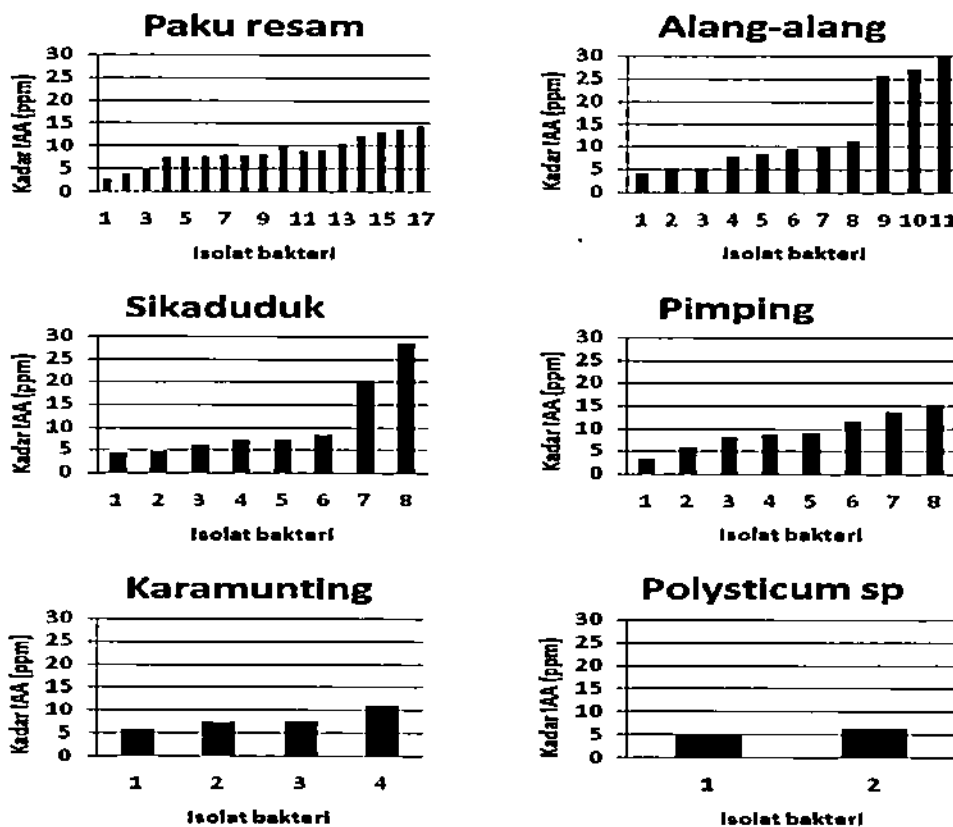
sedangkan bakteri gram positif menunjukkan penurunan jumlah di dekat rhizosfir. Hal ini diduga disebabkan karena terdapatnya perbedaan pada komponen dinding selnya. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Sumber : biologigonz.blogspot.com

Gambar 3. Perbedaan susunan dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif

Bakteri gram positif hanya mempunyai membran plasma tunggal yang dikelilingi dinding sel tebal berupa peptidoglikan. Sekitar 90 persen dari dinding sel tersebut tersusun atas peptidoglikan sedangkan sisanya berupa molekul lain bernama asam teikhoat. Bakteri gram negatif memiliki sistem membran ganda di mana membran plasmanya diselimuti oleh membran luar permeabel. Bakteri ini mempunyai dinding sel tebal berupa peptidoglikan, yang terletak di antara membran dalam dan membran luarnya. Perbedaan susunan dinding sel inilah yang diduga sebagai penyebab mengapa bakteri gram negatif lebih tahan terhadap lingkungan luar daripada bakteri gram positif (Sumarsih, 2003).



Gambar 4. Histogram kemampuan masing-masing isolat bakteri menghasilkan IAA pada berbagai rhizosfir tanaman

Jumlah isolat bakteri yang terdapat pada rhizosfir paku resam adalah 17 isolat, dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 2.8 ppm dan tertinggi 21.5 ppm. Rhizosfir alang-alang terdapat 11 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 4.2 ppm dan tertinggi 31.7 ppm. Rhizosfir sikaduduk terdapat 8 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 4.3 ppm dan tertinggi 28.4 ppm. Rhizosfir pimping terdapat 8 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 3.3 ppm dan tertinggi 15.3 ppm. Rhizosfir karamunting terdapat 4 isolat bakteri

dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 5.9 ppm dan tertinggi 11.1 ppm. Rhizosfir *Polysticum* sp terdapat 2 isolat bakteri dengan isolat bakteri terendah menghasilkan IAA sebesar 4.9 ppm dan tertinggi 6.3 ppm.

Perbedaan konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh masing-masing isolat bakteri pada rhizosfir tanaman yang berbeda diduga karena setiap tanaman mengeluarkan eksudat akar yang akan dimanfaatkan oleh mikroorganisme di dalam tanah. Menurut Lay (1994) mikroorganisme tumbuh dan berkembang biak dengan memanfaatkan berbagai bahan yang terdapat di dalam lingkungannya. Frankenberger dan Arshad (1995) menyatakan bahwa produksi IAA sangat bervariasi antar spesies dan strain dalam genera yang sama dan juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, tingkat pertumbuhan dan ketersediaan substrat seperti asam amino.

Penelitian yang sama dilakukan pada rhizosfir titonia yang tumbuh secara alami disekitar Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Andalas, kampus Limau Manis Padang oleh Agustian (2008) memperoleh isolat bakteri yang menghasilkan IAA terendah 5,62 ppm dan isolat bakteri yang menghasilkan IAA tertinggi 10,5 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi tanah masam seperti ultisol terdapat bakteri yang mampu menghasilkan IAA.

Isolat bakteri tersebut barangkali merupakan isolat spesifik pada ultisol karena bakteri tersebut mampu hidup dan berkembang biak pada kondisi tanah masam dengan kelarutan Al tinggi. Keracunan Al menyebabkan gangguan terhadap akar tanaman baik fisiologi maupun morfologinya yang akan berakibat

terhambatnya serapan hara dan air sehingga pertumbuhan tanaman terganggu dan penurunan produksi pada tanah masam (Nyakpa, *et al*, 1988). Produksi IAA oleh bakteri dapat meningkatkan perkembangan dan pembelahan sel tanaman, merangsang perkembangan akar dan memperbanyak bulu-bulu akar (Razie dan Anas, 2005) sehingga hara dan air dapat diserap oleh tanaman.

4.3.3.1. Uji Kemampuan Produksi IAA Isolat Bakteri Terpilih

Sejumlah 50 isolat bakteri yang menghasilkan IAA selanjutnya dipilih enam (6) isolat terbaik untuk melihat pertumbuhan dan kemampuan isolat rhizobakteria tersebut dalam menghasilkan IAA setiap 4 jam. Enam isolat yang terpilih dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakterisasi enam (6) isolat bakteri terpilih

Nama/Kode isolat	Warna & Bentuk koloni	Reaksi gram	IAA (ppm)
Alang-alang-11	krem, bulat	negatif	31,7
Alang-alang-10	krem, bulat	negatif	27,0
Alang-alang-9	krem, tidak beraturan	positif	25,7
Sikaduduk-7	krem, bulat	negatif	20,2
Sikaduduk-8	krem, bulat	negatif	28,4
Paku resam-17	putih, bulat	negatif	21,5

Isolat Alang-alang-11 dan Alang-alang-10 memiliki warna dan bentuk koloni krem dan bulat, merupakan bakteri gram negatif, dan IAA yang dihasilkan masing-masing sebanyak 31,7 dan 27 ppm. Isolat Alang-alang-9 memiliki warna krem dengan bentuk koloni tidak beraturan, merupakan bakteri gram positif dan IAA yang dihasilkan sebanyak 25,7 ppm. Isolat Sikaduduk-7 dan Sikaduduk-8 memiliki warna dan bentuk koloni krem dan bulat, merupakan bakteri gram negatif, IAA yang dihasilkan masing-masing sebanyak 20,2 dan 28,4 ppm. Isolat

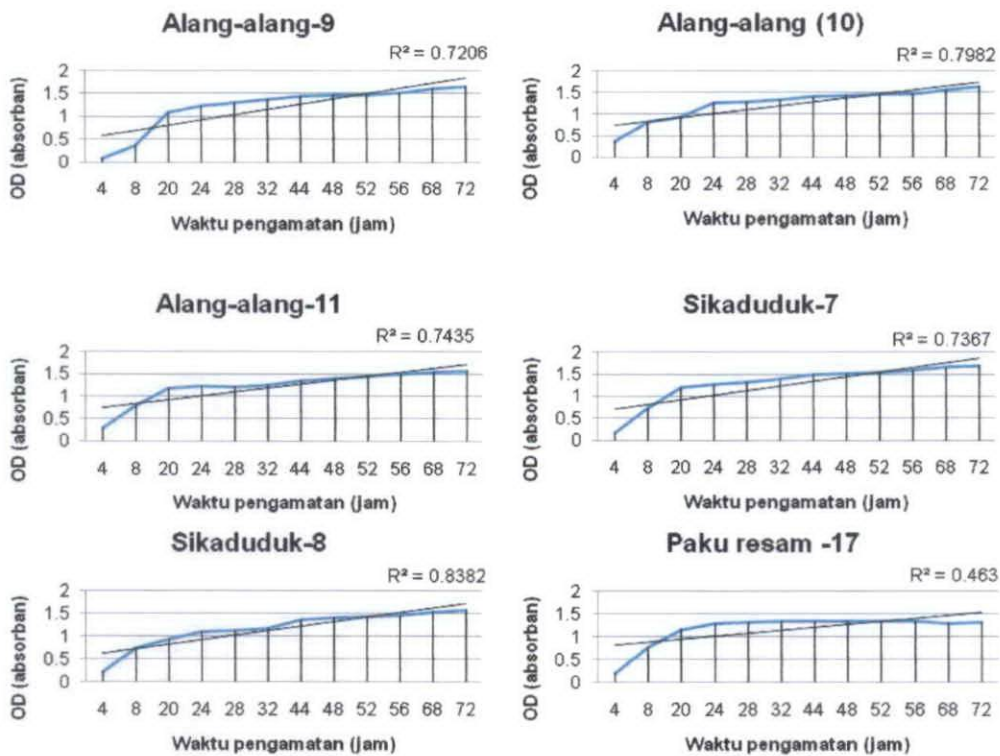
Paku resam-17 memiliki warna koloni putih dengan bentuk bulat, merupakan bakteri gram negatif dan IAA yang dihasilkan sebanyak 21,5 ppm.

