

The *acdS* Gene Expression of Rhizobacteria Isolated from Rhizospheric Soil of Pineapple under Stressful Condition

Dori Kusuma Jaya^{1*}, Sri Ismiani², Zaitun Ritaqwin³

¹Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Mataram, Mataram, Indonesia;

²Department of Bioengineering, Lombok Institute of Technology, East Lombok, Indonesia;

³Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Universitas Islam Kebangsaan Indonesia, Aceh, Indonesia;

Article History

Received : June 01th, 2023

Revised : June 28th, 2023

Accepted : July 27th, 2023

*Corresponding Author:

Dori Kusuma Jaya,
Department of Soil
Science, Faculty of
Agriculture, University of
Mataram, Mataram,
Indonesia;

Email:

dori_jaya@unram.ac.id

Abstract: The unfavorable rhizosphere environment for the growth of rhizobacteria and plants such as flooding and herbicide is relatively common for these rhizobacteria to express the *acdS* gene which encodes ACC deaminase. This study aims to observe the expression of the *acdS* gene in the rhizobacterial isolates from pineapple plants affected by the environmental stressors. The expression of the *acdS* gene was observed by growing the bacterial isolate on a Dworkin-Foster medium containing 3 mM.L⁻¹ ACC and observing the RNA abundance of the isolate based on the Cq value in the RT-qPCR reaction. The selected bacterial isolates were then identified molecularly using the 16S rDNA gene. This study showed that 2 out of 7 bacterial isolates growing on a DF+ACC medium were selected for the RT-qPCR process. The two isolates came from flooding and herbicide stressors with Cq values of 17.86 and 20.87, respectively. The two isolates were 1F and 2H which were identified molecularly as *Burkholderia* sp. and *Pseudomonas psychotolerans* in which both genera of bacteria commonly have the *acdS* gene. The two isolates can be used as inoculant candidates in the production of biological organic fertilizers as well as in their empowerment through land use management practices to help plants tolerate environmental stressors and promote plant growth.

Keywords: ACC deaminase, *acdS* gene expression, pineapple rhizosphere, RT-qPCR.

Pendahuluan

Cekaman lingkungan merupakan faktor pembatas utama yang sangat mempengaruhi pertumbuhan dan produktivitas tanaman (Kumar *et al.*, 2012) dan bahkan pertumbuhan dan diversitas mikroba yang ada di lingkungan sekitarnya (Hernandez *et al.*, 2021). Memahami bagaimana stabilitas mikrobiom perakaran tanaman dipengaruhi oleh cekaman lingkungan memiliki implikasi penting dalam menentukan pola distribusi spesies mikroba tersebut dalam memperbaiki produktivitas tanaman pangan (Classen *et al.*, 2015; Toju *et al.*, 2018).

Cekaman abiotik seperti penggunaan herbisida berlebih dan irigasi yang buruk merupakan beberapa cekaman yang secara insidental melanda tanaman nanas yang

terdapat di perkebunan PT Great Giant Foods (GGF) provinsi Lampung, Indonesia. Cekaman lingkungan tersebut dapat menginduksi produksi berlebih dari salah satu fitohormon penting pada tanaman nanas yaitu etilen. Tanaman nanas yang terdampak cekaman herbisida dan genangan ini memiliki gejala daun yang memerah hingga menguning. Etilen berlebih tersebut merupakan salah satu indikasi penting bahwa tanaman berada dalam kondisi yang dikenal sebagai “*stress ethylene*” (Singh *et al.*, 2015) yang berujung pada terhambatnya proliferasi akar maupun pucuk tanaman.

Kondisi tanaman yang terdampak cekaman lingkungan sering diasosiasikan dengan keberadaan salah satu rizobakteri penting penghasil ACC deaminase. Sekelompok jenis bakteri yang dapat mendegradasi senyawa ACC, penyusun etilen,

yang dieksudasi oleh akar tanaman sehingga keseimbangan kadar etilen tanaman tetap terjaga dalam batas normal (Glick *et al.*, 1998, Varmal *et al.*, 2004). Kondisi tersebut tentunya dapat ditemukan pada tanaman yang sehat meskipun berada di bawah cekaman. Tanaman yang terdampak cekaman lingkungan dapat mengeksudasi senyawa ACC ke daerah rizosfer dengan mekanisme tertentu sehingga senyawa tersebut didegradasi oleh enzim ACC deaminase yang diekspresikan oleh rizobakteri menjadi ammonia dan α -ketobutirat (Honma dan Shimomura, 1978).

