



dapat diakses melalui <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmuo>



## Potensi Metabolik Komunitas Bakteri Endofit dan Rhizosfer Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.) Berdasarkan Analisis *Community-Level Physiological Profiles* (CLPP)

Agustina Tangapo\*

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sam Ratulangi

### KATA KUNCI

Komunitas bakteri  
CLPP  
*Ipomoea batatas*  
Endofit  
rhizosfer

### ABSTRAK

Aktivitas metabolik dari komunitas bakteri endofit dan rizosfir diukur untuk membandingkan tingkat *community-level physiological profiling* (CLPP) menggunakan *Biolog Ecoplates*. Hasil penelitian kami menunjukkan kepadatan bakteri meningkat dengan urutan: endofit < rhizosfer. Keragaman mikroba dinilai oleh kekayaan spesies, jumlah spesies dan indeks kesamaan. Aktivitas total mikroba tertinggi diamati pada mikroba rhizosfer. CLPP menunjukkan bahwa bakteri bisa memanfaatkan semua kelompok sumber karbon sebagai berikut karbohidrat, asam amino, asam karboksilat, polimer, amina/amida, dan senyawa fenolik. Karbohidrat yang paling dimanfaatkan.

### KEYWORDS

Arterial Community  
CLPP  
*Ipomoea batatas*  
Endophytes  
Rhizosphere

### ABSTRACT

Total metabolic activity of endophytic and rhizosphere of bacterial community of sweet potato was measured to compare the community-level physiological profiles (CLPP) using by *Biolog Ecoplates*. Result of our study revealed that bacterial density increased in the following order: endophytes < rhizosphere. The microbial diversity assessed by species richness, the total number of species present and species evenness. The highest total microbial activity was observed for the rhizosphere. The CLPP revealed that the bacteria could differentially utilize all the groups of carbon sources as follows carbohydrate, amino acid, carboxylic acid, polymer, amine/amide, and phenolic compound. Carbohydrate was most utilized.

### TERSEDIA ONLINE

01 Februari 2020

### Pendahuluan

Dalam komunitas, populasi satu spesies dapat saling berinteraksi dengan spesies lainnya ataupun dengan kondisi fisik dan kimia membangun suatu sistem hidup berdampingan di suatu habitat (Konopka, 2009). Komunitas bakteri dapat berubah secara temporal ataupun spasial. Variasi pada struktur komunitas bakteri dapat mempengaruhi proses-proses pada ekosistem. Analisis *community-level physiological profiling* (CLPP) merupakan pendekatan yang dapat diaplikasikan dalam mempelajari karakteristik dari komunitas bakteri. Metode ini berdasarkan pada penggunaan sumber karbon berbeda oleh bakteri. Pendekatan ini dilakukan dengan inokulasi langsung sampel dari lingkungan ke *microplate* dan keuntungan dari respons hasilnya dapat menjelaskan perbedaan dalam komunitas bakteri yang tampak dengan perkembangan warna yang menunjukkan variasi

dalam diversitas atau pola warna yang terjadi (Garland, 1997). Pendekatan ini mencerminkan aktivitas langsung dan memberikan informasi fisiologis pada pola komunitas dalam pemanfaatan substrat.

Pendekatan metode CLPP menggunakan *Biolog EcoPlate* yang terdiri dari 96 sumur yang mengandung substrat dan pewarna tetrazolium violet. Pewarna ini akan tereduksi selama ada aktivitas respirasi yang akan menyebabkan pembentukan warna. Setiap lubang yang telah diinokulasi dan terjadi pembentukan warna diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada durasi waktu tertentu. Terdapat 31 substrat dan 1 kontrol (air/A1) pada *Biolog EcoPlate* yang meliputi kelompok karbohidrat, asam amino, amina, asam karboksilat, senyawa fenolik, dan polimer dengan tiga replikasi (Tabel 1).