Pengamatan dilakukan setiap 4 jam untuk melihat kemampuan bakteri dalam memproduksi IAA dan pengamatan dimulai pada jam ke-20. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh enam (6) isolat terpilih

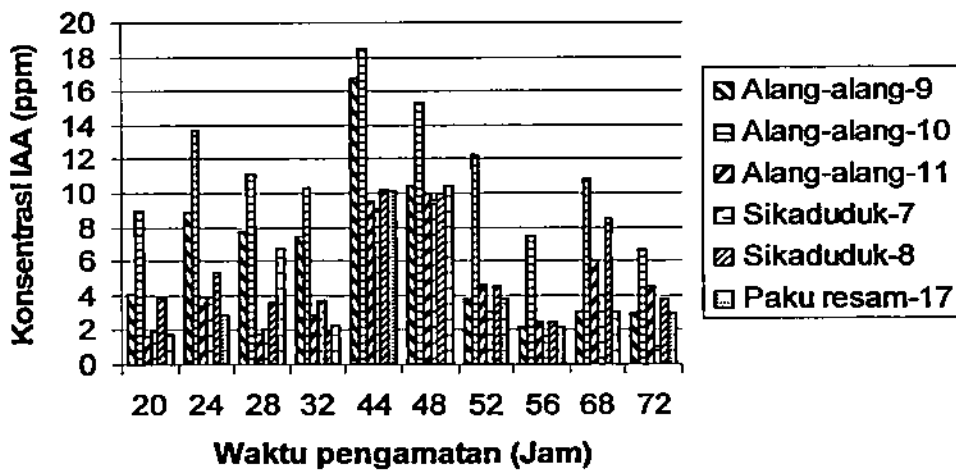
Isolat	Konsentrasi IAA (ppm)									
	20 jam	24 jam	28 jam	32 jam	44 jam	48 jam	52 jam	56 jam	68 jam	72 jam
Alang-alang-9	4.1	8.9	7.8	7.5	16.7	10.4	3.8	2.1	3.1	3
Alang-alang-10	9	13.7	11.1	10.3	18.5	15.3	12.2	7.5	10.8	6.6
Alang-alang-11	1.6	3.9	1.7	2.9	9.5	10	4.6	2.5	6	4.5
Sikaduduk-7	1.9	3.9	2	3.7	9.1	9.6	3.1	1.6	4	1
Sikaduduk-8	3.9	5.3	3.6	1.9	10.2	10	4.5	2.5	8.5	3.8
Paku resam-17	1.7	2.9	6.7	2.2	10.1	10.4	3.8	2.1	3.1	3

Isolat Alang-alang-11, Paku resam-17 dan Sikaduduk-7 mampu menghasilkan IAA sekitar 2 ppm pada jam ke-20, sedangkan isolat Sikaduduk-8 dan Alang-alang-9 menghasilkan IAA sekitar 4 ppm pada waktu yang sama, dan isolat Alang-alang-10 mampu menghasilkan IAA sampai sekitar 9 ppm. Peningkatan dalam produksi IAA terjadi pada jam ke-24. Jam ke-28 dan jam ke 32 terjadi penurunan kembali pada semua isolat kecuali isolat Paku resam-17 mengalami peningkatan sampai pada jam ke-28 yang kemudian baru mengalami penurunan pada jam ke-32.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan 6 (enam) isolat bakteri terpilih

Jika dilihat pada grafik pertumbuhan bakteri (Gambar 5) pada jam ke-20 sampai jam ke-32 merupakan fase lag dimana bakteri pada fase ini menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Peningkatan produksi IAA yang cukup tajam terjadi mulai pada jam ke-32 sampai jam ke-44 dimana pada fase ini bakteri telah beradaptasi dengan lingkungannya dan sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum yang dikenal dengan fase logaritma atau eksponensial.



Gambar 6. Histogram enam (6) isolat bakteri terpilih dalam menghasilkan IAA setiap 4 jam

Produksi IAA oleh bakteri menunjukkan grafik yang relatif tetap terjadi pada jam ke-44 sampai jam ke-48 (Gambar 6). Hal ini diduga disebabkan karena kadar nutrisi pada media telah berkurang sehingga terjadi akumulasi produk toksik yang mengganggu pembelahan sel. Kondisi yang demikian dapat mengaktifkan gen-gen tertentu untuk mengkatalis senyawa intermediet menjadi IAA (Spaepens, *et al.* 2007). Hal yang sama juga dijumpai pada penelitian yang dilakukan oleh Gusmaniar (2007) dan Kresnawaty, *et al.* (2008) dimana produksi IAA tertinggi terdapat pada waktu inkubasi selama 48 jam. Waktu tersebut merupakan fase akhir dari logaritma dan kandungan enzim-enzim yang digunakan dalam biokonversi tryptophan menjadi IAA dihasilkan cukup banyak dan aktif sejalan dengan laju pertumbuhan (Gambar 5). Saat interval jam ke-48 sampai jam ke-56 produksi IAA mulai mengalami penurunan dan pada jam ke-68 kembali terjadi kenaikan yang diduga disebabkan terjadi lisis pada sel yang telah mati. Sel-

sel mati tersebut kemungkinan menjadi nutrisi bagi sebagian sel yang masih hidup sehingga memungkinkan terjadinya pertumbuhan baru (*cryptic growth*). Selanjutnya pada jam ke-72 produksi IAA mengalami penurunan tajam yang berarti rhizobakteri memasuki fase kematian.

Berdasarkan data yang diperoleh dari percobaan kemampuan isolat menghasilkan IAA maka isolat Alang-alang-10 diketahui memiliki kemampuan menghasilkan IAA paling tinggi dibandingkan lima isolat yang lain. Oleh sebab itulah maka isolat bakteri Al 10 dipilih untuk dikarakterisasi lebih lanjut secara molekuler untuk mengetahui jenis bakterinya.

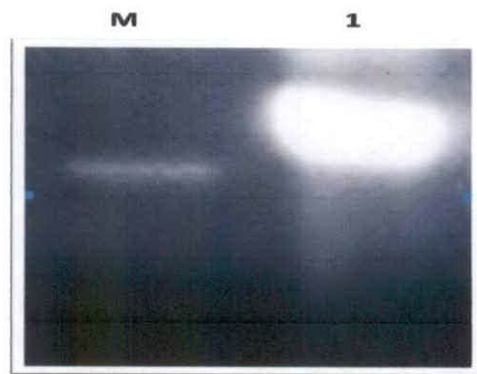
4.4. Karakterisasi Molekuler Isolat Terpilih (Alang-alang-10)

4.4.1. Isolasi DNA Genomik

Isolat bakteri Alang-alang-10 yang terpilih selanjutnya diidentifikasi secara molekuler untuk mengetahui genus atau kelompok bakterinya. Identifikasi dilakukan berdasarkan urutan 16S rRNA karena molekul rRNA mengandung urutan yang sangat konservatif secara evolusi. Menurut Richana, *et al.* (2008) urutan yang lebih beragam dari molekul 16S rRNA sangat cocok untuk membedakan suatu organisme ke dalam taksa yang lebih rendah seperti genus dan spesies. Urutan 16S rRNA ini juga menyediakan data yang secara statistik cukup valid.

Tahap awal dari identifikasi ini adalah isolasi DNA genomik rhizobakteri menggunakan metode dari Leach, *et al.* (1990). Isolasi DNA tersebut terdiri dari 5 tahap yaitu perusakan dinding sel menggunakan lisozym, pemurnian dilakukan

dengan cara lisis menggunakan SDS, pemanenan DNA dilakukan melalui sentrifugasi, dan selanjutnya pemisahan DNA dari protein dan RNA menggunakan chloroform, dan untuk pemurnian DNA digunakan alkohol. Hasil isolasi DNA kemudian dielektroforesis pada gel agarose untuk melihat kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan dengan konsentrasi gel agarose 1%. Sebagai pembanding digunakan λ DNA dengan konsentrasi 50 ng/ μ l.



Gambar 7. Elektroforegam isolasi DNA bakteri Alang-alang-10,
M = λ DNA 50, 1 = DNA rhizobakteri Alang-alang-10.

Gambar 7. menghasilkan fragmen DNA yang sangat jelas dan terang, dan hanya sedikit menghasilkan fragmen *smear* yang berarti kualitas DNA hasil isolasi ini memiliki tingkat kemurnian yang tinggi dengan bentuk DNA yang kompak dan tidak terfragmentasi. Untuk menentukan kuantitas DNA hasil isolasi dilakukan dengan cara membandingkan ketebalan fragmen DNA hasil isolasi dengan *marker* (λ DNA).

