

Pemanfaatan dan Pengembangan Bakteri Metanotrof sebagai Pereduksi Emisi Metan dan Pemfiksasi N₂ (Biofertilizer) di Lahan Sawah

**Dr. Ir. Iman Rusmana, MSi.
Alina Akhdiya, MSi.**

**DEPARTEMEN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**



PENDAHULUAN

LAHAN SAWAH



→ Sumber utama produksi beras

→ sumber emisi metan (CH₄)

→ produkdi Metan \pm 575 Tg year-1 (Hanson & Hanson, 1996).

→Indonesia URUTAN KE TIGA kontribusi emisi metan dari sawah setelah cina dan india, diperkirakan 7.08 % dari total emisi metan dari sawah(Sass et al, 2000).

Methane

→konsentrasi di atmosfer meningkat 1 % per tahun (Mossier et. al, 1994).

→Kontribusinya \pm 15-20 % dari total efek gas rumah kaca (Mossier et. al, 1994).

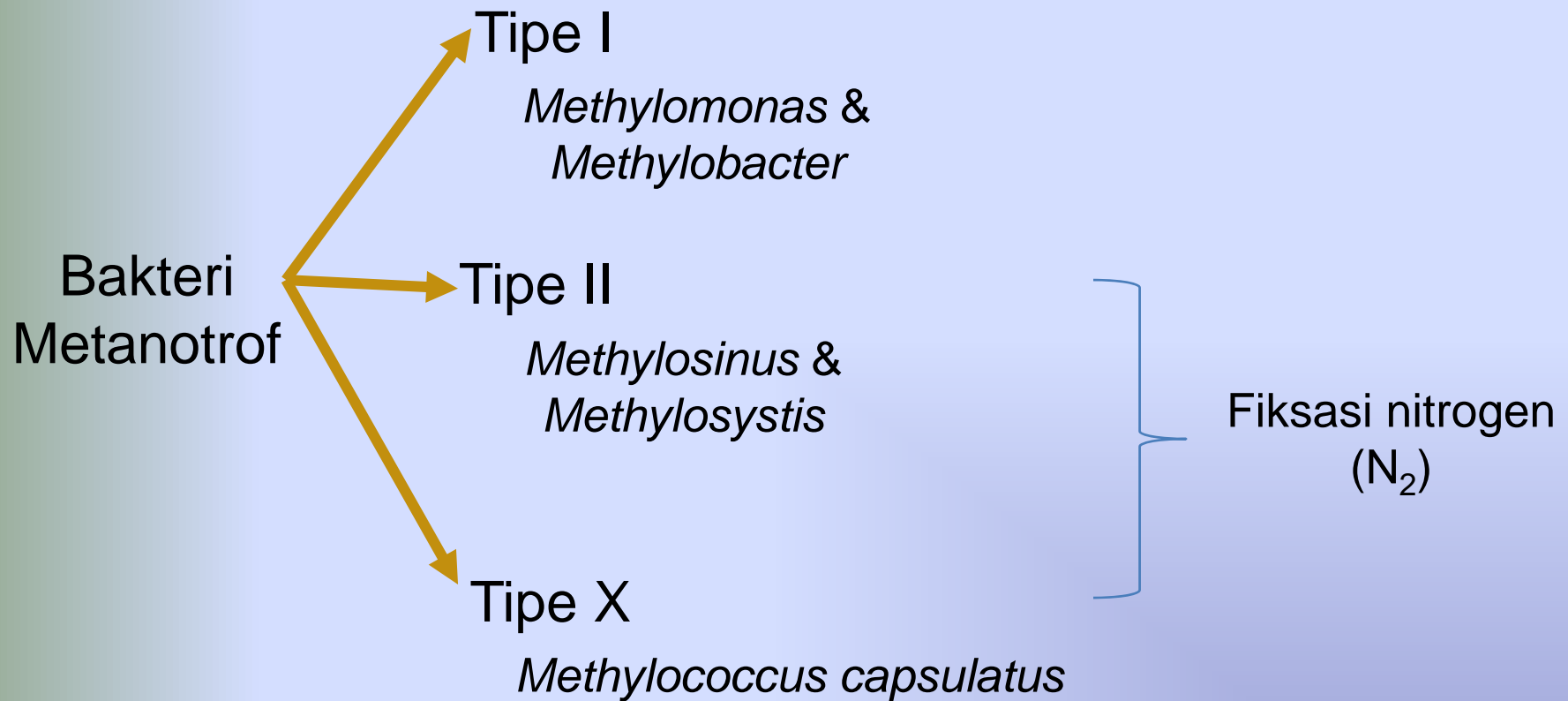
Reduksi Emisi
 CH_4

→ Bakteri Metanotrof

→ Pengguna CH_4 ; Aerobik; lapisan permukaan sedimen sawah (Conrad & Rothfus 1991)

→ Oksidasi CH_4 – Metan Monooksigenase (MMO)

- Oksidasi CH_4 menjadi CO_2 oleh bakteri metanotrof di lahan sawah dapat mencapai 80 % dari CH_4 yang diproduksi oleh bakteri metanogen (Conrad & Rothfus 1991).
- Oksidasi CH_4 dilakukan oleh berbagai macam bakteri metanotrof seperti: *Methylobacter luteus*, *Methylosinus trichosporium*, *Methylococcus capsulatus* (Hanson & Hanson 1996).



Tujuan penelitian (3 tahun) :

1. Mengukur aktivitas oksidasi metan dan fiksasi N₂ dari isolate bakteri metanotrof asal sawah dan menyeleksi bakteri metanotrof potensial yang memiliki aktivitas oksidasi metan dan fiksasi nitrogen yang tinggi.
2. Menguji karakteristik fisiologi isolate bakteri metanotrof
3. Mengidentifikasi secara molekuler berdasarkan sekuen gen 16S rRNA isolate bakteri metanotrof asal sawah.
4. Karakterisasi molekuler gen penyandi enzim *partikulate* metan monooksigenase/ pMMO (*pmoA*) dan *soluble* metan monooksigenase/sMMO (*mmoX*) dari bakteri metanotrof potensial.
5. Karakterisasi molekuler gen penyandi enzim pemfiksasi N₂ yaitu gen enzim dinitrogenase reduktase (*nifH*) dan sub unit alfa dari dinitrogenase (*nifD*) dari bakteri metanotrof potensial
6. Menguji efektivitas oksidasi metan dan fiksasi N₂ dan memformulasi berbagai kombinasi inokulum bakteri metanotrof pada lumpur sawah.
7. Menguji efektivitas beberapa formulasi kombinasi bakteri metanotrof pada pertanaman padi di rumah kaca.

M E T O D E

37 Isolat bakteri metanotrof asal sawah di Bogor dan Sukabumi (DIPA BIOTROP 2008)

Pengukuran aktivitas oksidasi metan total

Pengukuran aktivitas fiksasi N₂

Analisa Kromatografi Gas

Analisa pembentukan ammonium dikultur

5 Isolat bakteri metanotrof terbaik

Uji karakteristik Fisiologi

Identifikasi Molekuler (gen 16S rRNA)

Analisa pakai API test Strip Kit

Isolasi DNA genom
Amplifikasi PCR gen 16S rRNA
Sekuensing, Alignment (BLAST N)

Tahun 1

5 Isolat terbaik terkarakterisasi dan teridentifikasi

Uji efektivitas di lumpur sawah

Karakterisasi gen enzim metan monooksigenase

Karakterisasi gen enzim nitrogenase

Percobaan *slury* isolat tunggal

Isolasi DNA genom,
Amplifikasi PCR gen *mmoX* dan *pmoA*
Sekuensing, Alignment (Blast N)

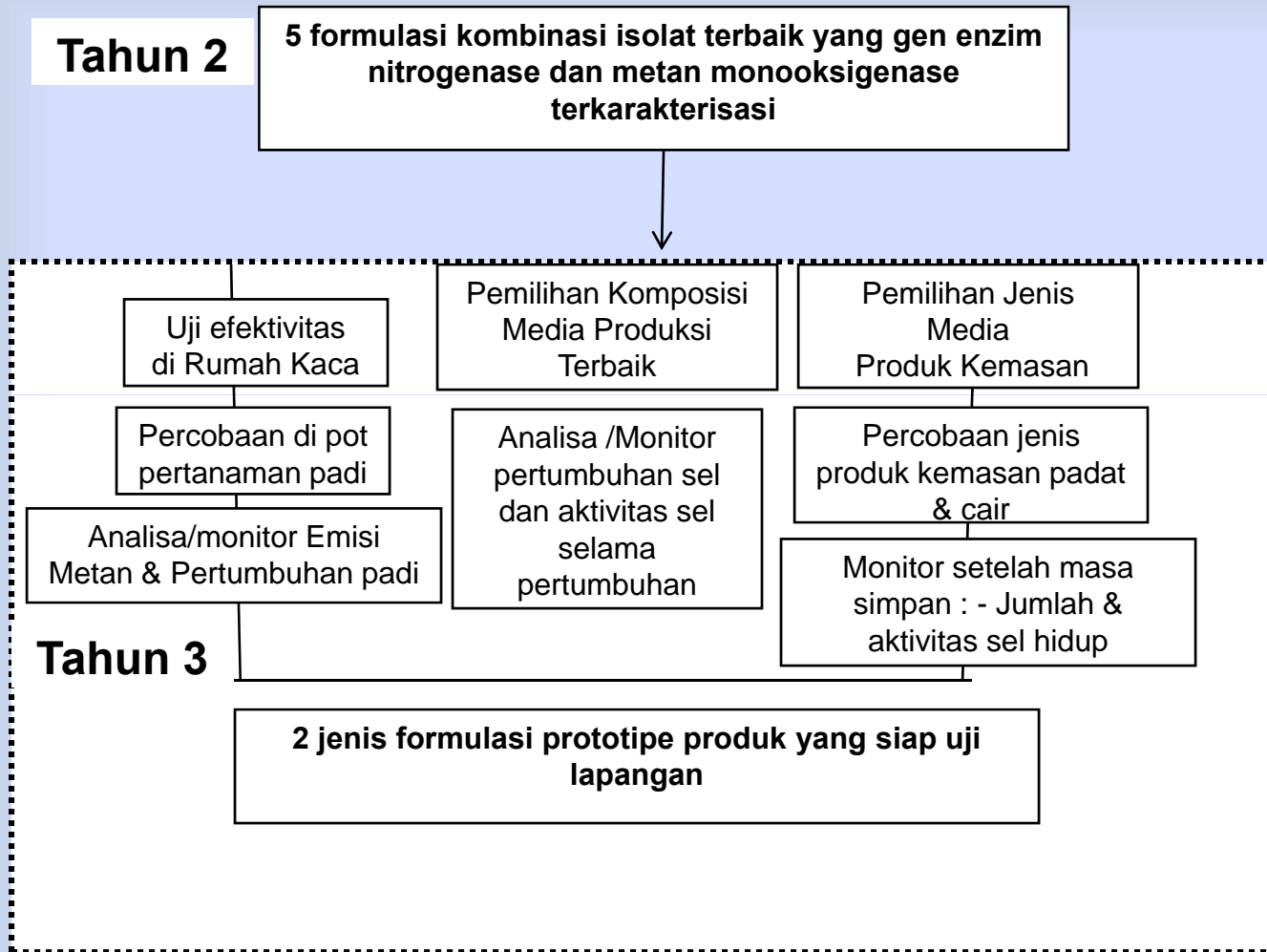
Isolasi DNA genom,
Amplifikasi PCR gen *nifH* dan *nifD*
Sekuensing, Alignment (Blast N)