\*Corresponding author: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sam Ratulangi Indonesia;

Email address: [agustina.tangapo@unsrat.ac.id](mailto:agustina.tangapo@unsrat.ac.id)

Published by FMIPA UNSRAT (2020)

Tabel 1. Sumber karbon dalam EcoPlate Biolog

Baris/ Kolom	1	2	3	4
A	A1 Water	A2 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid $\gamma$ -Lactone	A4 L-Arginine
B	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E	E1 $\alpha$ -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
G	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
H	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 $\alpha$ -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine
I	H1 $\alpha$ -D-Lactose	H2 D,L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Pendekatan ini sangat berguna untuk karakterisasi diversitas fungsional bakteri dari lingkungan termasuk tanah, air, sedimen, laut dan lumpur aktif. Analisis CLPP sangat bermanfaat dalam mempelajari pola komunitas antar ekosistem yang bervariasi, ekosistem yang sama dengan heterogenitas spasial, maupun dengan variasi temporal. Penelitian Wang *et al.* (2007) menunjukkan penggunaan Biolog EcoPlate untuk mempelajari diversitas katabolik komunitas bakteri tanah dengan variasi spasial yaitu daerah restorasi, daerah tidak ditanami dan daerah pertanian serta tiga kedalaman tanah yang berbeda (0-10 cm, 20-30 cm, dan 40-50 cm). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa penggunaan substrat karbon pada kedalaman tanah 0-10 cm memiliki kesamaan untuk ketiga variasi lokasi. Pada kedalaman 20-30 cm dan 40-50 cm profil katabolik pada perlakuan restorasi dan tidak ditanami mengelompok menjadi dua kelompok, sedangkan untuk perlakuan daerah pertanian polanya tersebar.

Lapisan tanah yang menutupi permukaan akar tanaman yang masih dipengaruhi oleh aktivitas akar dikenal sebagai daerah rhizosfer. Pada daerah inilah umumnya akar tanaman berinteraksi dengan bakteri (Hardoim *et al.*, 2008). Bakteri rhizosfer

dapat masuk ke dalam jaringan tanaman membentuk bakteri endofit melalui rambut akar, zona pemanjangan, ujung akar atau pada titik munculnya akar sekunder. Komunitas mikroba yang berasosiasi dengan perakaran tanaman tidak terdistribusi dengan seragam di seluruh daerah perakaran baik di dalam jaringan sebagai endofit maupun di daerah rhizosfer. Komunitas mikroba dapat berubah secara temporal ataupun spasial. Variasi pada struktur komunitas mikroba dapat mempengaruhi proses-proses pada ekosistem. Untuk memahami peranan komunitas bakteri yang berasosiasi dengan umbi ubi jalar maka penting untuk mengetahui diversitas fungsional dari komunitas mikroorganismenya. Analisis *community-level physiological profiling* (CLPP) merupakan pendekatan yang dapat diaplikasikan dalam mempelajari karakteristik dari komunitas mikroba. Metode ini berdasarkan pada penggunaan sumber karbon berbeda oleh mikroba. Pendekatan ini dilakukan dengan inokulasi langsung sampel dari lingkungan ke *microplate* dan keuntungan dari respons hasilnya dapat menjelaskan perbedaan dalam komunitas mikroba yang tampak dengan perkembangan warna yang menunjukkan variasi dalam diversitas atau pola warna yang terjadi (Garland, 1997). Pendekatan ini mencerminkan aktivitas langsung dan memberikan informasi fisiologis pada pola komunitas dalam pemanfaatan substrat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kelimpahan dan aktivitas metabolik mikroorganisme yang berasosiasi dengan akar dari ubi jalar baik sebagai endofit maupun rhizosfer.

#### Material dan Metode Penelitian

##### Analisis Profil Fisiologi Tingkat Komunitas (*Community-level physiological profiling*/CLPP)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah dan akar tanaman ubi jalar varietas cilembu. Analisis CLPP dilakukan untuk setiap sampel endofit dan rhizosfer dengan menggunakan Biolog<sup>TM</sup> EcoPlates (Biolog, Inc., Hayward, California, USA). Sebanyak 10 gram tanah rhizosfer dimasukkan ke dalam 90 mL *Phosphate Buffer Saline* (PBS) steril hingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Sebanyak 1 mL suspensi dari pengenceran  $10^{-1}$  dimasukkan ke dalam 9 mL PBS hingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ , dilakukan sampai pengenceran  $10^{-3}$ . Suspensi dari pengenceran  $10^{-3}$  diinokulasikan sebanyak 150  $\mu$ L ke dalam setiap sumur pada EcoPlate. Analisis CLPP untuk endofit dilakukan dengan memasukkan 10 gram sampel yang telah disterilisasi permukaan ke dalam 90 mL PBS dan dilakukan pengenceran berseri. Suspensi dari pengenceran  $10^{-2}$  diinokulasikan sebanyak 150  $\mu$ L ke dalam setiap sumur pada EcoPlate. Selanjutnya EcoPlate diinkubasi pada suhu ruang dan konsidi gelap selama 120 jam (Classen *et al.*, 2006).