Berdasarkan Gambar 7 ketebalan fragmen DNA yang dihasilkan adalah sekitar 8 kali lebih tebal dari λ DNA 50, yang berarti konsentrasi DNA yang dihasilkan adalah sekitar 400 ng/ μ l. Fragmen atau molekul DNA yang berukuran

besar mengindikasikan konsentrasi DNA yang diperoleh juga tinggi. Menurut Jamsari (2007) semakin besar molekul DNA yang dapat diisolasi akan semakin baik karena keutuhan molekul DNA menentukan keberhasilan analisis molekuler selanjutnya.

4.4.2. Amplifikasi Gen 16S rRNA

DNA hasil isolasi yang diperoleh kemudian diamplifikasi menggunakan kombinasi primer dari sekuens gen 16S rRNA dan selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 1 %. Hasil visualisasi elektroforesis memperlihatkan adanya fragmen produk PCR dengan ukuran sekitar 1500 bp (Gambar 8) yang merupakan ukuran yang diharapkan bila menggunakan kombinasi primer 27F dan 1525R dari sekuens gen 16S rRNA. Suwanto (2004) juga menyatakan bahwa sekuens gen 16S rRNA dan 23S rRNA masing-masing memiliki panjang basa sekitar 1500 bp dan 3000 bp dan mempunyai beberapa daerah yang sekuensnya konservatif (tidak banyak berubah dari satu organisme ke organisme lainnya).

Hasil amplifikasi produk PCR yang diperoleh pada Gambar 8 memiliki kualitas dan kuantitas yang baik terlihat dari fragmen DNA yang dihasilkan cukup jelas dan spesifik pada ukuran 1500 bp maka produk tersebut selanjutnya dapat disekuensing. Sekuensing dilakukan di PT CPI (Charoen Phokphand Ind) di Jakarta. Sekuensing dilakukan dengan pembacaan satu arah (*one read direction*) menggunakan primer 1525R.

Timin (T), warna biru menunjukkan nukleotid Cytosin (C), warna hijau menunjukkan nukleotid Adenin (A), dan warna hitam menunjukkan nukleotid Guanin (G). Sedangkan simbol huruf N menandakan terjadinya *overlapping peak* nukleotid satu dengan yang lain sehingga simbol nukleotidnya menjadi N. Huruf N merupakan simbol untuk nukleotid A, C, G, dan T, hal ini menunjukkan kualitas sekuens yang dimiliki kurang baik. Kontrol terhadap simbol N untuk menentukan nukleotid dilakukan dengan memperhatikan pola-pola *peak* apa yang menempati puncak tertinggi dari jenis *peak* lainnya. Simbol huruf N yang terdapat pada hasil sekuensing bakteri ini hanya sedikit $\pm 3\%$ dari 985 basa nukleotid yang berhasil di sekuensing. Hal ini menunjukkan bahwa data sekuens yang diperoleh cukup akurat dan baik.

Analisis BLAST dilakukan pada data sekuens yang telah diurutkan dengan tujuan untuk membandingkan data sekuens yang dimiliki dengan sekuens-sekuens DNA dari berbagai penjuru dunia yang didepositkan pada database (*gen bank*) sekuens publik. Untuk keperluan tersebut maka analisis BLAST dilakukan secara online pada *website* NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*) www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Hasil yang diperoleh berdasarkan analisis BLAST dapat dilihat pada tabel berikut :

yang dimiliki dengan sekuens *DNA pada database dengan kode akses FN563421.1 (Acinetobacter genomosp. 3 partial 16S rRNA gene, strain bpoe 1350)* dimana jumlah basa DNA yang berbeda terdapat sebanyak 63 basa. Letak/posisi perbedaan sekuens DNA antara sekuen DNA yang dimiliki dengan sekuen DNA pada database dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Perbedaan sekuen yang dimiliki dengan sekuen pada database genbank NCBI

	Basa ke-	Sekuens nukleotida (Jenis Basa)		Tipe Polymorphisme
		<i>sekuen yang dimiliki</i>	<i>sekuen pada database (FN563421.1)</i>	
1	12-13	CC	AG	Substitusi
2	14	C	-	Inseri-delesi
3	49	G	A	Substitusi
4	88	G	T	Substitusi
5	100	G	T	Substitusi
6	242	C	A	Substitusi
7	469	A	-	Inseri-delesi
8	525	T	-	Inseri-delesi
9	563	T	-	Inseri-delesi
10	577	G	C	Substitusi
11	647	A	C	Substitusi
12	679	-	G	Inseri-delesi
13	680	A	C	Substitusi
14	695	G	T	Substitusi
15	718	G	T	Substitusi
16	722	G	T	Substitusi
17	731	G	T	Substitusi
18	738	C	G	Substitusi
19	740-741	CA	AC	Substitusi
20	746	A	G	Substitusi
21	765	G	T	Substitusi
22	776	C	G	Substitusi
23	780	-	T	Inseri-delesi
24	797	-	C	Inseri-delesi
25	803	-	G	Inseri-delesi
26	810	-	A	Inseri-delesi
27	818	-	A	Inseri-delesi

No.	Basa ke-	Sekuens nukleotida (Jenis Basa)		Tipe Polymorphisme
		<i>sekuen yang dimiliki</i>	<i>sekuen pada database (FN563421.1)</i>	
28	828	T	C	Substitusi
29	833-834	--	AT	Inseri-delesi
30	837-838	CT	TC	Substitusi
31	840	T	C	Substitusi
32	854	A	C	Substitusi
37	871-872	TC	AT	Substitusi
38	877	-	T	Inseri-delesi
39	879	G	C	Substitusi
40	884	-	C	Inseri-delesi
41	889	T	G	Substitusi
42	894	C	G	Substitusi
43	896-897	CG	TC	Substitusi
44	908	-	C	Inseri-delesi
45	909	T	A	Substitusi
46	915	-	C	Inseri-delesi
47	918	T	A	Substitusi
48	923	-	G	Inseri-delesi
49	926	C	G	Substitusi
50	933	-	C	Inseri-delesi
51	936	C	G	Substitusi
52	942-943	AC	CG	Substitusi
53	948-949	--	GT	Inseri-delesi
54	956	A	G	Substitusi
55	958	A	T	Substitusi

Berdasarkan Tabel 5. dapat dilihat pada basa ke berapa saja terjadi perbedaan sekuen DNA yang dimiliki dengan sekuen database genbank NCBI. Perbedaannya sekuen hanya terjadi pada satu dan dua basa DNA saja. Kesamaan sekuen DNA antara sekuen yang dimiliki dengan sekuen DNA pada genbank adalah 93% dari 952 basa yang ada. Terdapat dua tipe perbedaan antara sekuen-sekuen tersebut yaitu peristiwa insersi-delesi dan substitusi. Insersi-delesi terjadi sebanyak 21 kali (2,2%), dan substitusi terjadi sebanyak 42 kali (4,4%). Perbedaan yang terjadi disebabkan peristiwa insersi-delesi dan substitusi hanya 6,6%, menunjukkan bahwa sekuen DNA yang dimiliki memiliki kemiripan atau kesamaan yang besar terhadap sekuen DNA pada genbank NCBI.

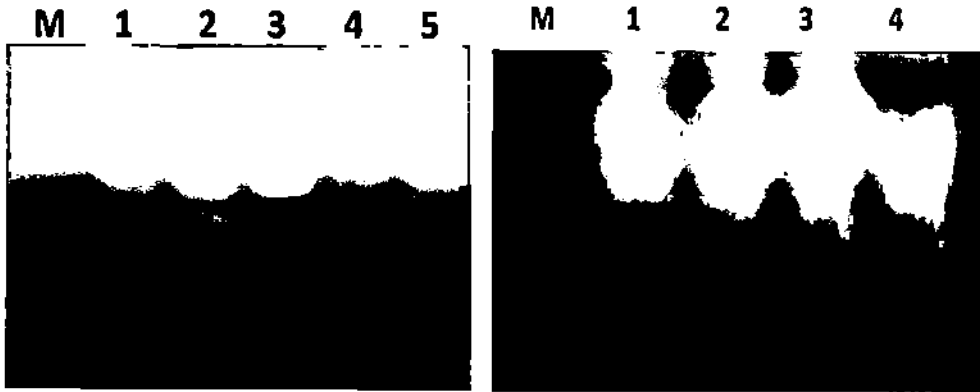
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Prashant, *et al.* (2008) menyatakan bahwa bakteri *Acinetobacter calcoaceticus* merupakan bakteri gram negatif, mampu menghasilkan IAA, siderophor, dan sebagai pelarut fosfat. Hal ini hampir sama dengan kemampuan isolat Alang-alang-10 yang merupakan bakteri gram negatif dan mampu menghasilkan IAA. Sedangkan kemampuannya dalam menghasilkan siderofor dan pelarut fosfat masih perlu diteliti lebih lanjut. Penelitian lain yang dilakukan oleh Huddedar, *et al.* (2002) menyatakan bahwa 8 strain *Acinetobacter* yang di isolasi dari rhizosfir tanaman gandum keseluruhannya mampu menghasilkan IAA.

4.5. Optimasi Preparasi Transformasi Genetik

4.5.1. Isolasi DNA genomik *Acinetobacter* (Alang-alang-10)

Preparasi DNA atau isolasi DNA merupakan hal pertama yang harus dilakukan dalam proses transformasi genetik. Metode isolasi DNA bakteri ada berbagai macam, pada penelitian ini telah dilakukan metode isolasi DNA menurut Jones and Bartlet (1990) dan menurut Leach *et al.* (1990).