Percobaan *slury* Formulasi kombinasi isolat

Tahun 2

5 formulasi kombinasi isolat terbaik yang gen enzim nitrogenase dan metan monooksigenase terkarakterisasi

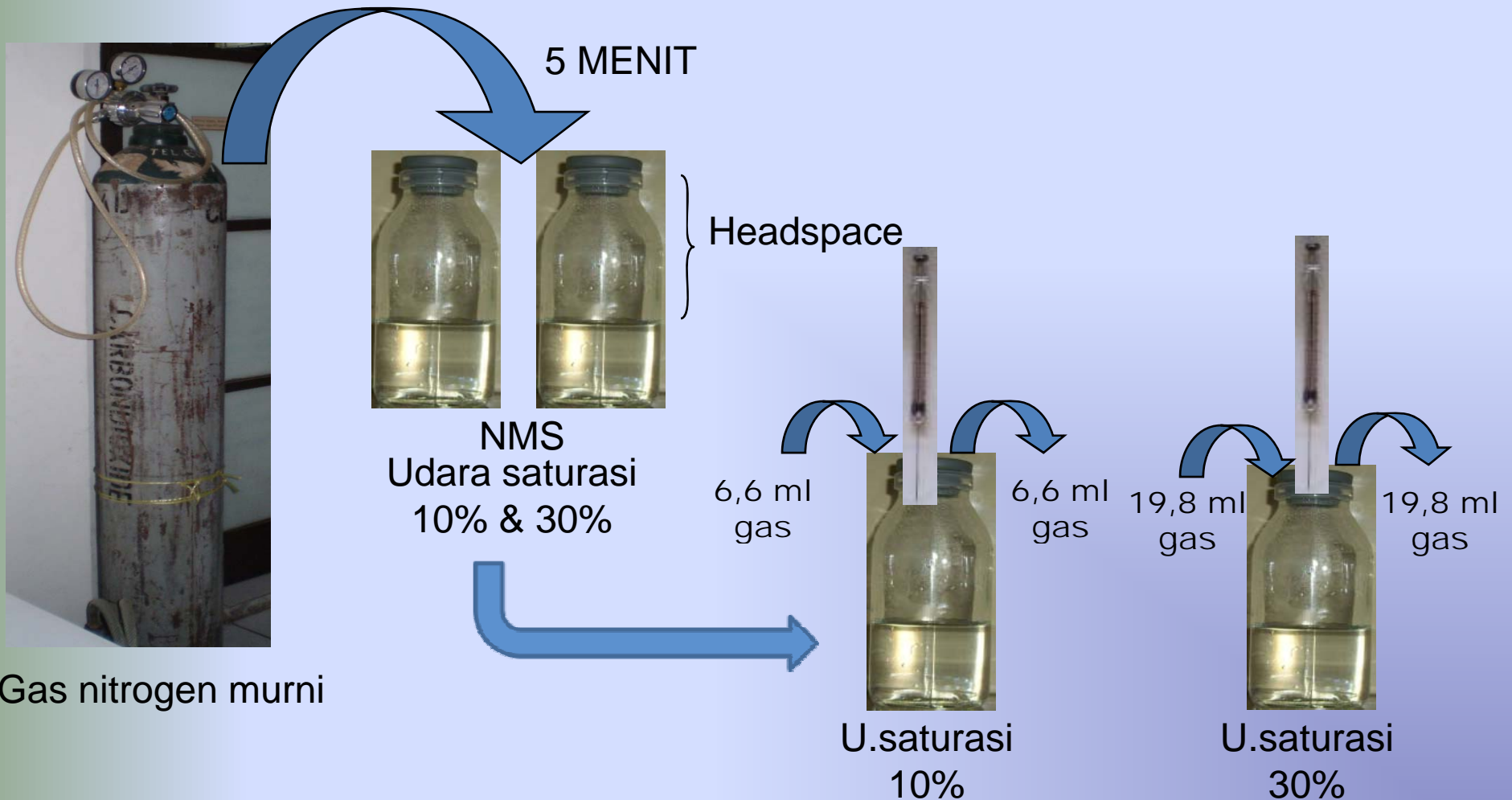
M E T O D E



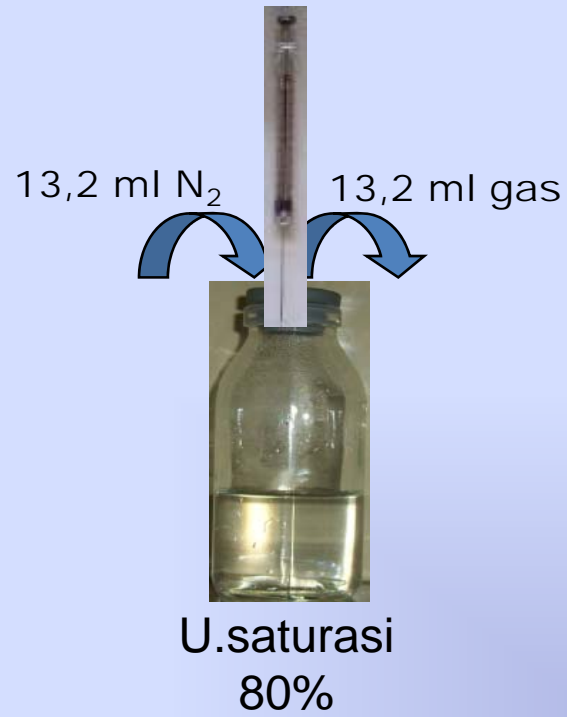
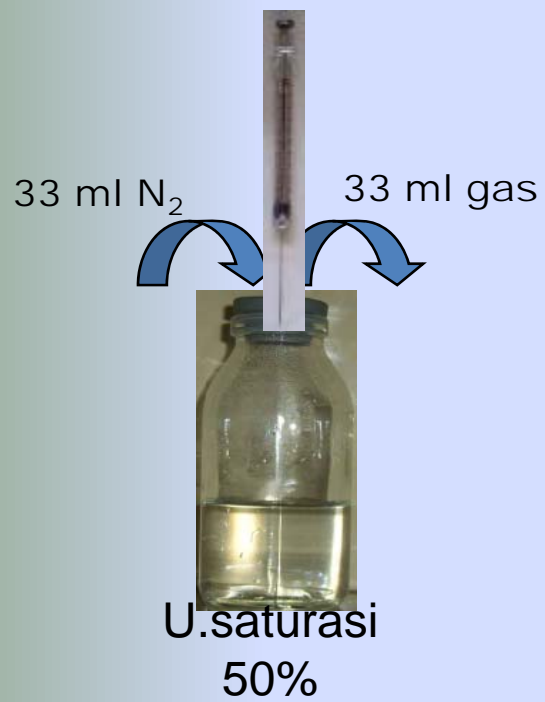
Metode _____