##### Analisis Data

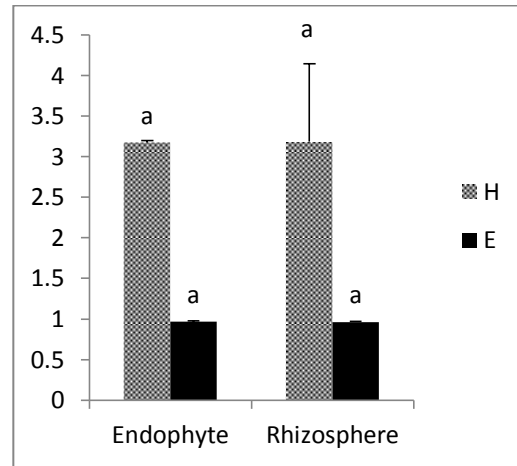
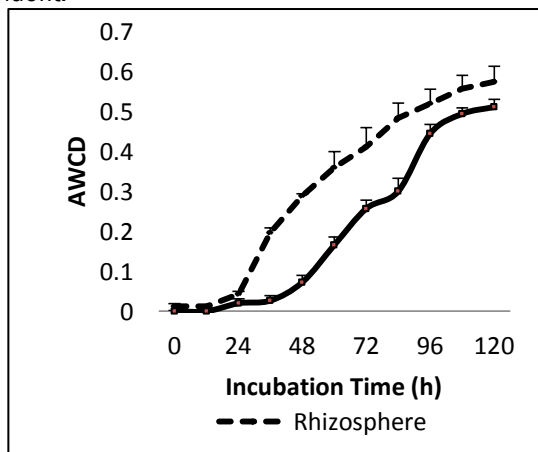
Pengukuran absorbansi EcoPlate dilakukan setiap 12 jam dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 590 dan 750 nm. Nilai *optical*

density (OD) akhir yang digunakan adalah nilai OD pada pembacaan 590 (pembentukan warna dan turbiditas) dikurangi pembacaan pada 750 nm (turbiditas saja) setelah dikoreksi terhadap nilai absorbansi pada sumur kontrol (blanko/A1). Nilai OD negatif atau kurang dari 0,06 diset menjadi nol (Classen et al., 2006).

Total aktivitas metabolik populasi mikroorganisme ditunjukkan dengan *Average Well Color Development* (AWCD). Nilai AWCD dihitung dengan rumus:  $AWCD = \frac{\sum(C-R)}{31}$ , dengan C=absorbansi pada sumur yang mengandung sumber karbon, R=absorbansi pada sumur kontrol. Analisis dilakukan berdasarkan penggunaan dari seluruh individu substrat dan penggunaan kelompok substrat (karbohidrat, asam karboksilat, asam amino, amina dan amida, polimer, dan senyawa fenolik). Nilai indeks keanekaragaman dihitung dengan rumus:  $H = \frac{\sum(P_i \times \ln P_i)}{\ln S}$  dengan  $P_i$  merupakan proporsi nilai OD akhir untuk setiap sumur. Nilai indeks kemerataan dihitung dengan rumus:  $E = H/\ln S$ , dengan S merupakan *substrate richness*, yaitu jumlah sumber karbon yang digunakan oleh komunitas mikroba (Deng et al., 2011).

**Hasil dan Pembahasan**

Analisis total aktivitas metabolik mikroba dinyatakan dalam AWCD (*Average Well Color Development*) yang menunjukkan laju penggunaan substrat atau rata-rata pembentukan warna dari tiap sumur pada *Biolog™ EcoPlate*. Laju penggunaan substrat dari komunitas mikroba pada rhizosfer (0,013-0,57) lebih tinggi dibandingkan dengan mikroba endofit (0-0,51) (Gambar 1). Selanjutnya, waktu yang dibutuhkan untuk menginisiasi aktivitas enzimatik oleh mikroorganisme endofit (24-36 jam) lebih lama dibandingkan mikroorganisme rizofir (0-12 jam). Nilai AWCD naik secara lambat pada 24 jam pertama dan selanjutnya meningkat dengan cepat dan mencapai nilai absorbansi maksimum pada masa inkubasi 120 jam. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas metabolik dan potensi penggunaan dari sumber karbon yang berbeda pada mikroorganisme rhizosfer lebih tinggi dibandingkan endofit.