ACC deaminase merupakan enzim yang pertama kali ditemukan pada mikroorganisme tanah dari golongan *pyridoxal phosphate-dependent enzyme* yang banyak dihasilkan oleh kelompok mikroba (Honma, 1985). Enzim ini diekspresikan oleh gen *acdS* (*acc deaminase structural gene*) yang ekspresinya bergantung pada induksi substrat yang terdapat di daerah rizosfer (Singh *et al.*, 2015). Oleh karena itu, mengetahui tingkat ekspresi gen ini menjadi penting dalam hubungannya dengan banyaknya senyawa ACC yang dieksudasi akar tanaman yang diinduksi oleh cekaman lingkungan. Pemberdayaan rizobakteri *indigenous* melalui pengelolaan ekologi tanah maupun inokulasi rizobakteri penghasil ACC deaminase menjadi penting dilakukan guna memberikan peluang bagi rizobakteri tersebut untuk menghambat produksi etilen berlebih pada tanaman sehingga pertumbuhan dan keberlangsungan hidup tanaman tetap terjaga. Studi tingkat ekspresi gen *acdS* pada tingkat biokimia telah banyak dilakukan namun dari segi molekuler belum banyak dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat ekspresi gen *acdS* melalui kelimpahan RNA beberapa isolat rizobakteri yang juga dapat memacu pertumbuhan tanaman.

Bahan dan Metode

Asal isolat bakteri

Isolat bakteri diisolasi dari koleksi sampel tanah rizosfer tanaman nanas PT GGF provinsi Lampung yang secara insidental terpapar cekaman genangan dan herbisida. Sampel tanah merupakan koleksi laboratorium mikrobiologi pertanian, Pusat Penelitian Mikrobiologi

Terapan, BRIN, Cibinong, Indonesia. Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2017 hingga Mei 2018 di laboratorium mikrobiologi pertanian, Pusat Penelitian Mikrobiologi Terapan, BRIN dan bekerjasama dengan IPB University serta Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram.

Isolasi dan purifikasi isolat

Sebanyak 10 gram tanah dimasukkan kedalam 90 mL larutan fisiologis (NaCl 0,85%) kemudian dihomogenkan dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 60 menit. Larutan sampel tanah diencerkan hingga 10^{-6} kemudian sebanyak 0,1 mL larutan sampel pada pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} disebar pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 x 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dalam waktu 24 dan 48 jam selanjutnya dipurifikasi pada medium TSA yang baru.

Penapisan isolat bakteri pengeksresi gen *acdS*

Beberapa isolat bakteri terpilih yang telah murni ditumbuhkan pada medium minimal Dworkin-Foster (DF) mengandung Aminocyclopropane Carboxylic Acid (ACC) (Sigma Aldrich) sebagai satu-satunya sumber nitrogen dalam medium. Pembuatan medium DF dilakukan dengan mengikuti metode Penrose dan Glick (2003). Medium DF mengandung 4 g KH_2PO_4 ; 6 g Na_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 μg H_3BO_4 ; 10 g MnSO_4 ; 70 μg ZnSO_4 ; 50 μg CuSO_4 ; 10 μg MoO_3 ; 2 g glukosa; 2 g asam glukonat; 2 g asam sitrat; dan 12 g agar (untuk medium agar) yang dilarutkan kedalam 1000 mL air distilasi. Senyawa ACC sebanyak 3 mM^{-1} kemudian dilarutkan kedalam medium DF menggunakan membran milipore 0,22 μm yang dilengkapi dengan *syringe* untuk menekan larutan tersebut agar terlarut kedalam medium DF. Isolat bakteri yang tumbuh pada medium DF mengandung ACC ini diindikasikan mengekspresikan enzim ACC deaminase. Selanjutnya isolat yang tumbuh diseleksi berdasarkan kecepatan tumbuh dalam waktu 24 jam dan 48 jam kemudian dimurnikan pada medium DF yang baru.