Uji kemampuan fiksasi N_2 isolat terpilih pada konsentrasi O_2 berbeda

● MENGKONDISIKAN MEDIUM PERTUMBUHAN ANAEROB

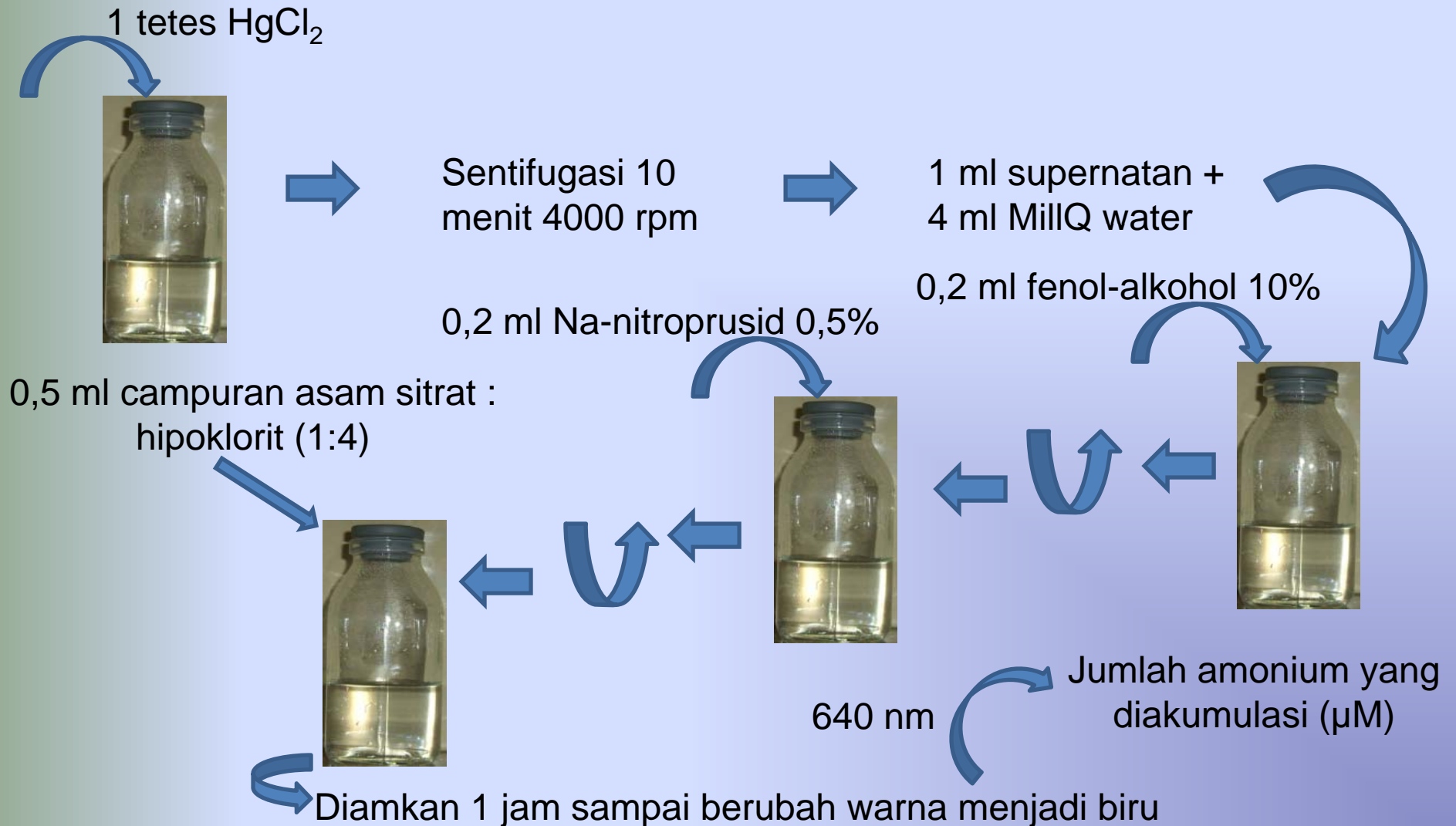


Metode _____



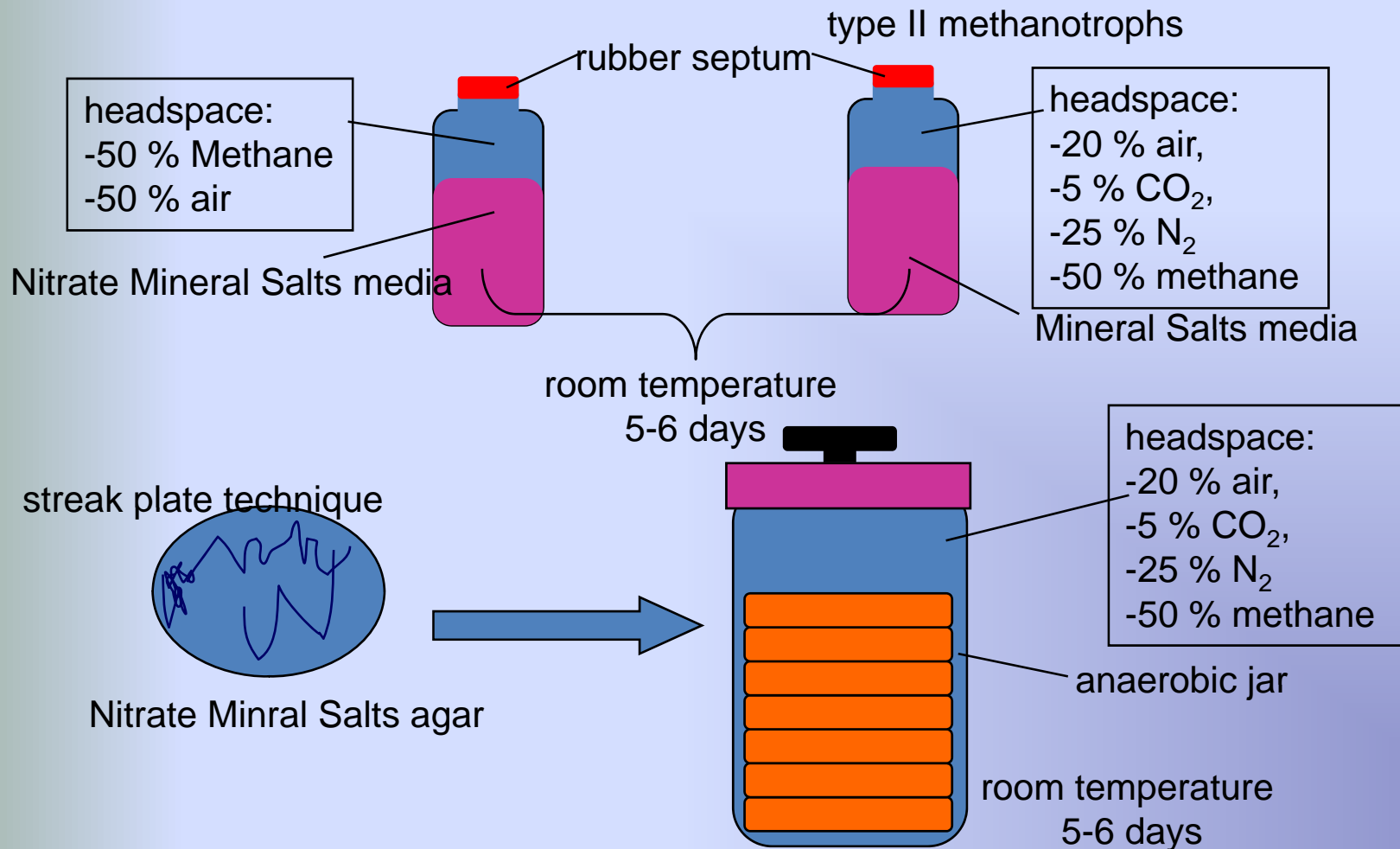
Metode _____

Pengukuran jumlah amonium yang diakumulasikan dalam kultur



METODE

Menumbuhkan bakteri metanotrof



ISOLASI DNA

- Genomic DNA of selected isolates will be extracted using alkaline lyses methods (Lazo *et al.* 1987).

Amplification of 16S rRNA gene

- Amplification of 16S rRNA gene will used specific primers (Marchesi *et al.* 1998).

Primer	Sequence (5' to 3')
63F	5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC
1387R	5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC

- PCR condition: (Marchesi *et al.* 1998).
 - initial denaturation : 94°C for 2 min,
 - Denaturation : 92°C for 30 sec,
 - Annealing : 55°C for 30 sec,
 - Extention : 75°C for 1 min.
 - A final extention : 75°C for 5 min
- } 30 cycles
- PCR Products