Pada prinsipnya cara mengisolasi DNA genomik bakteri terdiri dari 4 tahap yaitu penumbuhan dan pemanenan sel, pemecahan sel/lisis, pemurnian DNA dan pemekatan serta pengukuran konsentrasi DNA (Suwanto, *et al.*, 2004). Perbedaan masing-masing metode isolasi DNA genomik bakteri ini terletak pada senyawa kimia yang digunakan dan lama masa inkubasi. Pemilihan metode isolasi DNA yang tepat menentukan hasil isolasi DNA. Perbedaan hasil isolasi DNA yang diperoleh pada metode Jones dan Bartlet dan Leach *et. al* dapat dilihat pada Gambar 10A dan 10B berikut :



10.A

10.B

Gambar (10A). Elektroforegam isolasi DNA bakteri metode Jones dan Bartlet (1990), M = λ DNA 50, 1-5 = DNA Alang-alang-10.
 (10B) Elektroforegam isolasi DNA bakteri metode Leach *et al.* (1990), M = λ DNA 50, 1-4 = DNA rhizobakteri Alang-alang-10

Gambar 10A. menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA metode Jones dan Bartlet (1990) pada fragmen no.1, 4 dan 5 cukup jelas dan fragmen *smear* hanya sedikit yang menunjukkan kualitas DNA yang diperoleh cukup murni. Sedangkan pada fragmen no.2 dan 3 terdapat fragmen-fragmen lain dibawah fragmen utama, diduga fragmen ini adalah kontaminan berupa RNA atau protein yang ikut terlarut bersama DNA. Hal ini dapat terjadi karena kurang teliti pada saat melakukan pemurnian DNA dengan penambahan campuran fenol dan chloroform sehingga RNA dan protein tidak terdenaturasi dengan baik. Untuk mengetahui konsentrasi DNA yang dihasilkan dilakukan dengan cara membandingkan ketebalan masing-masing fragmen dengan marker (λ DNA). Hasil pengamatannya dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Konsentrasi DNA dari isolasi DNA metode Leach *et al* (1990)

Lajur No.	Konsentrasi DNA yang diperoleh (ng/μl)
1	25
2	12,5
3	12,5
4	12,5
5	100

Tabel 7. Konsentrasi DNA dari isolasi DNA metode Jones dan Bartlet (1990)

Lajur No.	Konsentrasi DNA yang diperoleh (ng/μl)
1	400
2	500
3	600
4	500

Pada Gambar 10B. dapat dilihat hasil isolasi DNA menggunakan metode dari Leach *et al.* (1990) dengan modifikasi memperlihatkan fragmen DNA yang dihasilkan sangat jelas dan terang, meskipun terdapat sedikit fragmen *smear* yang dapat dimurnikan dengan mempresitasinya kembali menggunakan ethanol, atau bisa juga dengan penambahan RNase. Hal ini menunjukkan kualitas DNA yang dihasilkan memiliki tingkat kemurnian yang tinggi. Konsentrasi DNA yang dihasilkan pun cukup besar terlihat dari fragmen DNA yang dihasilkan lebih tebal dari λ DNA. Hasil pengamatan konsentrasi DNA dapat dilihat pada Tabel 7.

Adanya perbedaan konsentrasi DNA yang dihasilkan pada kedua metode disebabkan karena bakteri Al 10 merupakan bakteri gram negatif, dimana pada metode isolasi DNA menurut Jones and Bartlet (1990) pada saat pemipetan setelah penambahan phenol : chloroform dan dipindahkan ke tabung baru, DNA sangat sulit di pipet karena lendirnya sangat kental. Berbeda pada bakteri gram positif saat pemipetan tidak mengalami kesulitan. Hal ini disebabkan karena

dinding sel bakteri gram negatif memiliki protein dan lipid yang lebih banyak ($\pm 80\%$) dibandingkan bakteri gram positif yang lebih banyak mengandung polisakarida (30-70%) (Sumarsih, 2003).

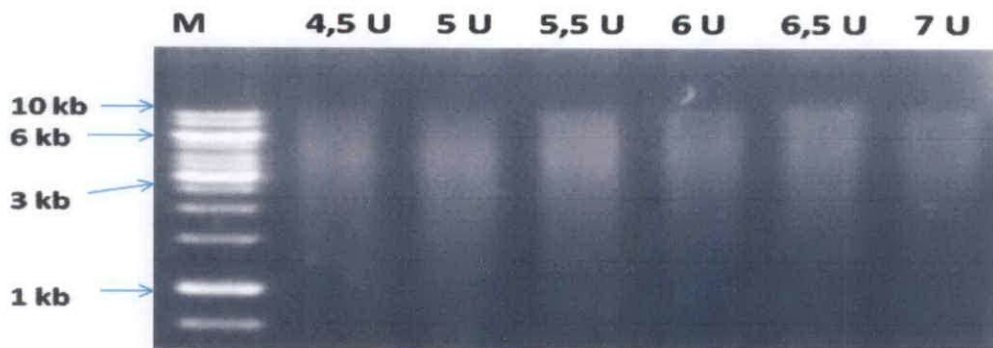
Metode dari Leach *et al.* (1990) untuk memisahkan DNA dari protein dan karbohidrat diberi perlakuan penambahan NaCl dan CTAB dimana garam berfungsi untuk menghilangkan protein dan karbohidrat karena garam dapat menyebabkan keduanya terpresipitasi, sehingga pada saat pemisahan DNA tidak mengalami kesulitan. Kemurnian dan konsentrasi DNA yang tinggi sangat menentukan keberhasilan proses selanjutnya dalam transformasi DNA.

4.5.2. Restriksi Enzimatis DNA Genomik Bakteri

DNA genomik bakteri harus dipotong menjadi fragmen-fragmen kecil untuk transformasi DNA, karena molekul DNA tersebut terlalu besar sehingga tidak dapat diinsersikan ke dalam vektor yang memiliki kapasitas daya tampung yang terbatas. Pemotongan DNA genomik ini menggunakan enzim yang disebut endonuklease restriksi. Enzim ini mendegradasi molekul DNA dengan memecah ikatan fosfodiester yang menghubungkan satu nukleotid dengan nukleotid berikutnya pada untai DNA.

Enzim restriksi yang dapat digunakan untuk memotong molekul DNA genomik bakteri adalah enzim restriksi pada *Multi Cloning Sites (MCS)* yang terdapat pada vektor plasmid *pUC18*. Salah satu enzim restriksi yang dapat digunakan untuk memotong molekul DNA genomik bakteri ini adalah *EcoRI*.

Molekul DNA genomik dipotong dengan 4,5 unit sampai 7 unit *EcoRI*. Hasil restriksi ini kemudian dielektroforesis dan dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Elektroforegam restriksi menggunakan enzim *EcoRI*, M = 1 kb

Gambar 11 menunjukkan bahwa pemotongan molekul DNA genomik menghasilkan fragmen *smear* pada masing-masing unit enzim yang berbeda. Pemotongan dengan enzim *EcoRI* pada 4,5 unit, 5 unit, 5,5 unit dan 6 unit menghasilkan potongan molekul DNA yang lebih kecil terlihat dari adanya fragmen *smear* sampai pada ukuran terkecil dari *marker*. Sedangkan pemotongan dengan enzim *EcoRI* pada 6,5 unit dan 7 unit menghasilkan potongan molekul DNA lebih besar terlihat dari adanya fragmen *smear* diatas 5000 bp.

Hal ini berarti semakin besar unit enzim restriksi yang digunakan maka mengakibatkan molekul DNA terpotong menjadi bagian-bagian kecil yang tidak dapat terlihat lagi. Banyaknya fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan molekul DNA dengan enzim restriksi sehingga tidak dapat dipisahkan menjadi pita DNA yang terpisah pada saat dielektroforesis dan terlihat *smear*. Adanya

fragmen *smear* ini karena terjadi pemotongan pada banyak tempat dengan ukuran yang relatif hampir sama dengan jarak yang tidak terlalu jauh.

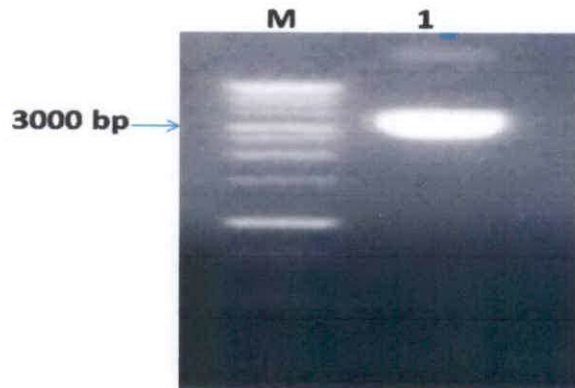
Fragmen DNA yang akan diinsersikan disesuaikan juga dengan daya tampung vektor yang digunakan, untuk vektor plasmid memiliki kapasitas ± 5000 bp. Fragmen yang berukuran 500 bp sampai 5000 bp dari 4,5 sampai 5,5 unit enzim *EcoRI* kemudian dipotong dari cetakan agarose dengan menggunakan pisau steril dan dipurifikasi dengan Wizard SV Gel and PCR Clean up System (Promega), dan disimpan pada suhu -20°C .

4.5.3. Preparasi DNA Plasmid *pUC18*

Vektor yang digunakan untuk transformasi genetik DNA ini adalah *pUC18* yang berukuran 2686 bp, gambar peta plasmid *pUC18* dapat dilihat pada Lampiran 3. Plasmid *pUC18* ini sebelum dipergunakan perlu diperbanyak terlebih dahulu di dalam *E.coli*, setelah itu baru DNA plasmid diisolasi.