Ekstraksi dan kuantifikasi RNA

Ekstraksi RNA total isolat bakteri dilakukan menggunakan GeneZol™ Kit

(GeneAid) dengan mengikuti prosedur yang disarankan produsen. Isolat murni hasil purifikasi diinokulasikan kedalam 25 mL media Luria Bertani (LB) cair kemudian diinkubasi selama 24 jam sambil dihomogenkan pada kecepatan 100 rpm pada suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 1% inokulum dipindahkan kedalam 10 mL media LB yang baru dan diinkubasi selama 4 jam pada kondisi yang sama dengan sebelumnya.

Tahap pertama ekstraksi RNA adalah sebanyak 1.5 mL kultur sel disentrifugasi pada kecepatan 300 g selama 5 menit kemudian supernatannya dibuang. Selanjutnya, sebanyak 1 mL reagen GeneZol ditambahkan kedalam pelet sel kemudian dihomogenkan menggunakan pipet. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Tahap berikutnya adalah sebanyak 200 µL kloroform ditambahkan kedalam sampel kemudian dihomogenkan selama 10 detik dan disentrifugasi (Effendorf 5415 R) pada kecepatan 14000 G selama 15 menit. Fase encer pada sampel yang berada pada bagian atas dipindahkan kedalam tabung 1.5 mL baru. Tahap ketiga adalah sebanyak 1 volume isopropanol ditambahkan kedalam sampel kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak balik beberapa kali dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya, sampel disentrifugasi pada kecepatan 14000 G selama 10 menit sehingga pelet RNA terlihat jelas kemudian supernatan dibuang.

Tahap keempat adalah sebanyak 1 mL etanol 70% ditambahkan kedalam sampel RNA kemudian dihomogenkan dengan kuat. Selanjutnya, sampel disentrifugasi pada kecepatan 14000 G selama 5 menit kemudian supernatannya dibuang tanpa menyentuh pelet RNA. Sampel RNA dikeringanginkan pada suhu ruang selama 10 menit. Tahap terakhir adalah sebanyak 35 µL *RNase-free water* ditambahkan kedalam pelet RNA kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. RNA hasil ekstraksi digunakan sebagai *template* pada reaksi RT-qPCR dalam 8 jam segera setelah proses ekstraksi. Hasil ekstraksi RNA diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan *NanoPhotometer* (IMPLEN 7122) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Hasil pengukuran sampel dianalisis dengan melihat rasio A260/280. Kemurnian RNA yang tinggi dapat dilihat dengan nilai rasio antara 1,8-2,0.

Amplifikasi RNA dengan metode RT-qPCR

Ekspresi gen *acdS* isolat-isolat bakteri diamati dengan melihat nilai *quantitation cycle* (cq) pada amplifikasi menggunakan *Real Time PCR* (Bio-Rad). Sepasang primer 105F-*acdS* 5'-TGCCAAGCGTGAAGACTGC-3' dan 244R-*acdS* 5'-GGGTCTGGTTCGACTGGAT-3' (Jaya *et al.*, 2019) digunakan untuk mengamplifikasi RNA dari gen *acdS* isolat. Reaksi *One Step RT-qPCR* dilakukan sesuai dengan protokol Master Mix. Reaksi PCR dipersiapkan dengan total volume 20 µL yang terdiri atas 10 µL SensiFast™ SYBR® RT-qPCR Master Mix (2X) (Bioline), *forward primer* 0,8 µL (400 nM), *reverse primer* 0,8 (400 nM), Reverse Transcriptase 1 µL, *RNase Inhibitor* 1 µL, *nuclease-free water* 2,4 µL, dan RNA *template* 4 µL (~455 ng/µL). Kondisi sistem reaksi yaitu sintesis cDNA 55°C selama 30 menit. Pre-denaturasi 95°C selama 3 menit kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus denaturasi 95°C selama 30 detik dan tahap *annealing* 58°C selama 30 detik.

