

Isolasi dan Identifikasi *Agrobacterium tumefaciens* dari Tanaman Wortel (*Daucus carota* L.)

YOLANDA HASSIAN MANALU
I GEDE PUTU WIRAWAN*)
I GEDE KETUT SUSRAMA

Program Study Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana

*) Corresponding author at: Jl. PB. Sudirman Denpasar 80362 Bali

*) E-mail: putu_wirawan@unud.ac.id

ABSTRACT

Isolation and Identification of *Agrobacterium tumefaciens* from Carrots (*Daucus carota* L.)

Agrobacterium tumefaciens is a plant pathogenic bacterium that is widely used as a vector for inserting foreign genes into a plant chromosome to produce a transgenic plant. This bacterium cause a disease namely crown gall in dicotyledonous plants. This study is aim to isolate *A. tumefaciens* from local carrot (*Daucus carota* L.) by using some method such as selection media, characterization of the bacteria, and confirm by Koch's postulates. The result of this study determined that carrot's root taken from Bedugul area which showed crown gall symptom, an *A. tumefaciens* due to its characteristics e.g. shape of colonies, color, and growth of the bacteria in AB minimal medium that was a specific for *A. tumefaciens*. By using the Koch's postulates test showed that the isolated caused convex gall on the surface of carrot slice. DNA of isolated bacterium successfully electroforeted through agarose gel electrophoresis. These results showed that the bacteria associated with carrot was *A. tumefaciens*.

Keywords : *A. tumefaciens*, AB medium, Carrot, LB medium, Crown gall

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Tanaman hortikultura yang tidak kalah penting dalam memenuhi pangan manusia adalah wortel. Wortel (*Daucus carota* L.) merupakan tanaman sayuran umbi semusim berbentuk semak. Sayuran ini dapat tumbuh sepanjang tahun, musim hujan, maupun kemarau. Menurut data Badan Pusat Statistik tahun 2011, Jawa Tengah merupakan sentra produksi wortel terbesar di Indonesia dengan total produksi 143.424 ton, dengan luas panen 11.383 ha, dan produktivitas 12,60 ton/ha. Di Indonesia, produktivitas wortel masih rendah, yakni rata-rata 20-25 ton/ha. Di Amerika dan Eropa, produktivitas wortel dapat mencapai kisaran 30-35 ton/ha (Cahyono 2002).

Era transformasi genetik sekarang ini, peran *Agrobacterium* sangat besar dalam menghasilkan tanaman yang dimodifikasi untuk mendapatkan sifat yang diinginkan. Peran *Agrobacterium* dalam hal ini ialah sebagai pembawa gen (Vektor) yang diinginkan. *Agrobacterium tumefaciens* merupakan bakteri aerob obligat gram negatif yang habitat alaminya di dalam tanah. Bakteri ini banyak menyebabkan

penyakit crown gall (tumor) pada tanaman dikotil. Bakteri ini menginfeksi melalui bagian yang luka pada batang tanaman dan mengakibatkan tumor pada daerah sekitar akar dan batang tanaman. Kemampuannya dalam menyebabkan penyakit ini berhubungan dengan gen penginduksi tumor yang ada pada plasmid (Ti) yang dijumpai dalam bakteri tersebut. Dalam sel tumor yang terbentuk terkandung enzim-enzim yang tidak terdapat pada tanaman normal, karena enzim tersebut hanya dihasilkan oleh sel *Agrobacterium*. Enzim-enzim tersebut menghasilkan suatu senyawa gula spesifik yang dinamakan opin.

A. tumefaciens terlebih dahulu melakukan pelekatan pada permukaan sel tanaman dengan membentuk mikrofibril yang menyebabkan tanaman akan mengeluarkan senyawa fenolik yaitu *asetosiringone* sebagai respon sinyal. Sinyal tersebut mengaktifkan *virA* yang merupakan protein kinase untuk mengaktifkan *virG* dan memfosforilasinya menjadi *virG-P*. Dengan aktifnya *virG-P* ini akan mengaktifkan gen-gen *vir* lainnya untuk mulai bersifat virulen dan melakukan transfer *VirD* untuk memotong situs spesifik pada Ti plasmid, pada sisi kiri dan kanannya sehingga melepaskan T-DNA yang akan ditransfer dari bakteri ke sel tanaman. T-DNA utas tunggal akan diikat oleh protein *VirE* yang merupakan single strand binding protein sehingga terlindung dari degradasi. Bersamaan dengan itu, protein *virB* membentuk saluran trans membran yang menghubungkan sel *A. tumefaciens* dan sel tanaman sehingga T-DNA dapat masuk ke sel tanaman.