Gambar 12 merupakan hasil elektroforesis isolasi DNA plasmid dengan konsentrasi yang cukup tinggi dengan ukuran kurang dari 3000 bp, yang merupakan ukuran dari plasmid *pUC18*. Kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan cukup tinggi dimana fragmen DNA terlihat cukup jelas dan terang tanpa adanya fragmen *smear*. Hasil isolasi plasmid yang demikian karena menggunakan kit untuk isolasi plasmid (Wizard plus SV Minipreps DNA purification System, Promega). Dengan menggunakan kit isolasi DNA hasil yang diperoleh lebih baik dengan tingkat kemurnian yang tinggi karena produk tersebut sudah di optimalisasi dan distandarisasi (Jamsari, 2007). Kualitas dan kuantitas

vektor yang baik sangat menentukan kemampuan vektor untuk membawa DNA asing yang akan disisipkan padanya.



Gambar 12. Elektroforegam isolasi DNA *pUC18*, M = 1 kb, 1 = DNA *pUC18*

Pemotongan DNA vektor dan DNA genomik harus menggunakan enzim restriksi yang ujung pemotongannya sama sehingga menghasilkan ujung-ujung potongan yang kompatibel berarti fragmen-fragmen DNA genomik dapat disambungkan (diligasikan) dengan DNA vektor yang sudah berbentuk linier. DNA plasmid ini direstriksi dengan enzim *EcoRI* pada suhu 37°C selama semalaman.

4.5.4. Dephosphorilasi DNA Plasmid

Pada reaksi ligasi antara fragmen DNA genomik dan DNA vektor plasmid dapat terjadi religasi atau ligasi sendiri dimana plasmid menjadi sirkuler kembali setelah dilinierkan dengan memotongnya menggunakan enzim restriksi. Hal ini dapat menurunkan efisiensi ligasi, dan untuk meningkatkan efisiensi ligasi ini diberi perlakuan dengan enzim *alkaline phosphatase* (CIAP) untuk menghilangkan

gugus fosfat dari ujung 5' pada molekul DNA yang telah terpotong (Nofiani, *et al.*, 2006). Deposphorilasi plasmid ini mengikuti prosedur dari Sambrook, *et al.* (1989) dengan beberapa modifikasi yang dapat dilihat pada Lampiran 4. Pelet hasil presipitasi DNA plasmid yang telah di deposphorilasi sangat sedikit bahkan tidak terlihat oleh mata, oleh sebab itu harus dikerjakan dengan teliti pada saat pencucian dengan etanol, biasanya DNA tersebut ada dan menempel pada dinding tabung ependorf.

4.5.5. Ligasi Vektor *pUC18* dengan Fragmen DNA

Fragmen DNA rhizobakteri yang telah dipurifikasi kemudian diligasi dengan plasmid *pUC18* yang telah didephosphorilasi menggunakan enzim T4 DNA ligase. Enzim T4 DNA ligase ini berfungsi untuk mensintesis pembentukan ikatan phosphodiester yang menghubungkan nukleotida yang satu dengan nukleotida disebelahnya. Pemotongan dengan enzim *EcoRI* menghasilkan ujung lengket atau ujung kohesif, menurut Brown (1991) bahwa ligasi ujung-ujung lengket yang komplementer lebih efisien karena ujung-ujung lengket yang sesuai dapat saling berpasangan basa dengan ikatan hidrogen untuk membentuk struktur yang relatif stabil dengan memperpanjang waktu kontak antara ujung-ujung molekul sehingga enzim dapat bekerja.

Reaksi ligasi memerlukan kontrol untuk melihat keberhasilan dephosphorilasi plasmid dengan membuat beberapa tes ligasi yaitu :

Ligasi A (DNA plasmid yang telah diphosphorilasi), Ligasi B (DNA plasmid yang telah diphosphorilasi + fragmen DNA yang akan insersikan), Ligasi C (DNA

plasmid linier yang telah direstriksi). Hasil dari reaksi ligasi ini dapat dianalisis setelah ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E.coli* DH5 α .

Hasil ligasi tidak dapat dianalisis dengan elektroforesis karena konsentrasi DNA yang terbentuk relatif sedikit. Fragmen DNA hasil restriksi dengan enzim *EcoRI* berukuran 1000 bp yang disisipkan ke dalam vektor plasmid *pUC18* berukuran 2686 bp sehingga menghasilkan plasmid rekombinan berukuran 3686 bp.

4.5.6. Pembuatan Sel Kompeten *E.coli* DH5 α dan Transformasi

Tahap selanjutnya setelah kedua molekul DNA tersebut dapat disambungkan adalah memasukkan molekul DNA rekombinan tersebut ke dalam sel inang agar dapat diperbanyak. Sel inang yang digunakan adalah *Escherichia coli* strain DH5 α . Agar sel *E.coli* ini dapat menyerap DNA asing dengan baik maka sel *E.coli* ini diberi perlakuan dengan garam kalsium klorida (CaCl_2) agar membran sel menjadi permeabel dan mudah dilewati oleh DNA plasmid

Proses masuknya molekul DNA rekombinan ke dalam sel inang disebut transformasi. Transformasi ini menggunakan metode '*heat shock*' atau kejutan panas dimana sel *E.coli* yang telah kompeten diinkubasi pada suhu 42 $^{\circ}$ C selama 2 menit setelah itu langsung ditempatkan pada suhu dingin atau batu es selama 2 menit. Perlakuan ini untuk membuka pori pada dinding sel bakteri sehingga DNA plasmid dapat masuk dan berkembang biak. Selanjutnya ditambahkan media LB atau media SOC untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dari bakteri setelah

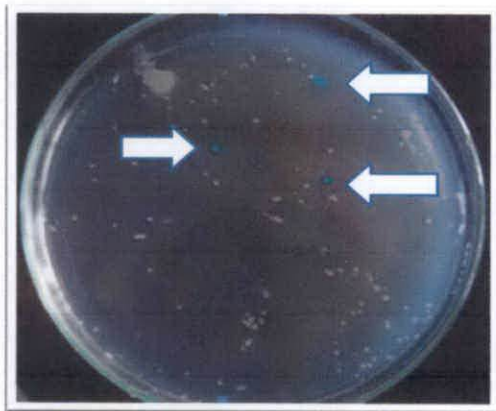
mengalami perlakuan khusus dan dishaker selama 1-2 jam agar bakteri dapat melakukan pembelahan.

Menurut Muladno (2002), ada 3 kemungkinan yang dapat terjadi dalam proses transformasi, yaitu sel kompeten tidak dapat masuk ke molekul DNA apapun, sel kompeten dapat masuk ke DNA vektor yang tidak membawa DNA rekombinan, dan sel kompeten dapat masuk ke DNA vektor yang membawa DNA rekombinan

Untuk mengetahui keberhasilan transformasi ini maka kultur tersebut ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung ampicilin, X-gal dan IPTG. Vektor *pUC18* membawa gen ampicilin menyebabkan koloni yang tumbuh bersifat resisten terhadap ampicilin. Bakteri-bakteri lain tidak dapat hidup atau sangat kecil kemungkinannya untuk dapat tumbuh pada media seleksi ini karena bakteri tersebut tidak tahan terhadap antibiotik ampicilin tersebut. Penyisipan DNA pada daerah gen *lacZ* dapat diseleksi berdasarkan warna koloni yang dihasilkan dengan adanya X-gal dan IPTG.

Hasil transformasi ditandai dengan tumbuhnya koloni biru dan putih. Koloni warna putih menandakan adanya vektor dengan DNA sisipan, sedangkan koloni warna biru menandakan tidak terdapatnya DNA sisipan pada vektor *pUC18*. Adanya koloni biru dan putih disebabkan DNA sisipan dimasukkan pada daerah pengkode gen *lacZ*. Gen *lacZ* tersebut merupakan daerah pengkode enzim β galaktosidase. Enzim ini dapat menguraikan senyawa mirip laktosa yaitu X-gal, dan adanya IPTG sebagai penginduksi dihasilkan senyawa galaktosa dan 5-bromo-4-dikloroindigo yang berwarna biru. DNA sisipan yang masuk pada daerah

pengkode gen *lacZ* menyebabkan gen tersebut akan rusak dan sebagai hasilnya tidak ada aktifitas enzim yang dikode oleh gen *lacZ*. Enzim β galaktosidase tidak diproduksi dan koloni warna putih dihasilkan (Brown, 1991).



Gambar 13. Hasil transformasi klon rekombinan dalam *E.coli* DH5 α
Koloni warna biru ditunjukkan oleh tanda panah

4.5.7. Seleksi Koleksi Rekombinan dan Analisis Efisiensi Transformasi

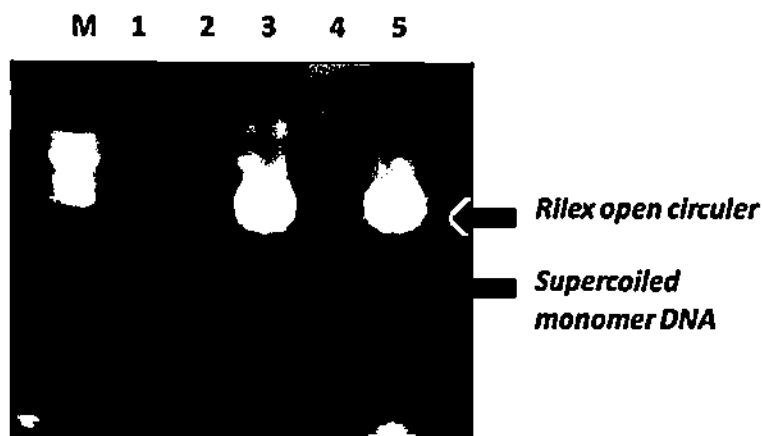
Hasil reaksi ligasi yang telah ditransformasi ke sel *E.coli* DH5 α , kemudian diseleksi dengan medium LB (Luria Bertani) padat yang telah ditambahkan ampicilin, X-Gal dan IPTG. Koloni yang tumbuh pada petridish dengan reaksi ligasi A (plasmid yang telah diphosporilasi) berupa koloni putih dan diduga itu adalah kontaminan. Koloni yang tumbuh pada reaksi ligasi B (plasmid yang telah diphosporilasi + DNA Fragmen) berupa koloni putih sebanyak 139 koloni dan 4 koloni biru. Koloni yang tumbuh pada reaksi ligasi C (plasmid yang hanya direstriksi) berupa 48 koloni putih dan 31 koloni biru.