Identifikasi molekuler gen 16S rDNA isolat bakteri pengeksresi gen *acdS*

Ketiga isolat bakteri yang mampu tumbuh pada medium DF + ACC dan mengeskpresikan gen *acdS* dalam bentuk RNA diidentifikasi secara molekuler. Identifikasi molekuler isolat bakteri yang tumbuh pada media selektif DF+ACC dilakukan dengan mengamplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer universal 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' dan 1492R 5'-GGTACCTTGTTACGAC-TT-3' (Lane *et al.* 1991) pada reaksi PCR konvensional. Reaksi PCR dilakukan sesuai dengan protokol pada Master Mix. Reaksi berlangsung dengan total volume 25 µL mengandung 12,5 µL GoTaq® Green PCR Master Mix (2X), 0,5 µL masing-masing primer (200 nM), 9,5 µL *nuclease-free water*, dan 2 µL (19,4–148 ng/µL) DNA *template*.

Kondisi sistem reaksi yang digunakan adalah pre-denaturasi 94°C selama 3 menit kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus yang mencakup denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 1,5 menit. Program PCR diakhiri dengan ekstensi akhir 72°C selama 5 menit. Gen 16S rRNA teramplifikasi diamati pada gel agarosa 0,8% setelah dilakukan proses

elektroforesis pada tegangan 100 Volt selama 45 menit. Pita DNA yang teramati dirunut dengan menggunakan ABI-Prism 3730 xl DNA Sequencer (First Base, Malaysia) menggunakan primer satu arah 27F 5'-AGAGTTTTCCTGGCTCAG-3'. Sekuens yang diperoleh dianalisis tingkat homologinya menggunakan BlastN pada situs NCBI.

Hasil dan Pembahasan

Isolat rizobakteri penghasil ACC deaminase

Sebanyak 2 dari 7 isolat yang mampu tumbuh pada medium DF + ACC terpilih pada penelitian ini (Gambar 1). Kedua isolat terpilih diseleksi berdasarkan pertumbuhan terbaiknya yang mampu tumbuh antara 24-48 jam. Kedua isolat tersebut diberi kode isolat 1F dan 2H berturut-turut berasal dari sampel tanah rizosfer dengan cekaman genangan dan cekaman herbisida. Cekaman lingkungan tersebut akan memberikan peluang bagi tanaman untuk mengeksudasi suatu sinyal *stress* yaitu senyawa ACC sehingga ekspresi enzim ACC deaminase pada isolat rizobakterinya dapat diamati.

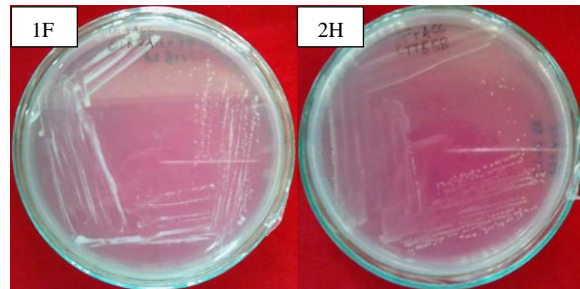
Keberadaan rizobakteri penghasil ACC deaminase relatif sangat umum ditemukan di tanah rizosfer tanaman yang berasosiasi dengan cekaman lingkungan (Timmusk *et al.*, 2011). Persebaran rizobakteri yang mengekspresikan ACC deaminase sangat bervariasi tergantung pada keberadaan substrat di rizosfer. Substrat berupa senyawa ACC merupakan substrat yang unik dieksudasi oleh akar tanaman yang terpapar cekaman. Substrat ini dieksudasi sebagai konsekuensi dari induksi cekaman lingkungan sehingga ekspresi dan aktivitas ACC deaminase relatif bergantung pula dari tingkat cekaman yang melanda tanaman. Eksudasi ACC oleh akar tanaman bertujuan untuk menjaga keseimbangan kadar ACC internal dan eksternal antara jaringan tanaman dan rizosfer sehingga berujung pada terjaganya kadar etilen tanaman dalam keadaan normal (Glick *et al.*, 1998).