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang diambil dalam penelitian ini adalah bagaimana mengisolasi dan mengidentifikasi *A. tumefaciens* dari tanaman wortel yang menunjukkan gejala Crown gall.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi *A. tumefaciens* pada tanaman wortel yang diambil dari Bedugul.
2. Untuk mengetahui apakah bakteri yang diisolasi dapat menginfeksi tanaman wortel dengan menggunakan uji Postulat Koch.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi pada perkembangan ilmu pengetahuan terutama dalam bidang bioteknologi pertanian.
2. Dapat diketahui identifikasi penyebab infeksi *A. tumefaciens* pada tanaman wortel.
3. Sebagai bahan informasi untuk penelitian selanjutnya.

1.5 *Hipotesis penelitian*

Hipotesis dari penelitian ini adalah *A. tumefaciens* dari wortel dapat diisolasi dan diidentifikasi.

2. **Metode Penelitian**

2.1 *Tempat dan Waktu Penelitian*

Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler, Universitas Udayana, Denpasar. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Juli 2013 sampai dengan bulan Januari 2014.

2.2 *Bahan dan Alat*

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian berupa Aquadest, trypton, yeast extract, NaCl, 1 N NaOH, alkohol 70%, agar swallow, gel agarosa, buffer TAE, DNA NucleoSpin Tissue, Loading buffer dan Etidium bromida. Alat yang dipakai *laminar air flow*, pinset, cawan petri, tusuk gigi, jarum ose, gelas ukur, erlenmeyer, *shaker incubator*, sentrifuse berpendingin, refrigador, tabung mikro, autoklaf, pipet mikro, timbangan digital, sarung tangan, gunting, kertas para film, *deep freezer*, kamera, microwave, perangkat elektroforesis dan gel doc.

2.3 *Pengambilan Sampel Tanaman*

Sampel Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian tanaman wortel yang menunjukkan gejala gall. Digunakan tiga sampel yang diambil dari Bedugul. Gall dicuci bersih dengan air steril, lalu direndam dengan menggunakan alkohol 70% selama 15 menit. Selanjutnya gall di potong kecil- kecil untuk di kultur pada media LB.

2.4 **Pelaksana Penelitian**

2.4.1 *Pembuatan Media Luria Bertani (LB)*

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media LB (Luria Bertani). Media LB dibuat dengan mencampurkan yeast extract 5 gram, NaCl 5 gram, tryptone 10 gram, dan 1N NaOH dalam 1000 ml aquades. Larutan kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan disimpan di dalam freezer pada suhu -20°C.

2.4.2 *Kultur A. tumefaciens*

Kultur tanaman wortel yang terinfeksi *A. tumefaciens* ditumbuhkan pada media LB padat selama 2 hari simpan di dalam inkubator pada suhu 28°C. Kemudian disubkultur pada media LB padat baru, dan disimpan di dalam inkubator pada suhu 28°C selama 24 jam. Koloni tunggal bakteri diambil dari cawan petri dan ditumbuhkan pada 3 ml media LB cair, dan diinkubasi pada suhu 28°C dalam keadaan gelap selama satu malam dengan penggoyangan 150 rpm.