Sambrook *et al.*(1989) menyatakan bahwa hasil transformasi dengan ligasi A, efisiensi transformasinya menurun dibanding hasil transformasi dengan ligasi

C. Sedangkan hasil transformasi dengan ligasi B akan meningkat dibanding hasil transformasi ligasi C.

4.5.8. Analisis Ukuran *Insert*

Untuk memastikan koloni yang berwarna putih membawa DNA rekombinan atau bukan maka perlu dilakukan isolasi plasmid rekombinan menggunakan metode '*quick and dirty*'. Hasil isolasi DNA plasmid ini kemudian dielektroforesis pada gel agarose pada konsentrasi agarose 1%.



Gambar 14. Elektroforegam isolasi plasmid rekombinan

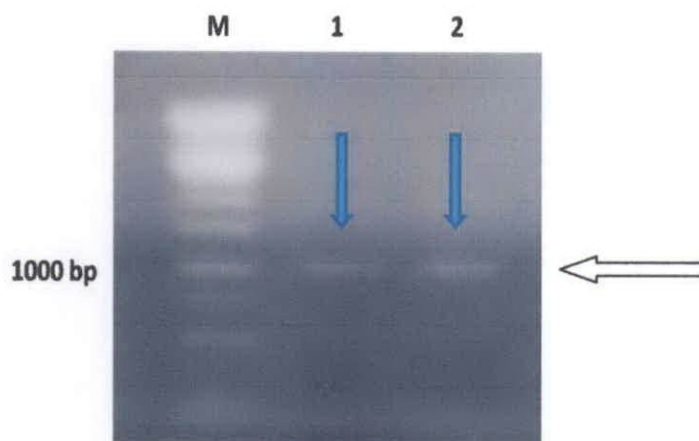
Ket gambar : M = Marker,

- 1 = plasmid rekombinan (koloni putih)
- 2 = plasmid rekombinan (koloni putih)
- 3 = plasmid non rekombinan (koloni biru)
- 4 = plasmid yang direstriksi saja (koloni biru)
- 5 = plasmid yang direstriksi saja (koloni putih)

Pada hasil elektroforesis isolasi DNA plasmid rekombinan (lajur 1 dan 2) terdapat 2 fragmen. Ini menunjukkan adanya berbagai bentuk konformasi DNA plasmid. Fragmen yang berada paling bawah adalah *super coiled monomer DNA*, sedangkan fragmen paling atas merupakan DNA plasmid dengan konformasi *rilex*

open circular (VH dan Ariani, 2004). Plasmid hasil isolasi ini tidak dapat ditentukan ukuran fragmen yang terinsersi secara tepat karena konformasi plasmid tidak linier. Metode untuk mengetahui ukuran fragmen yang terinsersi digunakan teknik PCR. Primer yang digunakan adalah primer universal yang terdapat pada plasmid *pUC18* yaitu primer M13 forward dan reverse.

Plasmid rekombinan dan non rekombinan serta plasmid yang direstriksi saja kemudian diamplifikasi menggunakan primer M13 forward dan reverse. Hasil amplifikasi PCR ini kemudian dielektroforesis, yang dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Elektroforegam amplifikasi koloni rekombinan,
M = 1 kb, 1-2 = Produk amplifikasi PCR

Gambar 15 menunjukkan hasil amplifikasi PCR pada plasmid rekombinan (koloni putih) menghasilkan fragmen dengan ukuran 1 kb (1000 bp) (lajur 1 dan 2) dan pada plasmid non rekombinan (koloni biru) dihasilkan fragmen pada

ukuran 10 kb dan 4 kb (lajur 3), sedangkan pada plasmid yang hanya direstriksi saja tidak dihasilkan fragmen (lajur 4).

Gambar 15. memperlihatkan bahwa setelah diamplifikasi ternyata fragmen DNA yang *terinsert* ke dalam vektor adalah sebesar lebih kurang 1000 bp – 103 bp (panjang primer M13) = 897 bp. Dengan adanya fragmen yang dapat diinsersikan ke dalam vektor *pUC18*, menunjukkan bahwa transformasi genetik yang dilakukan telah berhasil. Untuk percobaan selanjutnya dapat digunakan insersi fragmen yang lebih besar karena ukuran fragmen yang besar sangat menguntungkan dalam konstruksi pustaka genom nantinya karena semakin sedikit jumlah vektor rekombinan yang dibutuhkan untuk membawa genom organisme di dalam pustaka genom (Suharsono, 2002).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- a. Rhizobakteria yang mampu menghasilkan IAA tertinggi dan digunakan untuk transformasi genetik adalah isolat bakteri Alang-alang-10 dari genus bakteri *Acinetobacter*.
- b. Transformasi genetik fragmen DNA genomik bakteri Alang-alang-10 telah berhasil dilakukan dengan terinsersinya fragmen sekitar 897 bp pada vektor *pUC18*.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk menggunakan metode preparasi transformasi genetik ini untuk penyusunan pustaka DNA genomik supaya dapat menghasilkan gen IAA.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustian. 2008. Isolasi dan karakterisasi rhizobakteria penghasil IAA dari rhizosfer tithonia (*Tithonia diversifolia*). Artikel penelitian program penelitian fundamental. Universitas Andalas. Padang.
- Asghar, H.N, Zahir , Z.A., Arshad and Khaliq, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology Fertilization Soils* 35:231–237.
- Baxevanis, Andreas D. dan Ouellette, B.F., 2001. *Bioinformatics : A practical guide to analysis of genes and protein*. A John Wiley & sons, Inc.
- Brown, T.A. 1991. Pengantar cloning DNA. Yayasan Essentia Medica. Yogyakarta. 274 hal.
- Fiantis, D. 2003. Peta tematik dan layout peta Sumbar. Jurusan Tanah. Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang.
- Frankenberger, Jr. W.T. and M. Arshad, 1995. *Phytohormones in soils. Microbial Production and Function*. Marcel Dekker, Inc. New York. 503 hal.
- Gardner, F.P., Pearce, R.B, and Mitchell, R.L. diterjemahkan oleh Herawati Susilo. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Penerbit UI Press.
- Gusmaniar. 2007. Produksi IAA oleh *Rhizobium* spp, *Pseudomonas* spp, dan *Azotobacter* sp. dalam medium sintetik dan serum lateks *Hevea brasiliensis* Muels. Arg. dengan suplementasi tryptophan. Skripsi. Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta.
- Habazar, T. dan Rivai, F. 2004. *Bakteri patogenik tumbuhan*. Andalas University Press. 333 hal.
- Hardjowigeno, Sarwono. 2003. *Ilmu Tanah*. Penerbit Akademika Pressindo. Jakarta. 286 hal.
- Hakim, Nurhajati. 2006. *Pengelolaan Kesuburan Tanah Masam dengan Teknologi Pengapuran Terpadu*. Andalas University Press
- Heddy, Suwasono. 1996. *Hormon tumbuhan*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 97 hal.

- Höflich G, Wiehe W, Kühn G. 1994. Plant growth stimulation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia* 50: 897-905, 1994.
- Huddedar, S.B; Shete, A.M; Tilekar, J.N; Gore, S.D; Dhavale, D. D. and Chopade, B. A. 2002. Isolation characterization and plasmid pUPI126 mediated indole 3 acetic acid (IAA) production in *Acinetobacter* strains from rhizosphere of wheat. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 102-103: 21-39.
- Husin, E, F. 2004. Biologi tanah. Universitas Andalas. Padang.
- Jamsari. 2007. Bioteknologi pemula prinsip dasar dan aplikasi analisis molekuler. Unri Press. Pekanbaru. 193 hal.
- Lay, B.W. 1994. Analisis mikroba di Laboratorium edisi Pertama. Cetakan pertama. Jakarta. PT. Raja Grafindo Persada.
- Leeman, M., F.M. Den Ouden., J.A. Van Pelt, F.P.M. Dirkx., H. Steijl., P.A.H.M. Becker., and B. Schippers. 1996. Iron availability affect induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. 80:149-155.
- Jones dan Bartlet, 1990. Modified from experimental techniques in bacterial genetics. <http://userpages.umbc.edu/~jwolf/ml.htm>. Diakses tanggal 1 Mei 2009.
- Kloepper J. W., Beauchamp CJ. 1992. A review of issues related to measuring of plant roots by bacteria. *Canadian J Microbiol* 8:1219-1232.
- Kloepper, J. W. 1993. Plant growth-promotting rhizobacteria as biological control agents. Dalam: F.B. Metting, Jr. (ed)., *Soil Microbiology Ecology Application in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Kresnawaty, I., Andanawanih, S., Suharyanto dan Panji, T. 2008. Optimasi dan pemurnian IAA yang dihasilkan *Rhizobium* sp. dalam serum lateks dengan supremasi tryptophan dari pupuk kandang. *Menara perkebunan* 76(2), 74-82.
- Leach, J. E., White, F. W., Rhoads, M. L., and Leung, H. 1990. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 3: 238-246.