↓
**Sequencing
Alignment (Blast N)**

Uji Fisiologi



BGM 1



BGM 2



BGM 3



SKM



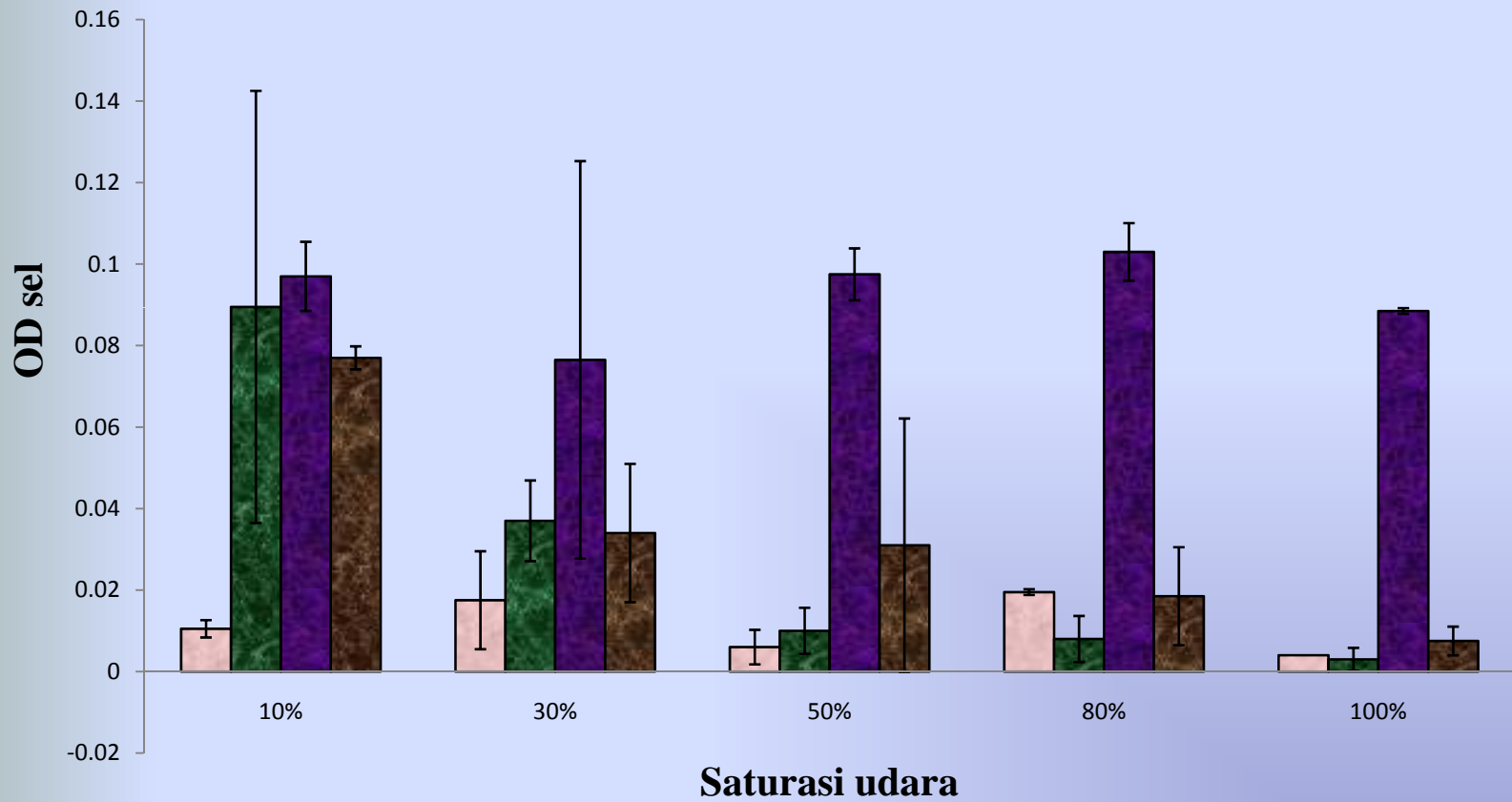
BGM 9

Hasil

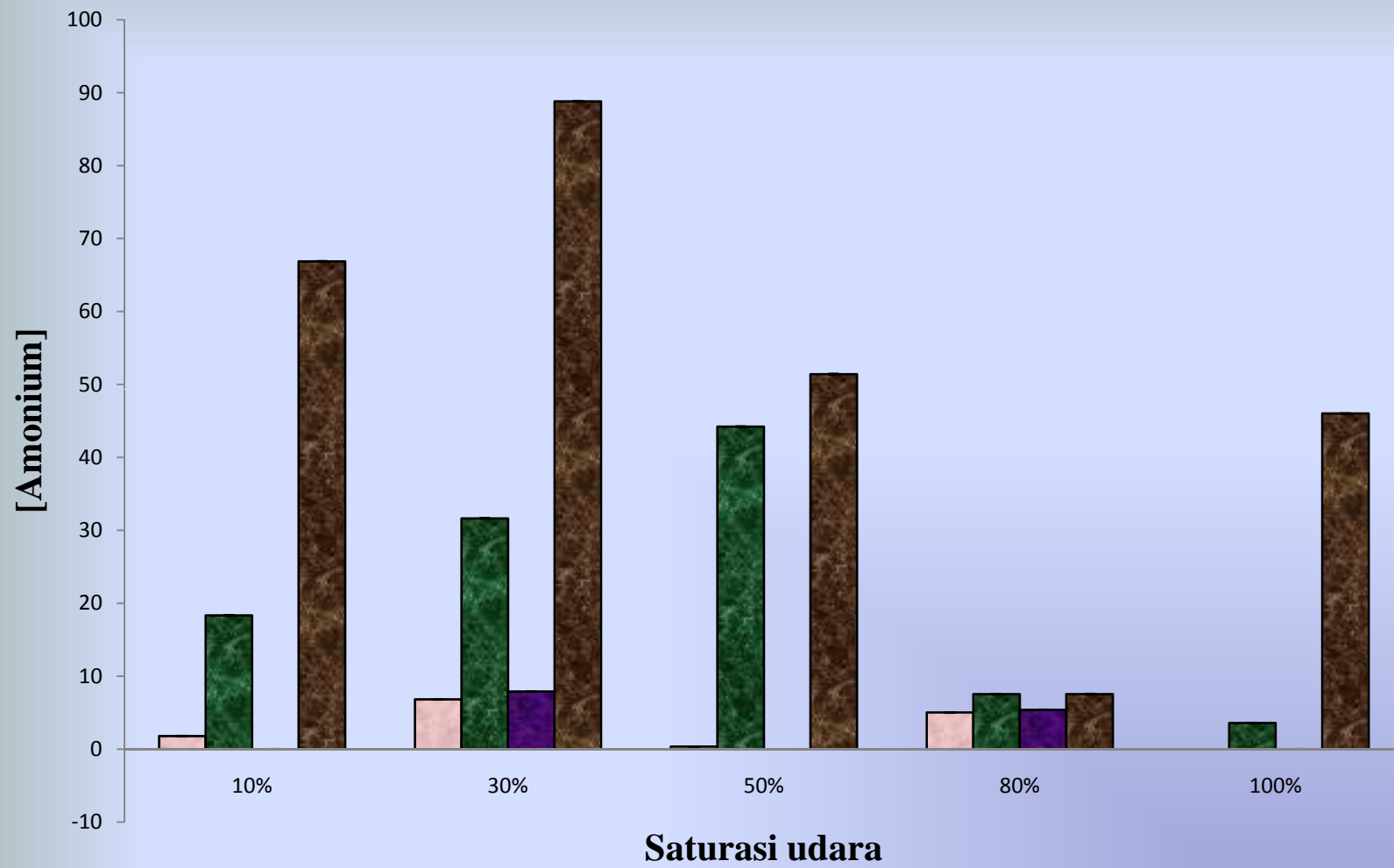
Tabel 1 Densitas sel (620 nm) dan akumulasi amonium (640 nm) bakteri isolat BGM dan SKM

No.	Isolat	Konsentrasi sel (OD $\lambda= 620$ nm)	Akumulasi Amonium (mM)
1	BGM 1	0,016	46
2	BGM 2	0,034	21
3	BGM 3	0,023	39
4	BGM 4	0,015	13
5	BGM 5	0,039	93
6	BGM 6	0,036	0
7	BGM 9	0,038	47
8	BGM 12	0,04	34
9	SKM 1	0,024	10
10	SKM 2	0,023	25
11	SKM 4	0,023	30
12	SKM 5	0,049	14
13	SKM 7	0,02	25
14	SKM 9	0,047	0
15	SKM 10	0,031	0
16	SKM 14	0,016	15
17	SKM 15	0,042	1
18	SKM 16	0,017	0
19	SKM 18	0,028	0

Pertumbuhan dan Fiksasi N₂ Metanotrof Terpilih pada Konsentrasi O₂ yang Berbeda

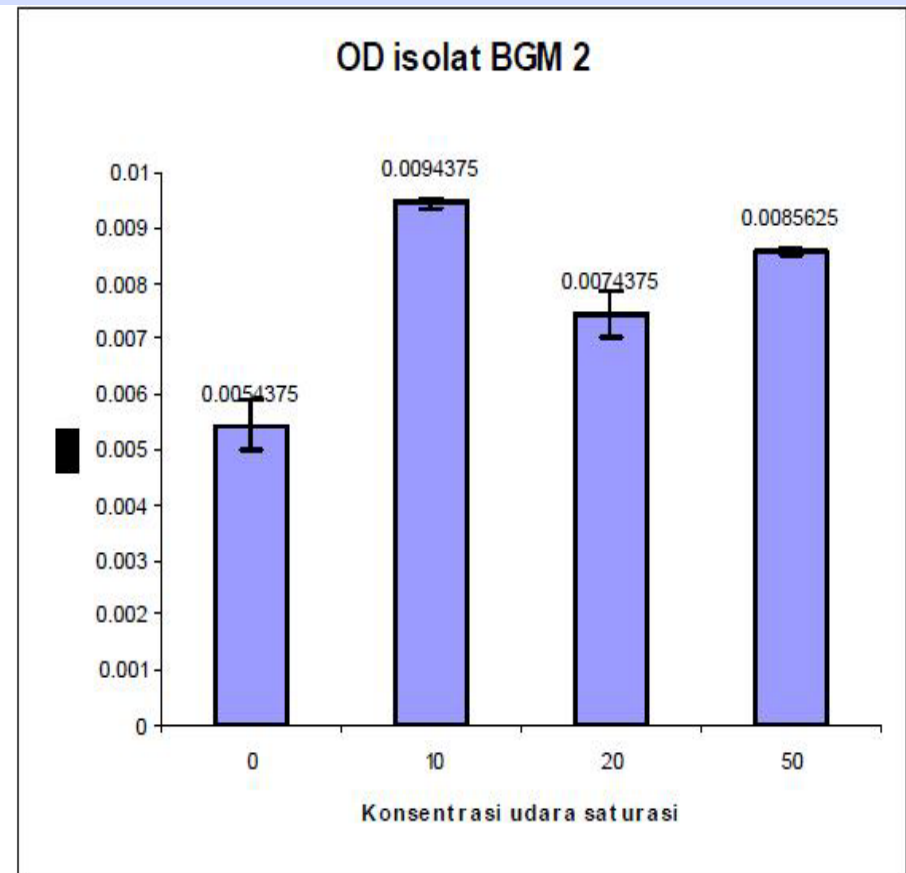
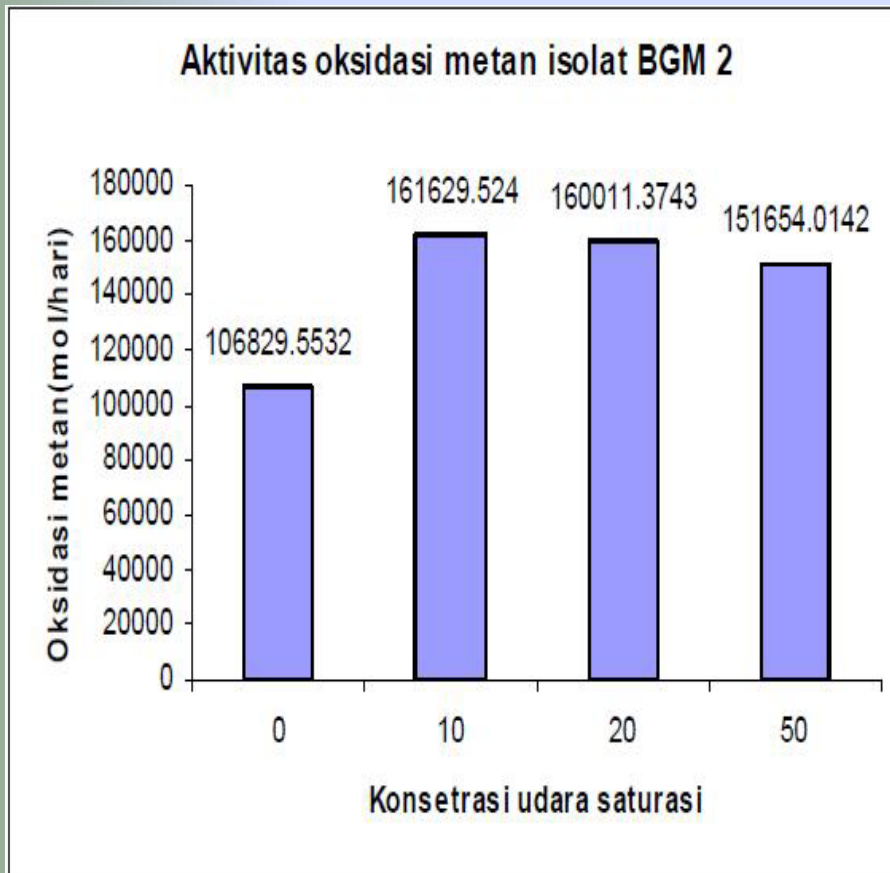