2.4.3 *Media Seleksi A. tumefaciens*

Kultur sel bakteri *A. tumefaciens* dimulai dengan menumbuhkan bakteri dalam media LB padat selama 24 jam dan disimpan di dalam inkubator dengan suhu 28°C. Bakteri yang tumbuh diamati kemudian diseleksi secara visual. Sel di-suspensi pada media seleksi AB (3 g K₂HPO₄ + 1 g NaH₂PO₄ + 0.3 g MgSO₄ 7H₂O + 0.15 g KCL + 0.01 g CaCl₂ + 2.5 mg FeSO₄ 7H₂O + 5 g glucosa). Kultur pada media seleksi diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu 28°C dengan fotoperiodisitas cahaya 16 jam terang/8 jam gelap dan dibiarkan tumbuh selama 24 jam. Sel dipanen dan disuspensikan dalam media inokulasi padat.

2.4.4 Isolasi Total DNA

Sebanyak 3 ml kultur bakteri hasil inkubasi dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. lalu supernatnya dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan penambahan 200 µl buffer T1. Sebanyak 25 µl proteinase K yang baru dibuat dan ditambahkan 200 µl buffer T3. Tabung eppendorf tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 70°C selama 10-15 menit. Sebanyak 210 µl etanol 96% ditambahkan ke dalam campuran, kemudian di vortex selama 10 detik. Selanjutnya NucleoSpin Tissue Column ditempatkan pada Collection Tube. Setelah itu sampel dituangkan ke dalam column, kemudian tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit dan kemudian buang cairan yang di collection tube. Selanjutnya taruh lagi column pada collection tube ulangi lagi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4°C. Sebanyak 500 µl buffer BW ditambahkan ke dalam campuran. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 2 menit. Cairan yang ada pada collection tube dibuang dan column ditempatkan lagi pada collection tube.

Sebanyak 600 µl buffer B5 ditambahkan dalam campuran column, selanjutnya tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 2 menit. Cairan yang ada di collection tube dibuang dan column diletakan lagi pada collection tube yang baru, lalu tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 2 menit. Selanjutnya NucleoSpin Tissue column diletakan pada 1,5 ml eppendorf tube dan ditambahkan 100 µl prewarmed buffer BE. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 2 menit. Cairan yang keluar dari column merupakan cairan DNA.

2.4.5 Uji Postulat Koch

Hasil dari kultur bakteri pada media AB, diinokulasi kembali ke media LB, dan diinokulasi pada kedua sisi irisan wortel (*Daucus carota* L) setebal 1,0 x 1,5 cm dengan menggunakan metode tusuk gigi. Irisan yang diinokulasi, diinkubasi pada suhu 27°C dalam sebuah wadah yang ditutup dengan plastik yang lembab. Kemudian amati pertumbuhan pembentukan gall pada permukaan irisan yang diinokulasi setelah 14 hari. Untuk pengujian Postulat Koch, strain *A. tumefaciens* digunakan sebagai control positif dan aquades sebagai kontrol negatif.

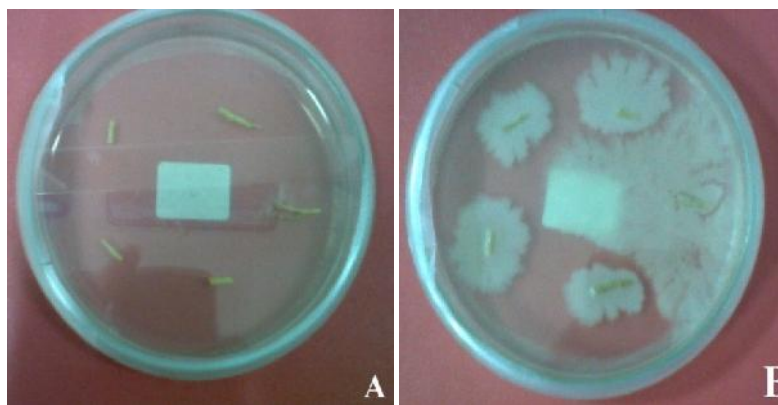
2.4.6 Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa terdiri dari 1% agarosa dilarutkan dalam 100 ml TAE buffer (terdiri dari 40 Mm tris asetat pH 7,9 dan 2 Mm Sodium EDTA). Sampel DNA (10µl DNA + 5µl loading dye) masing-masing diisikan pada sumur gel. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt selama \pm 20 menit. Gel direndam dalam larutan EtBr selama \pm 15 menit. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV transiluminator untuk melihat posisi pita (band) DNA dari tiap sampel kemudian di dokumentasi.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Isolasi bakteri dari tanaman wortel