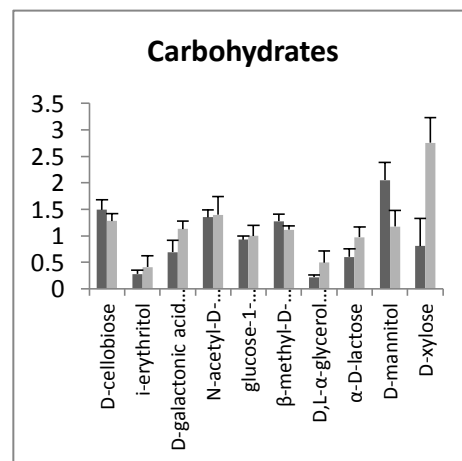


Gambar 1. Total aktivitas metabolik

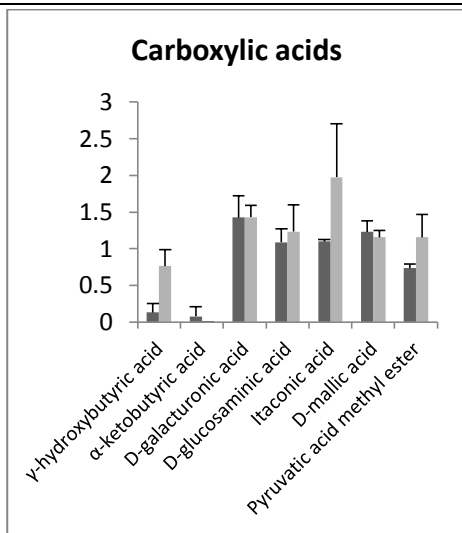
mikroorganisme yang terkait dengan akar (endofit dan rhizosfer) yang dinyatakan sebagai *average well color development* (AWCD) pada ubi jalar (Kiri). Nilai indeks Shannon (H) dan Evenness (E) substrat yang digunakan pada *Biolog™ EcoPlate* (Kanan).

Berdasarkan pada Gambar 1, nilai indeks keanekaragaman (H) dan kemerataan (E) penggunaan substrat dari komunitas endofit dan rhizosfer tidak berbeda nyata ( $P < 0.05$ ). Hal ini menunjukkan rata-rata substrat yang digunakan oleh komunitas mikroba tidak berbeda antara endofit ( $3,17 \pm 0,97$ ) dan rhizosfer ( $3,18 \pm 0,96$ ). Nilai indeks kemerataan (E) menunjukkan bahwa tingkat aktivitas katabolisme terhadap 31 karbon relatif seragam namun tidak mempertimbangkan jenis sumber karbon yang digunakan.

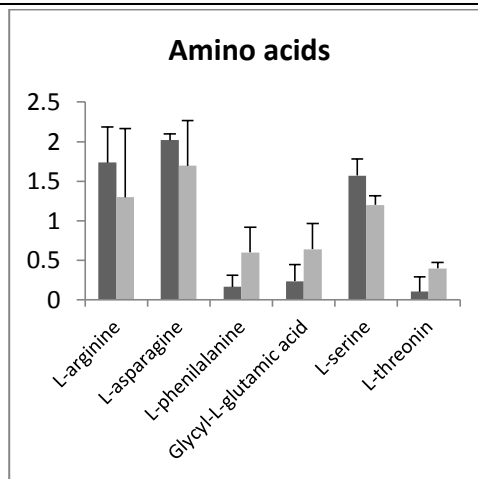
Analisis profil fisiologi komunitas mikroba merupakan karakterisasi pola sidik jari metabolik dari komunitas mikroba yang merupakan pendekatan untuk mempelajari karakterisasi komunitas mikroba dengan membedakan kapabilitas metabolik dan diversitas fungsional komunitas mikroba. *Biolog™ EcoPlate* merupakan teknik untuk mempelajari profil fisiologi komunitas mikroba berdasarkan penggunaan substrat. *EcoPlate* terdiri dari 31 jenis substrat karbon yang terbagi dalam kelompok substrat karbohidrat, polimer, asam karboksilat, asam amino, amina/amida, dan senyawa fenolik.