Gambar 1 OD sel isolat BGM 1, BGM 3, BGM 5, BGM 9

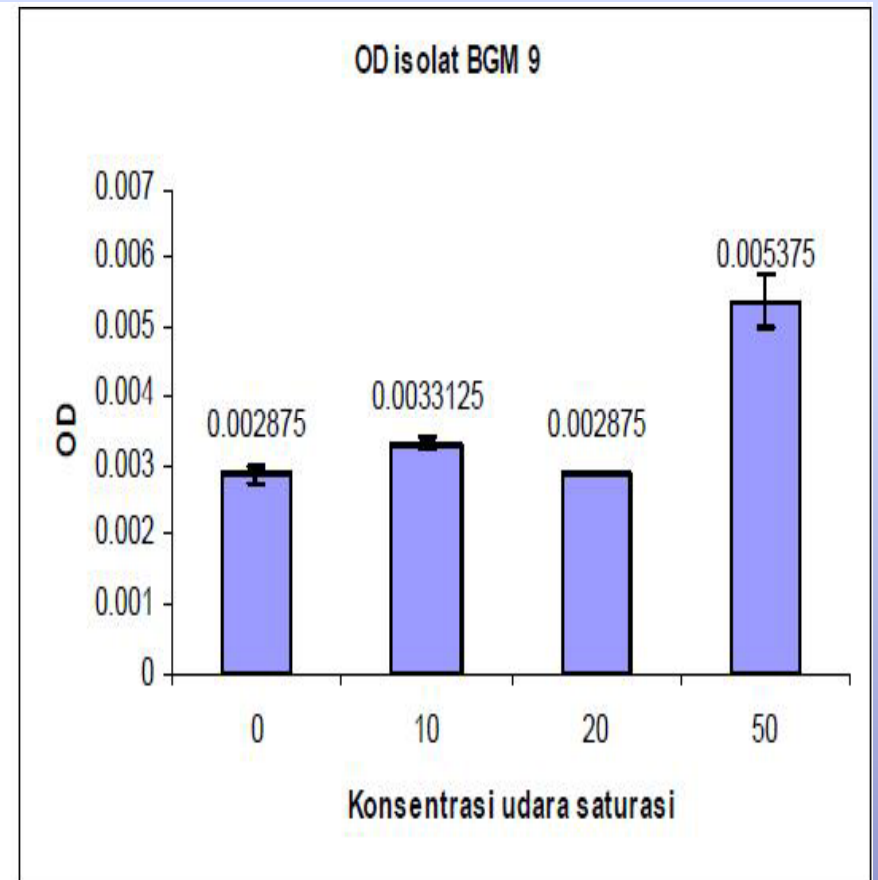
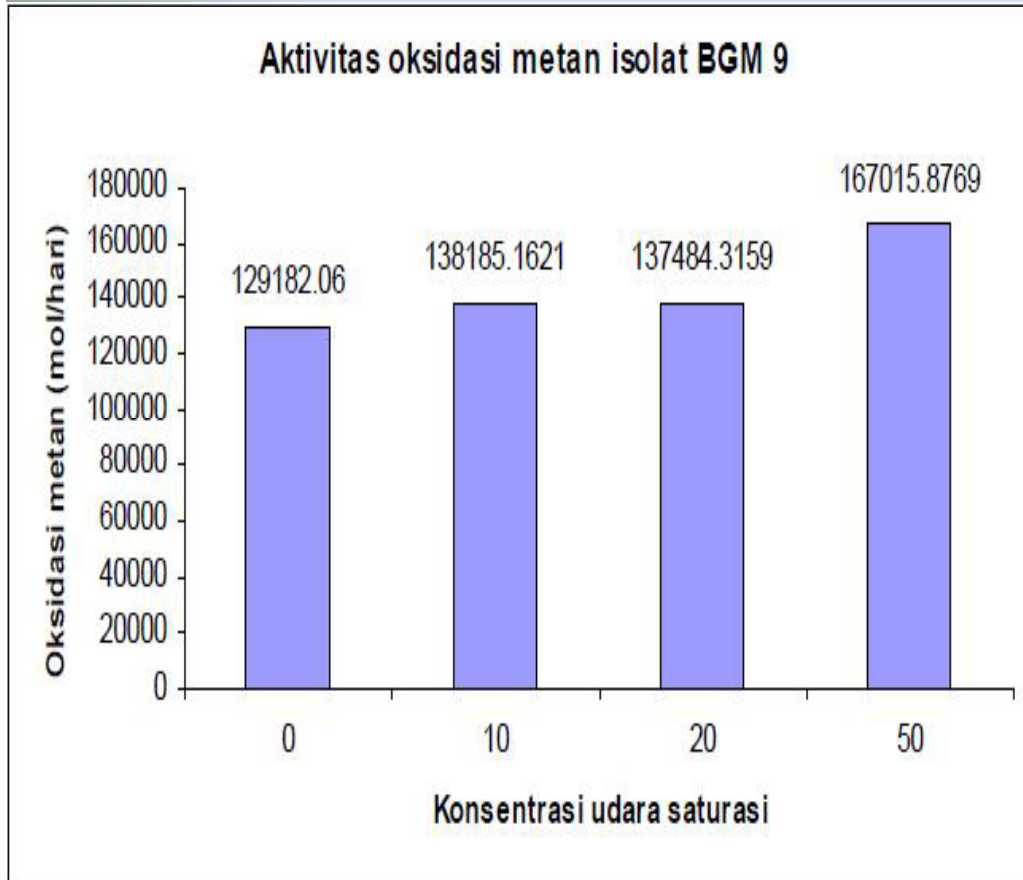


Gambar 2 Konsentrasi amonium isolat BGM 1, BGM 3, BGM 5, BGM 9

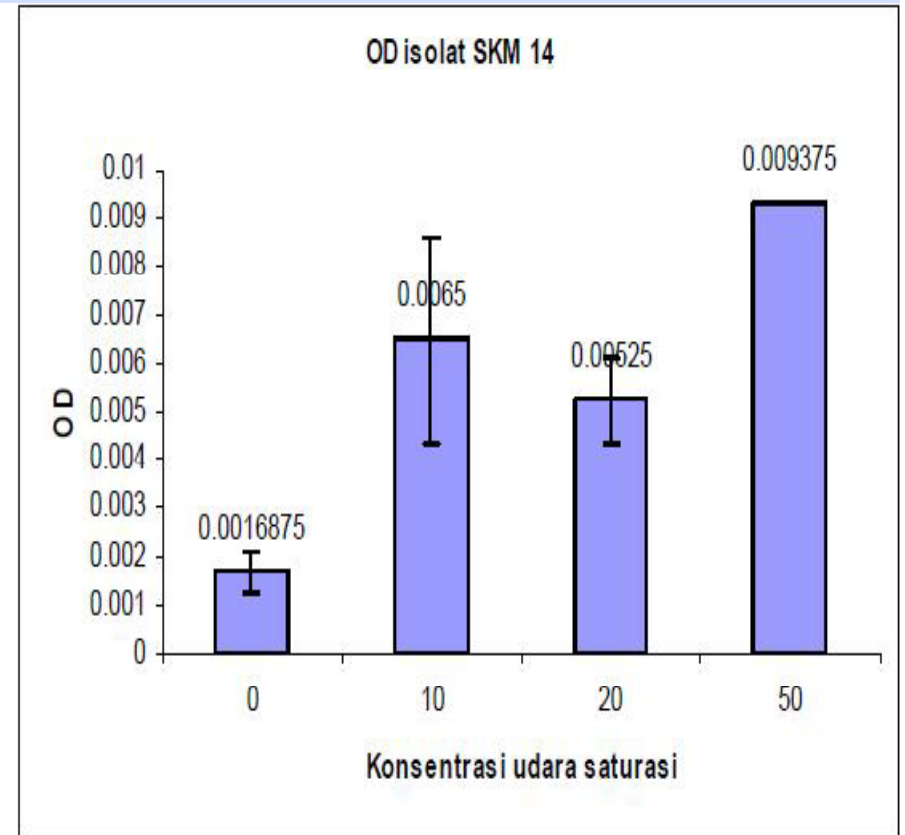
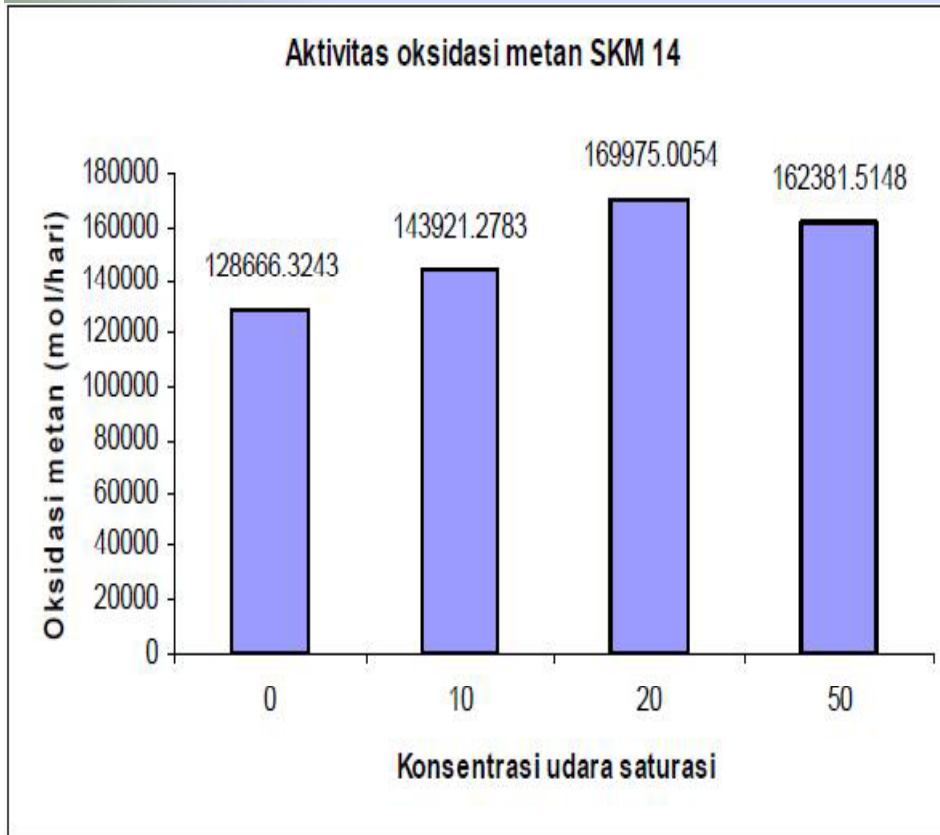
Aktivitas Oksidasi metan pada saturasi udara yang berbeda