- Lestari, P, Susilowati, DN, dan Riyanti, EI. 2007. Pengaruh Hormon Asam Indol Asetat yang Dihasilkan *Azospirillum* sp. terhadap Perkembangan Akar Padi. *Jurnal AgroBiogen* 3(2):66-72.
- Lugrayasa, I.N dan Adjie, B. 2004. Laporan teknik Kebun Raya 'Eka Karya'. Proyek pelestarian penelitian dan pengembangan flora kawasan timur Indonesia. Bali
- Maira, Lusi, 2000. Indole-3 acetic acid producing rhizobacteria and its potensial to enhance growth of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). Tesis. Agriculture science in Universiti Putra Malaysia.
- Masdar. 2006. Respon pertumbuhan reproduktif tanaman padi terhadap jarak tanam dan umur bibit pada sistem intensifikasi padi (SRI). *Jurnal Akta Agrosia* Vol.9 No.2.
- Muladno. 2002. Seputar teknologi rekayasa genetika. Penerbit Pustaka Wirausaha Muda. Bogor. 123 hal.
- Nasir. 2002. Bioteknologi Molekuler Teknik Rekayasa Genetik Tanaman. Penerbit PT. Citra Aditya Bakti. Bandung. 296 hal.
- Nofiani, R., Sindumarta, M., Natalia, D. 2006. Konstruksi perpustakaan genom mini bakteri termofilik *Bacillus acidocaldarius* RP1. *Jurnal Natur Indonesia* 9 (2): 73-77.
- Normanly, J., Slovin, J.P., and Cohen, J.D. 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant physiology* 107: 323-329.
- Nyakpa, Lubis, Pulung, Amrah, Munawar, Hong, dan Hakim. 1988. Kesuburan Tanah. Penerbit Universitas Lampung. Lampung.
- Patten CL, Glick BR. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Application Environment microbiology* 68:3795-3801
- Prashant,S., Makarand,R., Bhushan,C. dan Sudhir,C. 2008. Siderophoregenic *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. *Malaysian Journal of Microbiology*. Vol 5(1) 2009, pp 6-12.
- Razie, F dan I. Anas. 2005. Potensi *Azotobacter* spp. (dari lahan pasang surut Kalimantan Selatan) dalam menghasilkan indole acetic acid (IAA). *Jurnal Tanah dan Lingkungan*. 7:35-39.

- Richana, N., Irawadi, T.T., Nur, A. dan Syamsu, K. 2008. Isolasi identifikasi bakteri penghasil xilase serta karakterisasi enzimnya. *Jurnal Agro Biogen* 4(1):24-34.
- Sambrook, J. E, Fritsch, F. dan Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cools Spring Harbor Laboratory Press, US.
- Shahib, N.M. 1990. *Dasar-dasar rekombinasi DNA*. PAU-Bioteknologi ITB. Bandung.
- Sitorus, S.R. 2002. Pemanfaatan lahan alang-alang untuk penggunaan pertanian dan transmigrasi. Makalah pada pertemuan koordinasi lintas sector. Departemen tenaga kerja dan transmigrasi. Jakarta.
- Sukardi, Retno, Hikmatullah, 1993. inventarisasi dan karakterisasi lahan alang-alang dalam PPT(ed). Pemanfaatan lahan alang-alang untuk usaha tani berkelanjutan. Prosiding. Seminar lahan alang-alang. Bogor. ,
- Sumarsih, S. 2003. Diktat kuliah mikrobiologi dasar. Jurusan Ilmu tanah Fakultas Pertanian UPN Veteran. Yogyakarta.
- Spaepen, Vanderleyden dan Remans. 2007. Indole 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Review* (1-24). Blackwell Publishing Ltd.
- Suharsono. 2002. Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar Slamet. *Jurnal Hayati*, 9 : 67-70.
- Suwanto, A., 2004. Sistemik molekuler dan keragaman genetik mikroorganisme. Pelatihan identifikasi keragaman hayati dengan teknik molekuler dalam upaya pelestarian plasma nutfah. PSIH-IPB bekerjasama dengan DITJEN DIKTI. Bogor.
- Suwanto, A., Khaeruni, A., Riupassa, 2004. Penuntun praktikum pelatihan : Identifikasi keragaman hayati dengan teknik molekuler dalam upaya pelestarian plasma nutfah. Bidang mikrobiologi. PAU-IPB bekerjasama dengan DITJEN DIKTI.
- VH, Elfi Susanti dan Ariani, Sri Retno Dwi, 2004. Kloning gen penisilin V Asilase dari *Bacillus* sp BAC4 melalui pembuatan pustaka genom. *Biodiversitas* Vol.5 No.1 Hal 1-6.
- Watanabe T., Osaki M., Yoshihara T. dan Tadano T., 1998, Distribution and chemical speciation of aluminium in the Al accumulation plant *Melastoma malabathricum* L., *Plant and Soil* 201 : 165-173.

- Wattimena, G.A. 1992. Bioteknologi tanaman. PAU-Bioteknologi IPB. Bogor. 309 hal.
- Wedhastri, S. 1999. Isolasi dan seleksi *Azotobacter* spp. penghasil faktor tumbuh dan penambat nitrogen dari tanah masam. Laporan Penelitian Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Yasmin, F., Othman, R. Saad M.S., Sijam, K. 2007. Screening for beneficial of rhizobacteria isolated from sweetpotato rhizosphere. *Biotechnology* 6(1): 49-52

Lampiran 1. Identifikasi Rhizobakteria Secara Morfologi dan Fisiologi

No	Kode Isolat	Kode Labor	Asal Tanaman	Warna & Bentuk Koloni	Uji Gram	IAA (ppm)
1	AI 1	UBCA-0001	Alang-alang	kuning, tidak beraturan	Positif	4.2
2	AI 2	UBCA-0002	Alang-alang	bening, tidak beraturan	Positif	5.2
3	AI 3	UBCA-0003	Alang-alang	krem, bulat	Negatif	5.2
4	AI 4	UBCA-0004	Alang-alang	krem, bulat	Positif	7.7
5	AI 5	UBCA-0005	Alang-alang	krem, bulat	Negatif	8.2
6	AI 6	UBCA-0006	Alang-alang	krem, bulat	Negatif	9.4
7	AI 7	UBCA-0007	Alang-alang	krem, tidak beraturan	Negatif	9.8
8	AI 8	UBCA-0008	Alang-alang	krem, bulat	Negatif	11.3
9	AI 9	UBCA-0009	Alang-alang	krem, tidak beraturan	Positif	25.7
10	AI 10	UBCA-0010	Alang-alang	krem, bulat	Negatif	27
11	AI 11	UBCA-0011	Alang-alang	krem, bulat	Negatif	31.7
12	SK 1	UBCA-0012	Sikaduduk	krem, tidak beraturan	Negatif	4.3
13	SK 2	UBCA-0013	Sikaduduk	kuning, tidak beraturan	Negatif	4.6
14	SK 3	UBCA-0014	Sikaduduk	Putih, bulat	Negatif	6
15	SK 4	UBCA-0015	Sikaduduk	krem, bulat	Negatif	7.1
16	SK 5	UBCA-0016	Sikaduduk	krem, bulat	Negatif	7.3
17	SK 6	UBCA-0017	Sikaduduk	krem, bulat	Negatif	8.3
18	SK 7	UBCA-0018	Sikaduduk	krem, bulat	Negatif	20.2
19	SK 8	UBCA-0019	Sikaduduk	krem, bulat	Negatif	28.4
20	PR 1	UBCA-0020	Paku resam	krem, tidak beraturan	Positif	2.8
21	PR 2	UBCA-0021	Paku resam	krem, tidak beraturan	Positif	3.8
22	PR 3	UBCA-0022	Paku resam	krem, bulat	Negatif	4.8
23	PR 4	UBCA-0023	Paku resam	kuning, bulat	Negatif	7.4
24	PR 5	UBCA-0024	Paku resam	putih, bulat	Positif	7.5
25	PR 6	UBCA-0025	Paku resam	krem, bulat	Positif	7.7
26	PR 7	UBCA-0026	Paku resam	kuning, bulat	Negatif	8
27	PR 8	UBCA-0027	Paku resam	krem, tidak beraturan	Positif	8
28	PR 9	UBCA-0028	Paku resam	kuning, bulat	Negatif	8.2
29	PR 10	UBCA-0029	Paku resam	krem, bulat	Positif	8.8
30	PR 11	UBCA-0030	Paku resam	krem, bulat	Positif	9
31	PR 12	UBCA-0031	Paku resam	krem, bulat	Negatif	10.4
32	PR 13	UBCA-0032	Paku resam	krem, bulat	Positif	12.3
33	PR 14	UBCA-0033	Paku resam	krem, bulat	Negatif	13.1
34	PR 15	UBCA-0034	Paku resam	putih, bulat	Negatif	13.7
35	PR 16	UBCA-0035	Paku resam	putih, bulat	Positif	14.3
36	PR 17	UBCA-0036	Paku resam	putih, bulat	Negatif	21.5
37	PM 1	UBCA-0037	Pimping	kuning, bulat	Negatif	3.3
38	PM 2	UBCA-0038	Pimping	bening, tidak beraturan	Positif	5.8
39	PM 3	UBCA-0039	Pimping	bening, tidak beraturan	Positif	8.1
40	PM 4	UBCA-0040	Pimping	krem, tidak beraturan	Positif	8.9
41	PM 5	UBCA-0041	Pimping	krem, tidak beraturan	Negatif	9
42	PM 6	UBCA-0042	Pimping	kuning, bulat	Positif	11.6
43	PM 7	UBCA-0043	Pimping	krem, bulat	Negatif	13.6
44	PM 8	UBCA-0044	Pimping	krem, bulat	Positif	15.3
45	KM 1	UBCA-0045	Karamunting	krem, bulat	Positif	5.9
46	KM 2	UBCA-0046	Karamunting	krem, tidak beraturan	Positif	7.5
47	KM 3	UBCA-0047	Karamunting	kuning, bulat	Negatif	7.6