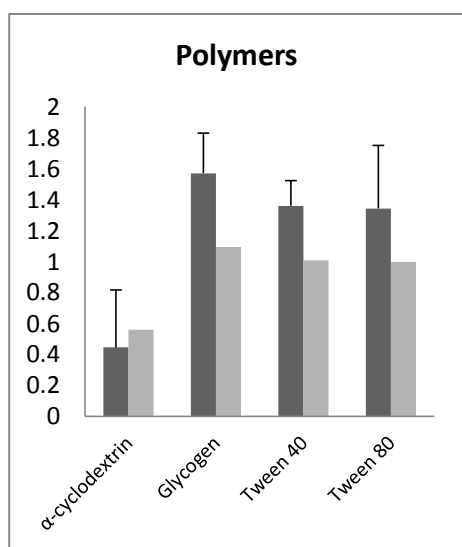
a



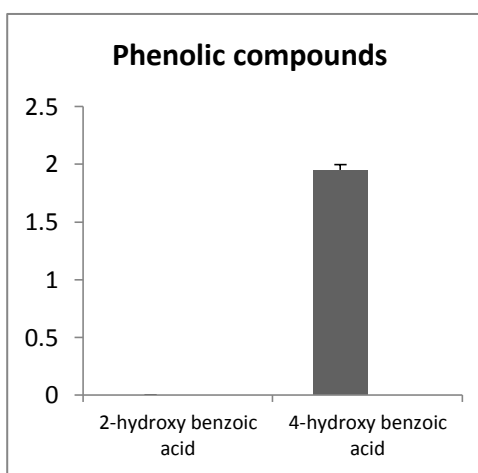
b.



e



c

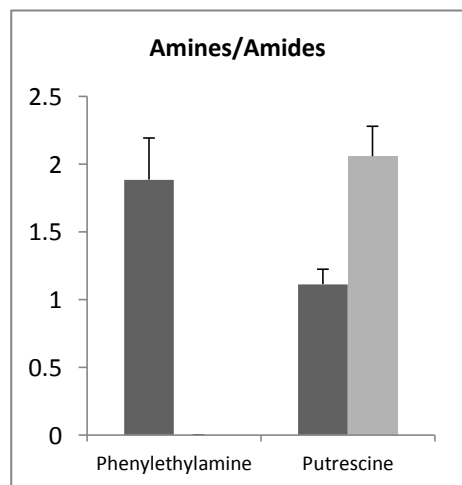


f

Gambar 2 (a,b,c,d,e,f). Grafik penggunaan substrat oleh komunitas endofit dan rhizosfer.

■ = rhizosfer

□ = endofit



d

Analisis CLPP untuk penggunaan seluruh individu substrat dapat dilihat pada Gambar 2. Komunitas mikroba rhizosfer dapat menggunakan 30 sumber karbon dari total 31 sumber karbon. Satu sumber karbon dari kelompok senyawa fenolik yaitu *2-hydroxy benzoic acid* tidak digunakan, sedangkan untuk komunitas mikroba endofit, dari total 31 sumber karbon, dapat menggunakan 27 sumber karbon. Empat substrat yang tidak digunakan oleh mikroba endofit adalah  $\alpha$ -ketobutyric acid (asam karboksilat), phenylethylamine (amina/amida), 2-hydroxy benzoic acid dan 4-hydroxy benzoic acid (senyawa fenolik).

Secara umum penggunaan substrat individu oleh komunitas mikroba rhizosfer dan endofit lebih tinggi pada kelompok karbohidrat. Mikroba endofit dengan penggunaan substrat tertinggi pada D-xylose ( $2,75 \pm 0,4763$ ) sedangkan mikroba rhizosfer pada substrat D-mannitol ( $2,05 \pm 0,3345$ ). karbohidrat yang digunakan sebagai sumber karbon dalam Biolog-EcoPlate sebagian besar merupakan derivat

dari senyawa penyusun dinding sel tanaman. Penggunaan D-cellobiose melibatkan enzim selobiose, penggunaan D-galactonic acid  $\gamma$ -lactone melibatkan enzim D-galaktono- $\gamma$ -laktone, penggunaan  $\beta$ -methyl-D-glucoside melibatkan enzim  $\beta$ -D-glukosida glukohidrolase dan  $\beta$ -glukosidase, penggunaan D,L- $\alpha$ -glycerol phosphate melibatkan enzim gliserol-3-fosfatase, penggunaan D-xylose melibatkan enzim xilosa melibatkan enzim xilosa isomerase dan xilub kinase (Caspi et al., 2014).