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan dalam penelitian ini, dapat dilihat pada gambar 1. Akar tanaman wortel yang telah diisolasi dan diinkubasi dalam media Luria Bertani telah menunjukkan reaksinya yaitu dengan tumbuhnya bakteri yang ada pada akar tanaman wortel tersebut. Dengan tumbuhnya bakteri yang ada pada akar tanaman wortel tersebut membuktikan bahwa bakteri dapat ditemukan pada jaringan akar tanaman wortel dimana bakteri tampak tumbuh dibawah permukaan akar. Pada akar wortel terdapat kontaminasi yang disebabkan oleh jamur atau bakteri. Jamur yang mengkontaminasi mempunyai hifa berwarna putih, hifa-hifa tersebut memenuhi sebagian di dalam cawan petri. Jamur tersebut tumbuh secara cepat karena pada media mengandung gula, vitamin dan mineral. Diduga juga munculnya jamur bisa saja berasal karena pada saat melakukan penelitian kondisi di sekitar laminar atau tangan belum terlalu steril pada saat bekerja, atau bisa juga diduga karena masih terdapatnya mikroorganisme yang terdapat pada alat yang telah disterilkan namun belum terlalu steril, dan tempat penyimpanannya juga tidak steril.

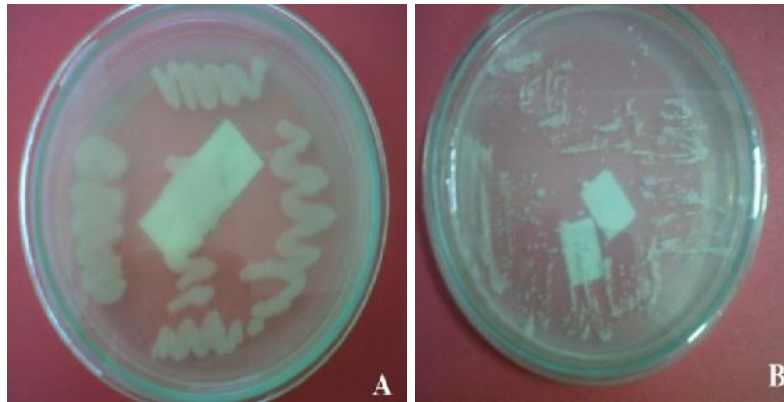


Gambar 1. Hasil kultur akar wortel media LB. (a) Kultur bakteri di media LB, (b) Kultur bakteri dari akar wortel yang terkontaminasi oleh jamur

3.2 Kultur *A. tumefaciens* Pada Media Luria Bertani (LB)

Bakteri dapat tumbuh baik pada media Luria Bertani (LB) yang kaya akan nutrisi. Menurut Brown (2006:30), Luria Bertani yang merupakan media kompleks yang tidak memerlukan penambahan senyawa lainnya, dan dapat mendukung

beberapa pertumbuhan spesies bakteri. Kandungan tripton pada media tersebut dapat menyuplai asam amino dan peptida. Sebelum dilakukan kultur, maka perlu diperhatikan tingkat suhunya. Bakteri dikultur kembali pada media LB padat, dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 12-48 jam. Dari hasil pengamatan yang dilakukan selama 48 jam, maka dapat dilihat hasil bahwa bakteri dapat tumbuh kembali dengan baik memiliki ciri-ciri ukurannya moderat atau sedang, memiliki pigmentasi koloni dan berwarna krem. (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil kultur bakteri pada media LB pada suhu 28°C. (a) Hasil kultur bakteri media LB, (b) Pengulangan hasil bakteri media LB pada suhu 28°C