48	KM 4	UBCA-0048	Karamunting	krem, bulat	Negatif	11.1
49	PT 1	UBCA-0045	<i>Polysticum sp</i>	krem, bulat	Positif	4.9
50	PT 2	UBCA-0046	<i>Polysticum sp</i>	krem, bulat	Positif	6.3

Keterangan : Al = alang-alang, SK = sikaduduk, PR = paku resam, PM = pimping,
 KM = karamunting, U = Unand, BC = Bacterial Collection, A = Acid
 soil (tanah masam)

Lampiran 2. Pensejajaran Sekuen DNA Alang-alang-10 dengan Clustal W 1.83

```

FN563421.1 -----GACTTCACCCCAG-TCATCGGCCACACCGTGGTAACCGCCCTCTT
FN563419.1 CGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-TCATCGGCCACACCGTGGTAACCGCCCTCTT
GQ487956.1 CGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-TCATCGGCCACACCGTGGTAACCGCCCTCTT
Alang-alang-10 -----GACTTCACCCCCCTCATCGGCCACACCGTGGTAACCGCCCTCTT
                      *****

FN563421.1 TGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA
FN563419.1 TGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA
GQ487956.1 TGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA
Alang-alang-10 TGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGGTTGACGGGCGGGTGTGTA
                *** *****

FN563421.1 CAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
FN563419.1 CAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
GQ487956.1 CAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
Alang-alang-10 CAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
                *****

FN563421.1 TCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATC
FN563419.1 TCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATC
GQ487956.1 TCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATC
Alang-alang-10 TCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATC
                *****

FN563421.1 CTATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGT
FN563419.1 CTATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGT
GQ487956.1 CTATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGT
Alang-alang-10 CTATCGCTAGGTAGCACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGT
                *****

FN563421.1 AAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCC
FN563419.1 AAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCC
GQ487956.1 AAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCC
Alang-alang-10 AAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCC
                *****

FN563421.1 TTAAAGTTCCCGACATTACTCGCTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC
FN563419.1 TTAAAGTTCCCGACATTACTCGCTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC
GQ487956.1 TTAAAGTTCCCGACATTACTCGCTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC
Alang-alang-10 TTAAAGTTCCCGACATTACTCGCTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC
                *****

FN563421.1 TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTC
FN563419.1 TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTC
GQ487956.1 TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTC
Alang-alang-10 TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTC
                *****

FN563421.1 CCG-AAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTTACTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTC-
FN563419.1 ----AAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTTACTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTC-
GQ487956.1 CCG-AAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTTACTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTC-
Alang-alang-10 CCGAAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTTACTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTC
                *****

```

```

FN563421.1      TTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT-GTGCGGGCCCCCGTCAATTC
FN563419.1      TTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT-GTGCGGGCCCCCGTCAATTC
GQ487956.1      TTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT-GTGCGGGCCCCCGTCAATTC
Alang-alang-10  TTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGGTCAATTC
*****

FN563421.1      ATTTGAGTTTTAGTCTTGGCACCCTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCG
FN563419.1      ATTTGAGTTTTAGTCTTGGCACCCTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCG
GQ487956.1      ATTTGAGTTTTAGTCTTGGCACCCTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCG
Alang-alang-10  ATTTGAGTTTTAGTCTTGGCACCCTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCG
*****

FN563421.1      CCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAG
FN563419.1      CCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAG
GQ487956.1      CCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAG
Alang-alang-10  CAACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTA-AAATCGTTTACGGCAGGGACTACCAG
* *****

FN563421.1      GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC-ATGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTGTTAGGCCAGA
FN563419.1      GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC-ATGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTGTTAGGCCAGA
GQ487956.1      GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC-ATGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTGTTAGGCCAGA
Alang-alang-10  GGTATCTAATCCGGTTGGCTCCCC-AGGCTTTCCTCACTCAACGTCAGTGTTAGGCCAGA
*****

FN563421.1      TGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGA
FN563419.1      TGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGA
GQ487956.1      TGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGA
Alang-alang-10  GGGCTGCCTTCCCCA-CGGTATTCCTCCAAAT-TCTAC-CATTTT-CCGCTAC-CCTGGA
*****

FN563421.1      ATTCTACCATCCTCTCCCACACTCTAGCTAACCAGTATCGAATGCAATTCCCAAGTTAAG
FN563419.1      ATTCTACCATCCTCTCCCACACTCTAGCTAACCAGTATCGAATGCAATTCCCAAGTTAGC
GQ487956.1      ATTCTACCATCCTCTCCCACACTCTAGCTAACCAGTATCGAATGCAATTCCCAAGTTAAG
Alang-alang-10  ATTTTACC--CCCTTTCCAAATTTTAGCTAA-CGGTTCGAA-GGAATT-CCAATTTAAC
*** *****

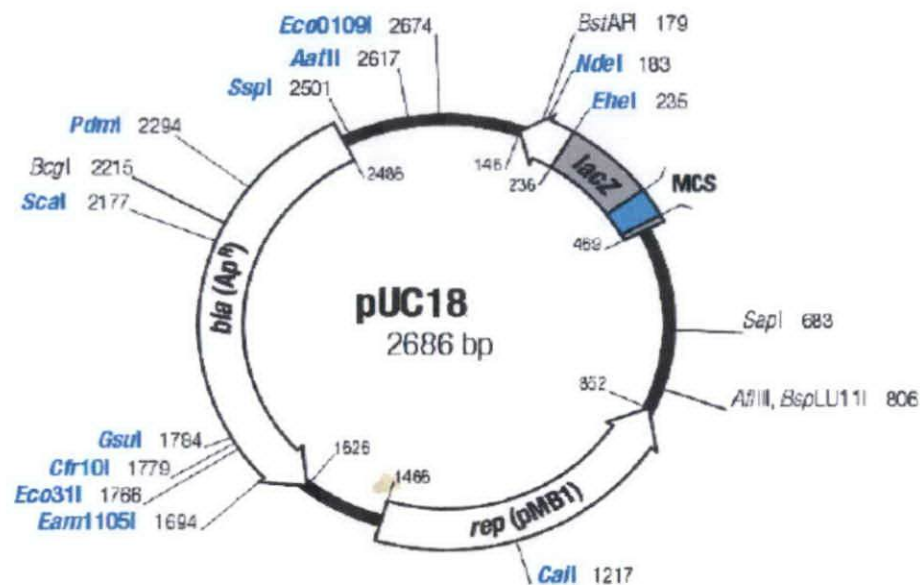
FN563421.1      CTCGGGGATTTCACATTTGACTTAATTAGCCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAAATC
FN563419.1      ATCGGGGATTTCACATTTGACTTAATTAGCCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAAATC
GQ487956.1      CTCGGGGATTTCACATTTGACTTAATTAGCCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAAATC
Alang-alang-10  CCGGGGGATTTCAT-TTTTGA-TTATTA-CCCCCTACG-GCCCTTTAACCCCA--AAATC
*****

FN563421.1      CGATTAAC
FN563419.1      CGAT----
GQ487956.1      CGAT----
Alang-alang-10  CAAATAAC
* *

```

Keterangan : * = Basa yang sama

Lampiran 3. Peta Vektor Plasmid *pUC18*



M13 pUC sequencing primer (-20), 17-mer
 399
 5' GTAA AAC GAC GGC CAG TGC CAA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC CGA GCT CGA ATT COT
 3' CATT TTG CTG CCG GTC ACG GTT CGA ACG TAC GGA CGT CCA GCT GAG ATC TCC TAG GGG CCC ATG GCT CGA GCT TAA GCA
 LacZ ← Val Val Ala Leu Ala Leu Ser Ala His Arg Cys Thr Ser Glu Leu Pro Asp Gly Pro Val Ser Ser Ser Asn Thr

AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'

TTA GTA CCA GTA TCG ACA AAG GAC 5'

Ile Met Thr Met

M13 pUC reverse sequencing primer (-26), 17-mer

Lampiran 4. Prosedur Pemberian *Alkaline Phospatase*

1. Plasmid pUC18 yang telah direstriksi kemudian dipresipitasi dengan etanol absolut (dingin) sebanyak 1 ml. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam Tris-Cl pH 8 sebanyak 40 µl.
2. Set reaksi sebagai berikut :

DNA plasmid	= 40 µl
CIAP 10x reaction buffer	= 5 µl
Diluted CIAP	= 5 µl

Untuk membuat diluted CIAP : Larutkan CIAP 1 µl dalam 1 µl CIAP reaction buffer 10x, kemudian tambahkan nuclease free water sebanyak 8 µl.

3. Setelah itu larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian tambahkan kembali diluted CIAP sebanyak 5 µl dan inkubasi lagi.
4. Sampel ini ekstrak dengan P:C:I sebanyak 500 µl, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.
5. Setelah disentrifugasi akan terbentuk 2 fasa, fasa bagian atas dipipet dengan hati-hati dan dipindahkan ke tabung ependorf yang baru. Setelah itu tambahkan ammonium asetat 7.5M pH 5.5.
6. Selanjutnya tabung dibolak-balik sampai DNA terpresipitasi, setelah itu sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.
7. Pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol absolut dan tambahkan TE pH 7.6 untuk melarutkan pellet.

Lampiran 5. Skema Penelitian