Penggunaan asam karboksilat pada oleh komunitas mikroba tidak berbeda, kecuali  $\alpha$ -ketobutyric acid yang tidak digunakan oleh mikroba endofit. Asam karboksilat bersama-sama dengan amonia merupakan hasil degradasi dari asam amino. Substrat D-glucosaminic acid, Itaconic acid, D-galacturonic acid dan D-mallic acid merupakan substrat yang dari kelompok asam karboksilat yang digunakan dengan baik oleh kedua komunitas mikroba dengan nilai rata-rata diatas 1. Substrat D-glucosaminic acid merupakan komponen dari lipopolisakarida dinding sel bakteri (Pezzotti et al., 2005). Penggunaan substrat ini melibatkan enzim D-glucosaminic acid dehidratase. Mikroba yang dikenal memiliki enzim D-glucosaminic acid dehidratase adalah *Pseudomonas fluorescens* dan *Agrobacterium radiobacter* (Caspi et al., 2014). D-mallic acid (asam malat) merupakan salah satu komponen eksudat akar. sekresi asam malat oleh akar tanaman pisang menarik *Bacillus amyloliquefaciens* untuk membentuk biofilm pada permukaan akar sehingga mampu meningkatkan pertahanan tanaman pisang terhadap serangan patogen (Yuan et al., 2015).

Penggunaan substrat kelompok amina/amida, dari kedua komunitas menggunakan dengan baik substrat putrescine. Substrat putrescine merupakan senyawa poliamin bermuatan positif yang terdapat pada semua makhluk hidup yang berfungsi dalam pengikatan asam nukleat, stabilisasi membran dan stimulasi enzim sehingga dioerlukan untuk pertumbuhan yang optimal. Penggunaan asam amino L-arginine, L-asparagin dan L-serin digunakan dengan baik oleh kedua komunitas mikroba. Penggunaan asam amino L-arginine melibatkan arginase, ornitin aminotransferase dan arginin suksiniltransferase. Penggunaan L-asparagine melibatkan enzim asparaginase. Penggunaan L-serin melibatkan enzim L-serin ammonia-liase, serta deaminase, L-serin deaminase dan L-serin dehidratase (Caspi et al., 2014).

### Kesimpulan

Aktivitas total mikroba komunitas mikroba rhizosfer lebih tinggi dibandingkan dengan komunitas mikroba endofit. Analisis CLPP menunjukkan bahwa bakteri endofit dan rhizosfer ubi jalar dapat memanfaatkan semua kelompok sumber karbon sebagai berikut karbohidrat, asam amino, asam karboksilat, polimer, amina/amida, dan senyawa fenolik. Karbohidrat yang paling dimanfaatkan, pada mikroba endofit yaitu D-xylose

( $2,75 \pm 0,4763$ ), sedangkan mikroba rhizosfer pada substrat D-mannitol ( $2,05 \pm 0,3345$ ).

### Daftar Pustaka

- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foesrster, H., Fulcher, C.A., Holand, T.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L.A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D.S., Weerasinghe, D., Zang, P., dan Karp., P.D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acid Research*. **2014**, 42, 459-471.
- Classen, A.T., Boyle, S.I., Haskins, K.E., Overby, S.T., dan Hart, S.C. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **2006**, 44, 319-328.
- Deng, H., Ge, L., Xu, T., Zhang, M., Wang, X., Zhang, Y., dan Peng, H. Analysis of the Metabolic Utilization of Carbon Sources and Potential Functional Diversity of the Bacterial Community in Lab-Scale Horizontal Subsurface-Flow Constructed Wetlands. *J. Environ.Qual.* **2011**, 40, 1730-1736.
- Garland, J.L. Analysis and interpretation of community-level profiles in microbial ecology, *FEMS Microbiology Ecology*. **1997**, 24, 289-300.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., dan van Elsas, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth, *Trends in Microbiology*. **2008**, 16, 463-471.
- Konopka, A. What is microbial community ecology, *The International Society for Microbial Ecology*. **2009**, 3, 1223 - 1230.
- Pezzotti, F., Therisod, H., dan Therisod, M. Enzymatic synthesis of D-glucosaminic acid from D-glucosamine, *Carbohydrate Research*. **2005**, 340, 139-141.
- Wang, G. H., Jin, J., Chen, X. L., Liu, J. D., Liu, X. B., dan Herbert, S. J. Biomass and catabolic diversity of microbial communities with long-term restoration, bare fallow and cropping history in Chinese Mollisols, *Plant, Soil and Environment*. **2007**, 53, 177 - 185.
- Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J.M., dan Shen, Q. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6, *Scientific Reports*. **2015**, 5.