Hasil ekstraksi RNA isolat rizobakteri

Tabel 1 menunjukkan hasil ekstraksi RNA isolat yang kemudian diukur menggunakan *NanoDrop Photometer*. RNA isolat 1F dan 2H memiliki rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 260/280 mendekati angka 1,80 yang mengindikasikan kurang murninya RNA tersebut

namun menghasilkan konsentrasi RNA yang cukup tinggi. Tabel 2 menampilkan tingkat ekspresi gen *acdS* pada kedua isolat. Konsentrasi RNA yang relatif sama memperlihatkan rata-rata nilai Cq yang berbeda antarisolat. Berdasarkan nilai Cq, kedua isolat bakteri terdeteksi menunjukkan ekspresi gen *acdS* dengan nilai Cq berturut-turut 17.86 dan 20.87.

Nilai Cq yang lebih rendah menggambarkan ekspresi gen yang lebih tinggi. Namun reaksi NTC menunjukkan nilai Cq yang paling rendah di antara semua reaksi sampel dan hal ini adalah suatu fenomena yang perlu dianalisis lebih mendalam pada bahasan ini. Beberapa metode telah dikembangkan untuk mengukur ekspresi gen pada sel bakteri terkultur seperti penggunaan *green fluorescent protein* atau luciferase, *fluorescence in situ hybridization* (FISH), dan *in situ reverse transcription* PCR (RT-PCR). Namun metode-metode tersebut masih memerlukan beberapa modifikasi pada protokolnya (Gao *et al.* 2011). Oleh sebab itu, metode alternatif yang dilakukan dalam penelitian ini adalah *quantitative reverse transcription* PCR (RT-qPCR).



Gambar 1. Isolat rizobakteri pengeksresi gen *acdS* yang tumbuh pada medium DF+ACC

Keberadaan gen *acdS* pada genom DNA dua isolat bakteri telah berhasil dilakukan menggunakan metode *real time* PCR pada penelitian terdahulu dan dibuktikan melalui analisis *melt peak* serta analisis sekuens baik pada pelacakan BlastN maupun BlastX (Jaya *et al.*, 2019). Namun, pada percobaan ini masih terdapat suatu pertanyaan apakah analisis ekspresi gen *acdS* dua spesies bakteri dapat diterima. Penjelasan berikut penting untuk dipahami mengenai hal tersebut. Hasil ekstraksi RNA total isolat 1F dan 2H pada rasio A 260/280 berturut-turut adalah 1.50 dan 1.73 namun dengan konsentrasi yang tinggi (Tabel 1). Hasil

ini masih dinilai kurang memuaskan pada tahap ekstraksi. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa masih adanya suatu kontaminasi baik dari reagen ekstraksi (fenol) maupun protein (enzim nuclease) sehingga dapat berpengaruh terhadap hasil reaksi RT-qPCR.

Tabel 1. Hasil pengukuran RNA isolat bakteri

Isolat	A 260/280	Konsentrasi (ng/ μ L)
1F	1,50	1103
2H	1,73	1656

Interpretasi hasil amplifikasi RNA isolat rizobakteri

Tabel 2 menunjukkan bahwa reaksi NTC memperlihatkan nilai Cq yang paling rendah di antara semua reaksi sampel dan untungnya pada reaksi NRT (*No Reverse Transcription*) tidak menunjukkan adanya amplifikasi. Hal tersebut mengindikasikan tidak adanya suatu kontaminasi dari *master mix* maupun *nuclease-free water* sehingga tidak terbentuknya sinyal *fluorescence* yang terekam pada grafik amplifikasi. Reaksi NTC merupakan reaksi tanpa RNA *template* mengandung primer dan reaksi NRT merupakan reaksi tanpa RNA *template* maupun primer adalah reaksi kontrol yang harus diikuti pada setiap percobaan. Amplifikasi nonspesifik dapat terjadi pada reaksi NTC maupun reaksi sampel dan tidak terjadi pada reaksi NRT.