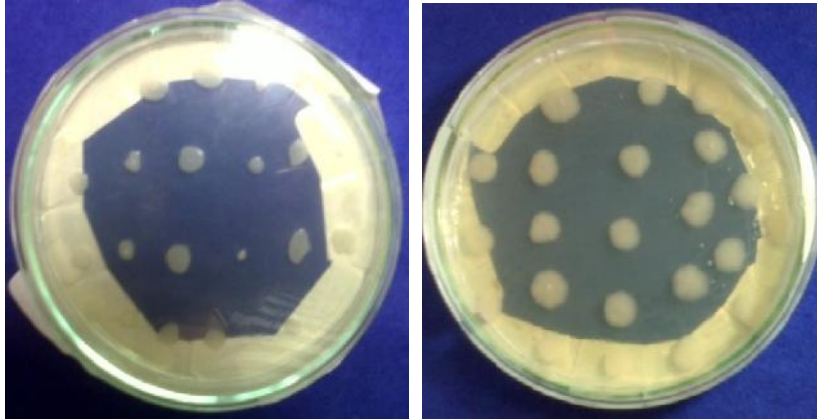
3.3 Kultur *A. tumefaciens* Pada Media Seleksi AB

Bakteri yang diambil dari kultur LB dikultur kembali ke media AB untuk memastikan bakteri yang dikultur dari media LB ke media seleksi AB merupakan bakteri *A. tumefaciens*. Dari hasil Gambar 3. bahwa bakteri yang tumbuh di media seleksi AB selama 96 jam tanpa penambahan antibiotik mampu tumbuh dengan baik. Hal ini dikarenakan dalam penambahan glukosa pada media seleksi AB bertujuan sebagai sumber karbon untuk meningkatkan ekspresi gen vir bakteri *A. tumefaciens*. Bakteri yang ditumbuhkan dalam media padat AB akan mewujudkan cirinya yang khas, berwarna krem bernuansa merah muda.



Gambar 3. Hasil kultur *A. tumefaciens* pada media seleksi AB

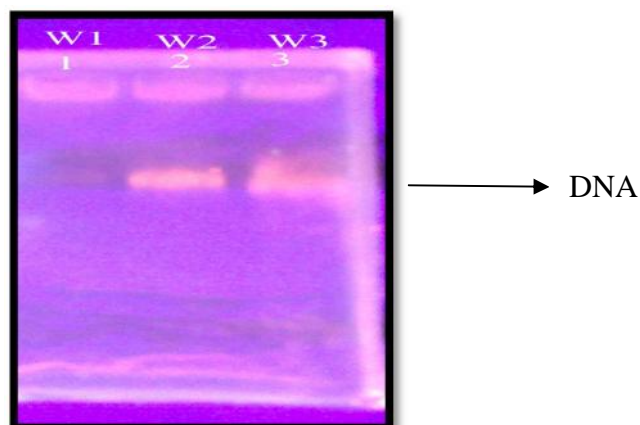
Dari hasil pengamatan yang dilakukan, morfologi koloni bakteri pada media LB yang ditumbuhkan dalam waktu 24 jam terdapat 42 koloni dan menunjukkan bentuk dan ukuran koloni yang khas, dapat dilihat dari bentuk keseluruhan koloni, tepi, dan permukaan koloninya. Ciri-ciri dari koloni bakteri seperti yang terlihat pada Gambar 4. dapat berbentuk bulat, permukaan cembung, tepi koloni yang rata dan berwarna krem dengan nuansa merah muda. Menurut Rini (2012), kumpulan bakteri *A. tumefaciens* biasanya berbentuk cembung, bulat, lembut, tak berpigmen, dan berwarna pink.



Gambar 4. Koloni *A. tumefaciens* dari tanaman wortel pada media LB

3.4 Hasil Isolasi Total DNA

Isolasi total DNA menggunakan DNA NucleoSpin Tissue Kit yang merupakan kit khusus untuk bakteri gram negatif dan hasil isolasi total DNA pada beberapa sampel tanaman wortel terlihat adanya lajur pita DNA pada elektroforesis gel agarosa 1%. Menurut Ausubel, *et al.* (2002), gel agarosa 1% dapat digunakan untuk menganalisis fragmen DNA sebesar 500 pb-10.000 pb.