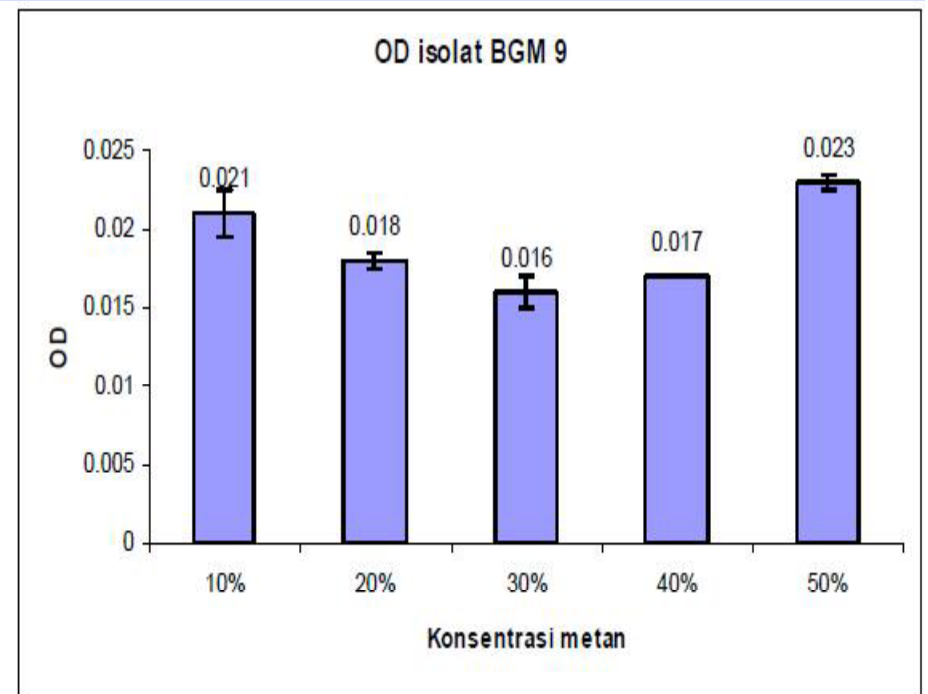
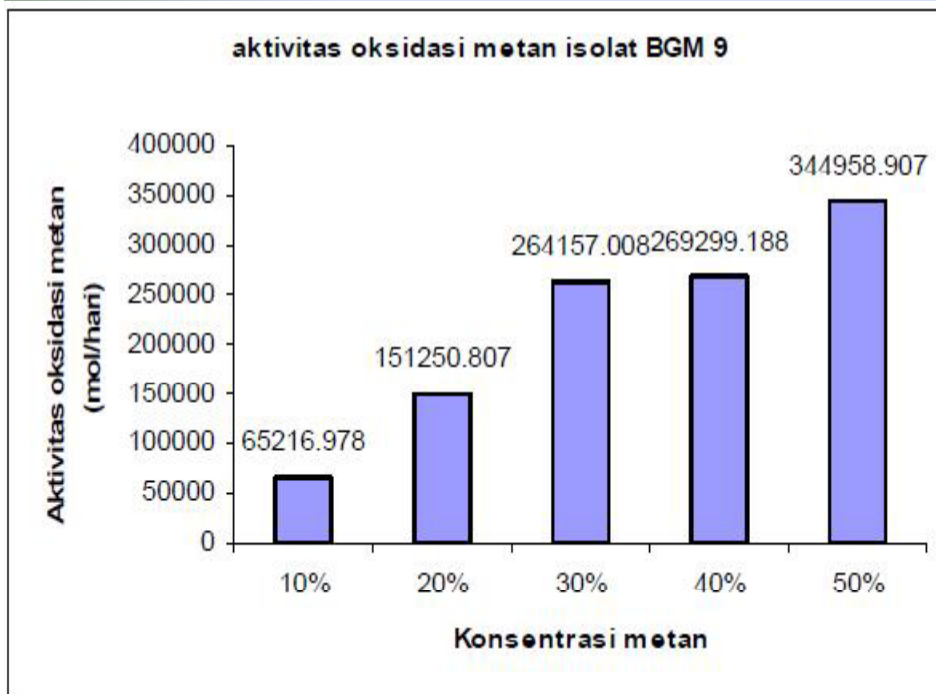
Aktivitas Oksidasi metan pada saturasi udara yang berbeda



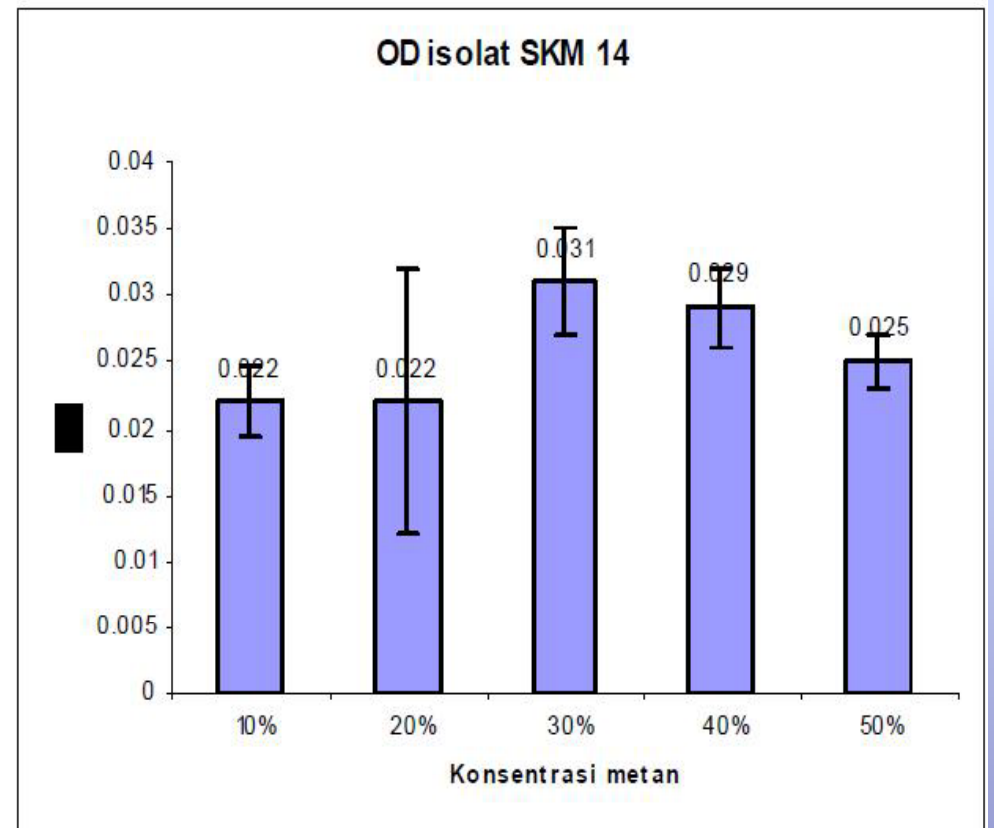
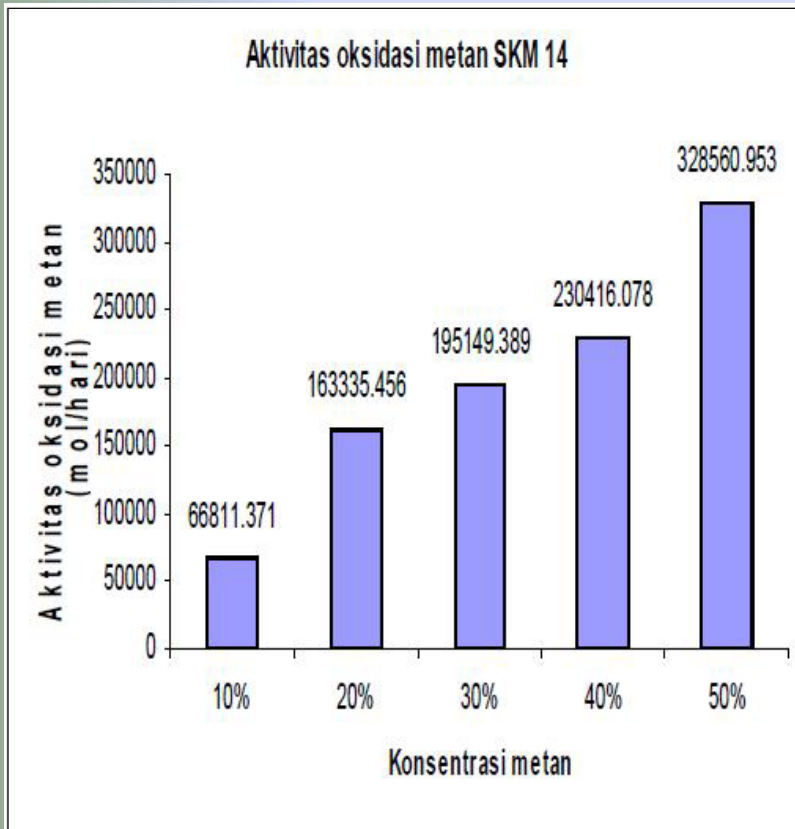
Aktivitas Oksidasi metan pada saturasi udara yang berbeda