Amplifikasi nonspesifik atau yang sering dikenal sebagai artefak dapat menghasilkan sekuens yang lebih pendek atau lebih panjang daripada sekuens target. Sekuens yang lebih pendek sering diasosiasikan sebagai primer dimer sebagai akibat dari homologi antarsekuens primer dan sekuens yang lebih panjang diasosiasikan sebagai sekuens tambahan yang tidak atau hanya sebagian tumpang tindih dengan sekuens target (Kanagawa, 2003). Berbagai aspek dapat dijelaskan terkait dengan fenomena pada reaksi NTC yang dipengaruhi oleh berbagai faktor mulai dari komponen-komponen rekasi seperti sifat *master mix*, konsentrasi dan karakter primer, konsentrasi dan kemurnian RNA *template*, pengondisian pada protokol siklus reaksi, hingga teknis persiapan sampel di laboratorium (Ruiz-Villalba et al., 2017).

Sebanyak tiga kali ulangan pada reaksi RT-qPCR menunjukkan bahwa pada reaksi NTC

selalu menampilkan nilai Cq yang lebih rendah dan *fluorescence* yang timbul pada siklus rendah ini memiliki kecenderungan yang sama. Kurva NTC menunjukkan bahwa akhir dari fase eksponensial langsung melewati fase *plateau* dari setiap rekasi sampel. Fenomena ini pula dijelaskan pada prosedur penggunaan reagen SensiFast™SYBR® *master mix* komersial yang digunakan pada reaksi ini yaitu nilai Cq yang muncul lebih awal bukan merupakan suatu indikasi sensitifitas yang baik terhadap sekuens target melainkan suatu indikasi kecepatan penanda SYBR® untuk menempel pada dsDNA. Selain itu, pada percobaan ini tidak dilakukannya proses *hot-start* yang memungkinkan formasi primer dimer pada reaksi NTC maupun sampel dapat terdisosiasi sebelum memasuki tahap awal denaturasi sehingga hal ini pula dapat berujung pada terjadinya *background fluorescence* pada reaksi.

Terbentuknya hibridisasi molekul DNA melalui suatu istilah yang disebut “*jumping*” antara sekuens yang homolog dengan sekuens lain dapat saja terjadi (Odelberg et al., 1995) sehingga dapat pula terbentuknya *peak* yang berbeda dengan *peak* sekuens target. Bahkan pada hasil percobaan Gao et al., (2011) dan Laurell et al., (2012) melaporkan bahwa semakin kecil konsentrasi RNA *template* akan memberikan kesempatan terjadinya formasi primer dimer meningkat secara signifikan pada analisis *melt curve*.

Mengacu pada analisis tersebut kami menginterpretasikan bahwa keleluasaan berhibridisasinya antarprimer lebih besar daripada antara primer dan cDNA sehingga hal ini menjadi faktor penting penyebab fenomena tersebut. Meskipun demikian, hal tersebut dapat di atasi dengan secara terus menerus melakukan optimasi kondisi reaksi termasuk konsentrasi primer, RNA *template*, dan buffer serta proses pengenceran namun perlu waktu yang lebih lama. Pendekatan kami bertujuan untuk melihat perbandingan ekspresi gen *acdS* antarisolat dan keberadaan gen *acdS* pada kedua isolat telah dibuktikan pada percobaan terdahulu meskipun tidak dapat dihindari terjadinya formasi primer dimer, kami masih mendapatkan data nilai Cq dari sekuens *acdS* pada reaksi sampel bakteri.

Tabel 2. Ekspresi gen *acdS* isolat rizobakteri berdasarkan nilai Cq dan kelimpahan RNA

Isolat	Konsentrasi RNA	Nilai Cq±StDv	Kelimpahan RNA (rfu±StDv)
1F	4 µl (465.8 ng/µL)	17.86±4.02	4068.33±1860.47
2H	4 µl (457.17 ng/µL)	20.87±5.32	7505±835.35
NTC	Primer (0.8 µL (400 nM))	9.98±4.77	1103±6700
NRT	0	0	0