Gambar 5. Visualisasi hasil isolasi DNA Total pada elektroforesis Gel Agarosa 1%

Hasil elektroforesis (gambar 5) menunjukkan adanya perbedaan pita DNA yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa Total DNA akar wortel hasil isolasi sudah cukup baik yang terdapat pada sumur 2, dan 3. Kualitas dan kuantitas DNA yang bervariasi pada setiap sampel, perbedaan tersebut terlihat dari panjang fragmen DNA/tebal pita DNA yang dihasilkan. DNA hasil isolasi pada sumur ke 2 mempunyai ketebalan pita yang paling tebal, dan sumur ke 3 mempunyai ketebalan pita agak tebal. Hal ini menunjukkan bahwa pada sumur ke 2, hasil isolasi Total DNANYA sangat banyak dan pekat. Sedangkan pada sumur ke 1 tidak terdapat pita-pita DNA, ada beberapa kemungkinan yang menyebabkan pita-pita DNA tidak terbetuk seperti seharusnya, diantaranya adalah DNA dimasukkan dalam sumur dengan tidak hati-hati sehingga DNA hilang karena larut, perendaman yang terlalu lama pada buffer TAE dengan alat elektroforesis maka DNA gagal berada di gel agarosa. DNA terus menembus gel tersebut hingga keluar dari gel. Setiap DNA tersebut mempunyai bentuk jumlah pasang basa yang berbeda-beda sehingga kecepatan migrasinya pun berbeda. Hal tersebut menyebabkan letak DNA tersebut berurutan sesuai dengan kecepatan laju migrasinya (Sambrook & Russel, 2001).

3.5 Pembentukan *Crwon Gall* Pada Uji Postulat Koch

Pada hasil uji postulat koch menunjukkan bahwa bakteri *A. tumefaciens* menyebabkan tumor atau crown gall pada irisan wortel yang diinokulasi setelah 7 hari dengan bercak-bercak putih. Gejala crown gall tampak setelah 2 minggu, diawali dengan bercak-bercak putih kehijauan yang timbul pada sisi irisan wortel. Kemudian diikuti dengan tonjolan pembengkakan berwarna hijau muda yang semakin lama semakin bertambah besar.



Gambar 6. Tumor *Crown gall* pada irisan wortel yang diinokulasi dengan bakteri *A. tumefaciens*

Sedangkan pada perlakuan kontrol (K) yang tidak diolesi dengan isolat *A. tumefaciens*, tidak menunjukkan gejala dari minggu pertama hingga minggu ketiga. Hasil uji postulat koch, dimana isolat *A. tumefaciens* menimbulkan tumor pada irisan wortel dapat dilihat pada Gambar 5.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan pembahasan diatas, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Gall yang terbentuk pada irisan wortel dalam Uji Postulat Koch menunjukkan bahwa isolat yang dihasilkan adalah *A.tumefaciens*
2. Koloni strain *A. tumefaciens* pada media LB berbentuk bulat permukaan cembung, tepi koloni rata dan berwarna krem dengan nuansa merah muda.
3. Total DNA strain *A. tumefaciens* Bedugul berhasil diisolasi.

4.2 Saran

Perlu dilakukan teknik PCR dan menentukan strain dari *A.tumefaciens* yang diisolasi.

Daftar Pustaka

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Simth & K. Struhl. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, inc., New York : XXXViii + 12.10+ AL. 29 +17 hlm.
- Brown, T.A. 2006. *Gene. Cloning & DNA analysis : An introduction*. 5 th ed. Black well Publshing, Manchester : XX+ 386 hlm.
- Cahyono, B. 2002. *Wortel Teknik Budidaya dan Analisis Usaha Tani*. Kanisius, Yogyakarta.
- Putri, Rini. 2012. *Macam-macam Bakteri Yang Merugikan dan Menguntungkan* <http://rinlove.blogspot.com> (diakses Tanggal 31 Maret 2014).
- Sambrok , J., E.F.Fritch, T. & Maniatis. 1989. *Moleculer Cloning : A Laboratory Manul*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. hlm 125-128. New York.
- Sambrook, J. & D. W. Rusell 2001. *Moleculer cloning : A laboratory manual. Vol 2.3rd ed*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (hal. XXVii + 8.1 - 14.53 + 1.44). New York.