Aktivitas Oksidasi metan pada konsentrasi metan berbeda



Aktivitas Oksidasi metan pada konsentrasi metan berbeda



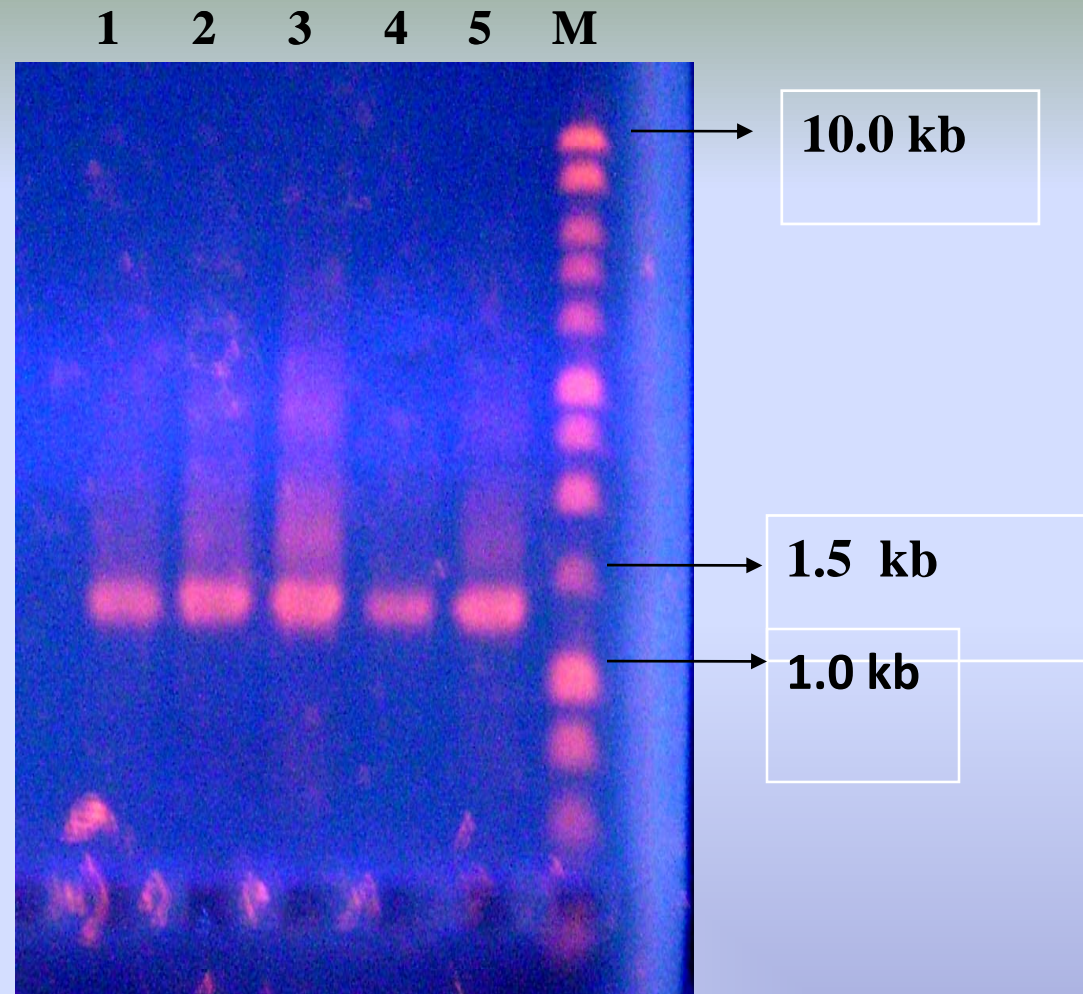
Tabel 1 Karakteristik morfologi sel dan pewarnaan Gram isolat-isolat bakteri metanotrof

Isolat	Bentuk dan penataan sel	Pewarnaan Gram
BGM 1	batang, rantai	-
BGM 2	bulat, rantai	-
BGM 3	batang, rantai	-
BGM 9	bulat, rantai	-
SKM 14	batang, rantai	-

Tabel 2 Ciri-ciri fisiologi isolat bakteri metanotrof

Isolat Bakteri Metanotrof	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
BGM 1	+/-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
BGM 2	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
BGM 3	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
BGM 9	-/+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SKM 14	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-

**Ket : 1.Nitrat (NO₂/N₂) 2. Triptofan 3. Glukosa 4. Arginin 5. Urea 6. Esculin ferric sitrat
7. Gelatin 8. 4-nitrophenil-βD-galaktopiranosida 9. Glukosa 10. Arabinosa
11. Manosa 12. Manitol 13. N-asetil-glukosamin 14. Maltosa 15. Potasium glukonat
16. Asam capric 17. Asam adipic 18. Asam malat 19. Trisodium sitrat 20. Asam penilasetik**



Gambar 1 Hasil elektroforesis dari amplifikasi gen 16S rRNA menunjukkan pita DNA berukuran ~1.3 kb. M: marker 1 kb DNA ladder, sumur 1: BGM 1, sumur 2: BGM 2, sumur 3: BGM 3, sumur 4: BGM 9, sumur 5: SKM 14

- Hasil BLAST-N sekuen gen 16S rRNA parsial dengan data GenBank isolat BGM 1

>emb|AJ414656.1| Methylocystis rosea 16S ribosomal RNA, type strain SV97T
Length=1438

Score = 475 bits (526), Expect = 1e-137
Identities = 533/714 (74%), Gaps = 14/714 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 145 TTGGNGGGTNAAGGCCTNCCCCGGCGACAATCCNTATCTGGNCTNAGAGGATGATCNCC 204
      |||| | ||| || || || || ||||| ||| || |||| | | ||||| |||| |
Sbjct 193 TTGGTGAGGTAAAAGCTCACCAAGGCAGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC 252

Query 205 CACATTGNGACTGAGACACGGCCNCACCTCCNATACGAGGCNCCACTGGGGAATATTGTN 264
      |||| | | ||||| ||||| |||| | |||| | | ||||| |||||
Sbjct 253 CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA 312

Query 265 CAATGGGCGCAAGCCTGATCCACCNTGCCCGTGAGTGATGAAAGCCCTATGGTTGTNA 324
      ||||| ||| ||||| ||||| || |||| | ||||| ||||| ||||| ||||| |
Sbjct 313 CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAAGCCCTAGGGTTGTAA 372

Query 325 AGCTCTTTTCCNNTGAAAATAATGACGGTNTTCCNAGAAGAAACCCNGNTATNTNTN 384
      ||||| || | || ||||| || | |||| | || | || ||
Sbjct 373 AGCTCTTTTCGCCAGGGACGATAATGACGGTACCTGGATAAGAAGCCCGGCTAACCTTCGT 432

Query 385 GCCNNCAGCCNCGGTAATACTAAANGGGGCTATCGTTGTTCTCAATTACTGNGCGTAAAG 444
      || | |||| | ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 433 GCCAGCAGCCCGGTAATAC-GAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTTACTGGGCGTAAAG 491

Query 445 CGCNCGTANGCGNATATTTATTTTCANGGGAGAAATCCCCAGCTCATCTCTGGAAGTCC 504
      || | |||| | || |||| | || |||| | ||||| |||| | ||||| |||||
Sbjct 492 CGCACGTAGGCGGATTTTAAAGTCAGGGGTGAAATCCCAAGGCTCAACCTTGGAAGTCC 551

Query 505 TTTGATACTGGGTATCTCTAGTATGGAAAAGGAGAGTGTAATTCAGTGTGTAGGTGAA 564
      ||||| |||| | || | || | |||| | || | |||| | |||||
Sbjct 552 TTTGATACTGGAAGTCTCGAGTCCGGGAGAGGTGAGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAA 611

Query 565 ATTCTTCATATATTTCTTCAGGAACACCNCTGGTGGAAAGGCGCNTCACTGGGCCCTACTG 624
      |||| | | ||||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| || |||||
Sbjct 612 ATTTCGT-AGATATTC-GCAAGAACACCAGTGG-CGAAGGCGGCTCACTGGCCCGGTACTG 668

Query 625 ACACTCAAGATGCTAAAAACGCGGACCAAACACCATTATATACCCTGCTGNNTCCCCNC 684
      || ||| || ||| ||| || | ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 669 ACGCTG-AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT-AGTCCACG- 725

Query 685 CCCNAAACAATNAATGTTGATCCGTCGGGCAGCTTGCTGTTTCGNNTGGCNCACCT-ANAC 743
      || |||| | || | | |||| | ||||| ||||| |||| | || | || |
Sbjct 726 CCGTAAACTATGGATGCT-AGCCGTTGGGCAGCTTGCTGTTC-AGTGGCGCAGCTAACGC 783

Query 744 ATTNAAACATNCNCCCTGGGGAGTACCGCNCNCCNAATAAAACTCTCA-GAANTNTCGNGG 802
      || | ||| | ||||| ||||| || | ||||| || ||| || || |
Sbjct 784 TTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGG 843

Query 803 GNCCCCCAA-CGGNGGAACATGTGNTTT-NTTNTAA-AAACNCGCAAAACNTT 853
      | || | || | || | ||||| || | || | || | |||| |
Sbjct 844 GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTT 897

```


- Hasil BLAST-N sekuen gen 16S rRNA parsial dengan data GenBank isolat BGM 3

```

> emb|AJ458508.1| Methylocystis parvus partial 16S rRNA gene, strain 57
Length=1403

Score = 361 bits (400), Expect = 1e-102
Identities = 572/823 (69%), Gaps = 26/823 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   GTGGCCGACGGGNGAATA-CNCGTGGNMCNCTACCTTTCTNNTTCGNAATNCTTCNGGGN 59
          ||||| ||||| || || ||||| | ||||| ||||| ||| ||| |||
Sbjct 56   GTGGCAGACGGGTGAGTAACCGCTGGGAACGTGCCTTTC-GGTTCCGAATAACTCAGGGA 114

Query 60   NNCTTGTACTACTACCCTGATNCCCCCTTCGGGNGAAATTAATTCTCCCTGATATATC 119
          ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||||| ||| ||| |||
Sbjct 115  AACTTGAG-CTAATACCG-GATACGCCCTTTGGGGGAAAAG-ATTTATTGCC-GAAAGATC 170