Keterangan: NTC: *No Template Control*; NRT: *No Reverse Transcription*

Analisis hasil ekspresi gen *acdS* dan identitas isolat

Ekspresi gen merupakan rangkaian proses penerjemahan informasi genetik dari DNA menjadi RNA dan atau protein. Ekspresi gen *acdS* dipengaruhi oleh keberadaan substrat, oksigen, dan akumulasi produk. Keberagaman ekspresi gen pada berbagai spesies bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti laju transkripsi, dinamika pengaturan gen, maupun faktor lingkungan (Singh *et al.*, 2015). Secara biokimia, pengukuran ekspresi gen *acdS* yang umum dilakukan adalah dengan mengukur kadar α -ketobutirat hasil hidrolisis senyawa ACC oleh ACC deaminase. Percobaan ini melaporkan ekspresi gen *acdS* dua isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media Luria-Bertani (LB) Broth di mana media ini bersifat media umum bagi pertumbuhan kebanyakan bakteri. Meskipun demikian, komposisi asam amino yang terkandung dalam tripton pada media LB mungkin dapat menginduksi terekspresikan gen *acdS* pada beberapa hal (Singh *et al.*, 2015). Oleh karena itu, ekspresi gen *acdS* pada kedua isolat penelitian ini dapat diperhitungkan.

Tabel 3. Identifikasi molekuler isolat bakteri

Isolat	Spesies	Nilai identitas (%)	Nomor aksesori
1F	<i>Burkholderia</i> sp. HAU-B1	98,87	OQ940483.1
2H	<i>Pseudomonas psychotolerans</i> PMM4B	99,91	MG262448.1

Isolat-isolat bakteri pemacu pertumbuhan tanaman dalam hal ini adalah bakteri penyandi ACC deaminase yang juga diasosiasikan dapat menghasilkan hormon IAA dapat digunakan sebagai inokulan dalam pupuk organik hayati. Tingkat ekspresi gen *acdS* bervariasi antar spesies mikroba. Kenyataannya, aktivitas ACC deaminase sangat bergantung pada faktor lokasi

gen pada replikon, *copy number* gen, dan regulasi transkripsi gen. Berbagai studi melaporkan bahwa ekspresi gen *acdS* dari spesies yang berbeda menunjukkan aktivitas ACC deaminase yang berbeda seperti pada spesies *Burkholderia caryophylli* (Shaharoon *et al.*, 2007) dan *Pseudomonas oryzae* (Belimov *et al.*, 2001) berturut-turut 598, 890 nmol.mg⁻¹.h⁻¹ α -ketobutirat di mana *Pseudomonas oryzae* merupakan spesies dengan ekspresi gen *acdS* tertinggi.

Berdasarkan nilai Cq pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen *acdS* pada isolat teridentifikasi sebagai *Burkholderia* sp. (98,87%) dan pada *P. psychotolerans* (99,91%) (Tabel 3) berturut-turut adalah 17.86 dan 20.87 masing-masing dengan kelimpahan RNA 4068,33 RFU dan 7505 RFU (Tabel 2). Perbedaan hasil ini nampaknya menjelaskan bahwa perbedaan spesies, galur, laju transkripsi, serta substrat pada media pertumbuhan bakteri diduga menjadi faktor penting dalam ekspresi gen *acdS*. Oleh karena itu, perlu adanya penggunaan media selektif mengandung ACC serta optimasi reaksi RT-qPCR yang lebih baik untuk mengetahui tingkat ekspresi gen *acdS* terbaik pada penelitian di masa mendatang.

Kesimpulan

Sebanyak 2 dari 7 isolat yang mampu tumbuh pada media DF mengandung ACC terpilih dalam penelitian ini. Kedua isolat tersebut berhasil mengekspresikan gen *acdS* yang menyandi enzim ACC deaminase yang ditandai dengan tumbuhnya isolat pada medium minimal DF mengandung ACC dan masing-masing menunjukkan nilai Cq (17,86 dan 20,87) dan kelimpahan RNA (4068 rfu dan 7505 rfu) pada reaksi RT-qPCR. Kedua isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Burkholderia* sp. (98,87%) dan *Pseudomonas psychotolerans* (99,91%). Kedua spesies mampu mentoleransi tanaman nanas sehat yang terdampak cekaman

genangan dan herbisida sehingga dapat diteliti lebih lanjut terkait penggunaannya sebagai inokulan pupuk organik hayati maupun pemberdayaannya melalui praktik manajemen penggunaan lahan yang baik.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada LPDP dan DIPA BRIN yang telah memberikan dana dalam penelitian ini. Terima kasih pula kami ucapkan kepada BRIN atas fasilitas laboratorium yang disediakan. Tidak lupa pula kami ucapkan kepada para penulis dan kerjasama yang baik dari Universitas Mataram, Institut Teknologi Lombok, dan Universitas Islam Kebangsaan Indonesia yang telah dapat bekerja sama dalam penulisan artikel ini.

Referensi

- Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, Borosov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Preisfeld A, Dietz KJ, & Stepanok VV. (2001). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol.* 47(7): 642-652. DOI: 10.1139/w01-062
- Classen AT, Sundqvist MK, Henning JA, Newman GS, Moore JA, & Cregger MA, *et al.* (2015). Direct and indirect effects of climate change on soil microbial and soil microbial-plant interactions: what lies ahead? *Ecosphere.* 6(8):1–21. DOI: 10.1890/ES15-00217.1
- Gao, W., Weiwen Z., & Deirdre RM. (2011). RT-qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells. *J Microbiol Methods.* 85(3): 221-227. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.03.008
- Glick, BR., Penrose, DM., & Li, J. (1998). A model for lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theoret. Biol.* 190, 62-68. DOI: 10.1006/jtbi.1997.0532
- Hernandez, DJ., David, AS., Menges, ES., Searcy, CA., & Afkhami, ME. (2021). Environmental stress destabilizes microbial networks. *The ISME journal*, 15, 1722-1734. DOI: 10.1038/s41396-020-00882-x
- Honma, M. (1985). Chemically reactive sulfhydryl groups of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Agric. Biol. Chem.* 49, 567–571. DOI: 10.1271/bbb1961.49.567
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1825–1831. DOI: 10.1271/bbb1961.42.1825
- Penrose, DM & Glick, BR. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant*, 118(1): 10–15. DOI 10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x
- Singh, RP., Shelke, GM., Kumar, A., & Jha, PN. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to stress ethylene” produced in plants. *Front. Microbiol.* 6: 937. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00937
- Jaya, DK., Giyanto, Nurhidayat, N., & Antonius, S. (2019). Isolation, identification, and detection of ACC deaminase gene-encoding rhizobacteria from rhizosphere of stressed pineapple. *IJBioTech.* 24(1):17-25. DOI: 10.22146/ijbiotech.39018
- Kanagawa, T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng.* 96(4):317-323. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)90130-7
- Kumar, AA., Mishra, P., Kumari, K., & Panigrahi, KCS. (2012). Environmental stress influencing plant development and flowering. *Frontiers in bioscience.* URL: <https://www.researchgate.net/publication/225086099>
- Laurell H, Jason SI, Anne A, David S, Jean-Jose M, Jean-Francois A, & Mikael K. (2012). Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic Acids Res.* 40(7): e51. DOI: 10.1093/nar/gkr1259
- Odelberg SJ, Weiss RB, Hata A, & White R. (1995). Template-switching during DNA synthesis by *thermus aquaticus* DNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* 23(11): 2049-2057. DOI: 10.1093/nar/23.11.2049
- Ruiz-Villalba A, Elizabeth van P, Quinn DG, Jan MR, & Maurice JB van den Hoff. (2017).

- Amplification on nonspecific products in quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *Biomol Detect and Quant.* 14:7-18. DOI: 10.1016/j.bdq.2017.10.001
- Shaharoon B, Arshad M, & Khalid A. (2007). Differential response of etiolated pea seedling to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate and/or L-methionine utilizing rhizobacteria. *Microbiology.* 45(1):15-20.
- Timmusk, S., Paalme, V., Pavlicek, T., Bergquist, J., Vangala, A., Danilas, T., & Nevo, E. (2011). Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. *PLoS ONE* 6(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0017968
- Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, & Naito K, *et al.* (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat Plants.* 4:247–257. URL: <https://www.nature.com/articles/s41477-018-0139-4>
- Varma A, Lynette A, Dietrich W, & Rudiger H. (2004). *Plant Surface Microbiology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-74051-3>