Query 120  NCGCCCGCCNTCNGATTNTCTNTMTGGMGAGGTAANGGCTCACCAGNGACGACTCATCAN 179
          ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||
Sbjct 171  G-GCCCGC-GTCCGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAATGGCGCACCAAGG-CGACG-ATCGG 226

Query 180  TATNTGGTCTGAGGANGATGATCACCACCTTTGNNCTGANACACGNCCCCTCTCCTAC 239
          || ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 227  TAGCTGGTCTGAG-AGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC 285

Query 240  GGGGGCANCNGMGNNTAATATTGCCTNTGGCGCGCCNCTGATCCACCCATGCCGG 299
          ||| ||||| || || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||
Sbjct 286  GGGAGGCAGCAGTGGGG-AATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGG 344

Query 300  NGTNGATNAANNCCTTAGGNITGMAANNCCTTTTGTCCGNNGAANATAATGACTGTNC 359
          || ||||| || ||||| || || ||||| || || ||||| || || ||||| || ||
Sbjct 345  TGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGACTCTTTTCG-CCAGGGACGATAATGACGGTAC 403

Query 360  CGNAANAATANCCCCGNMTANNTTCGTGCCANCACCCGCNNATATACAAAGGGNCTAG 419
          | ||| || || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||
Sbjct 404  CTGGATAAGAAGCCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAG 463

Query 420  CNTTGCTCAATAATCTCTGGGCNTAAAGGGCGCGTANGCANCCTCTTAAGTCGGGNGNG 479
          | ||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 464  CGTTGTTCCG-AATCACTGGGCGTAAAGCCACGCTAGGCGGATCT-ITTAAGTCAGGGGTG 521

Query 480  AAAGCCAGGNCTCATCCCTNGANTGCTTCNATACTGGATAGTCTTGTNCTTCGNAAG 539
          ||| ||| ||||| || || ||||| || ||||| ||||| ||||| || || |||||
Sbjct 522  AAATCCGAGGCTCAACCTCGGAAGTGCCTTTGATACTGGAG-GTCTCGAG-TCCGGGAG 579

Query 540  ATGTTGGTNNCACCTGCGGAGTGTAGAGNTGANNITTCGTAATATTCACAACACCACNGT 599
          | || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 580  AGGTGAGTGAAC-TGCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCACT 638

Query 600  GGNAGAAGGCGNCCNNGGTGNMCCTAATACNGACTCNGANGCGCAAAAGCGTGGAGCAGC 659
          || ||||| || || || ||||| || || ||||| || || ||||| || ||||| || ||
Sbjct 639  GGC-GAAGGCGG-CTCACTGGCCC-GGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG-GGAGC 694

Query 660  AAACGANTATTATANCCNTGNTACNCCNCCNTAAACGATNAATGCCNCCNGTGGGN 719
          ||||| || ||||| || || || || ||||| || ||||| ||||| || ||||| || ||
Sbjct 695  AAAC-AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATGCTAGCCGTTGGGG 753

Query 720  ATTTNCTCTTCAGNGGCGCATCTAACNCTTNAATCCTCCC-CCNGGGGAACACNNCCC 778
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 754  AGCATGCTCTTCAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATCCCGCTGGGGACTACGGTCCG 813

Query 779  AANA-TNANACTCAAANGATTGACGGGGCCCCCCAC-AGCGG 819
          || | | | ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||
Sbjct 814  AAGATTAANAACCAAAGGAATTGACGGGGCCCCCACAAGCGG 856

```

- Hasil BLAST-N sekuen gen 16S rRNA parsial dengan data GenBank isolat BGM 9

```

>|emb|AJ563935.1| Methylococcus capsulatus partial 16S rRNA gene, strain Texas
Length=1481

Score = 967 bits (1072), Expect = 0.0
Identities = 736/860 (85%), Gaps = 10/860 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 15  AGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGA 74
Sbjct 78  AGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGA 137

Query 75  AAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAACAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC 134
Sbjct 138  AACCCGAGCTAATACCGCATACGTCCTACGGG-AGGAAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCCG 196

Query 135  GCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGGATTAGCTAGITGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCA 194
Sbjct 197  GCAATAAGATGAGCCTACGTGCGGATTAGCTGGTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCA 256

Query 195  CGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGAC 254
Sbjct 257  CGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC 316

Query 255  TCCTACGGGAGGACAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG 314
Sbjct 317  TCCTACGGGAGGACAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG 376

Query 315  CCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGT 374
Sbjct 377  CCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACTTTAAGCAGGAAGGAGGGTGGG 436

Query 375  AAGTTAATACCTTGTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCAGGCTAAGTTCGTGCC 434
Sbjct 437  GTGTTAATACCTTGTGTTTTGACGTTACCTGCAGAATAAGCACCAGGCTAAGTTCGTGCC 496

Query 435  AGCAACCCCGGTAATACGAAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCG 494
Sbjct 497  AGCAGCCCGGTAATACGAAGGTTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCG 556

Query 495  CGTAGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCA 554
Sbjct 557  CGTAGGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATG 616

Query 555  TAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGC 614
Sbjct 617  ATACTGTCAGGCTCAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAAATTCCTGTGTAGCAGTGAATGC 676

Query 615  GTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGA 674
Sbjct 677  GTAGAGATCGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACACTGACGCTGA 736

Query 675  GGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCNCCNCGTAAACGA 734
Sbjct 737  GGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGA 796

Query 735  TGTCNACTANCCGTTGG-GATCCTTGAATCTTAGTGGCNCANCTANCNCGATAAGTCNA 793
Sbjct 797  TGTCAACTAGCCGTTGGAGGGGTTTAACTTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTTGA 856

Query 794  CC-CCTGGGGAGTACGGCC-CCAGGTT-AAACTC-AATG-ANTGAC-GGGGccccccAA 847
Sbjct 857  CCGCTGGGGAGTACGGCCCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCCACAA 916

Query 848  -CGNGGA-CATGTGNTTTA 865
Sbjct 917  GCGGTGGAGCATGTGTTTA 936

```

• Hasil BLAST-N sekuen gen 16S rRNA parsial dengan data GenBank isolat SKM 14

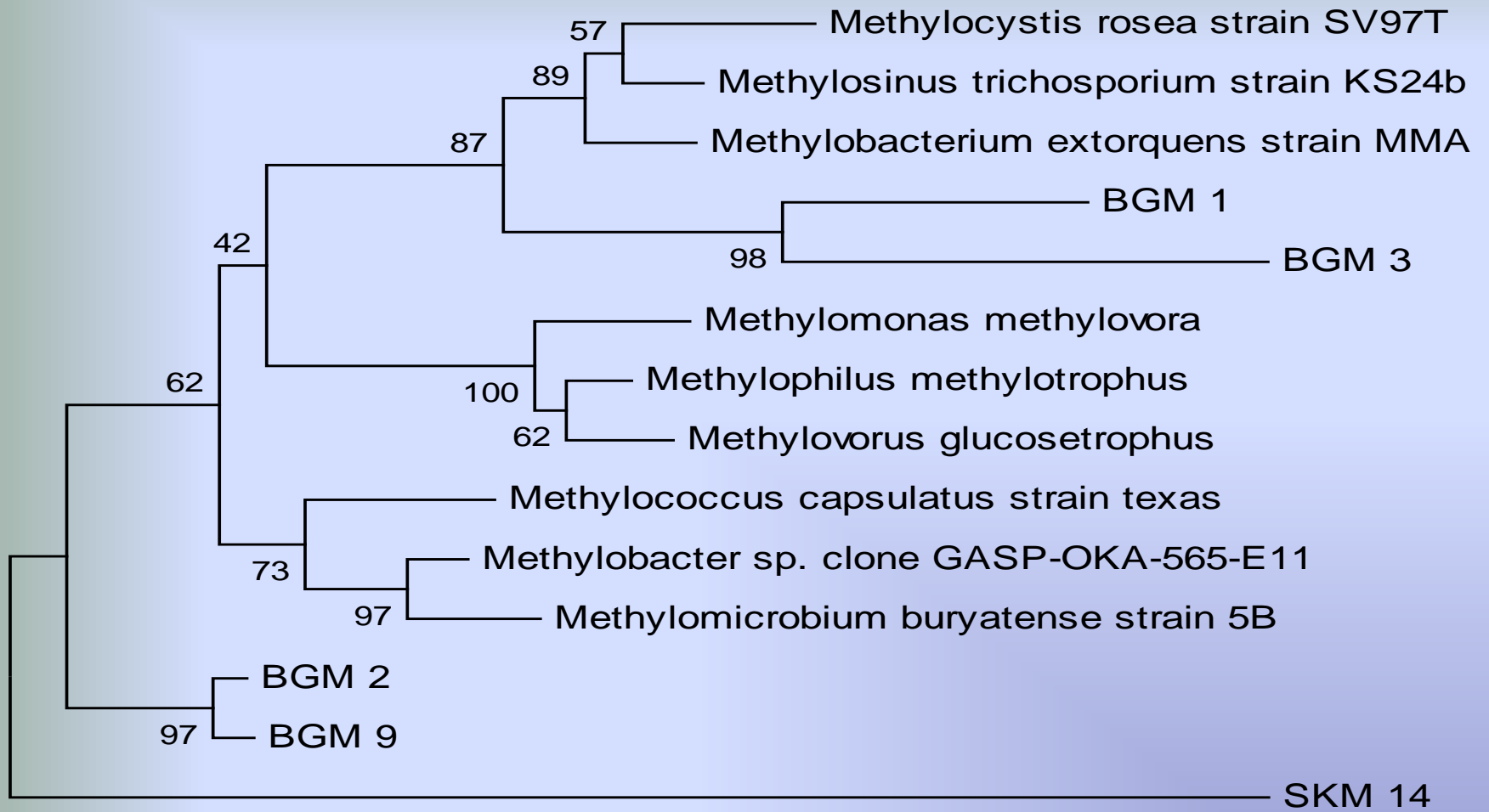
```
> gb|EU049502.1| Uncultured Methylobacter sp. clone GASP-OKA-565-E11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=882
```

```
Score = 64.4 bits (70), Expect = 1e-10  
Identities = 145/221 (65%), Gaps = 5/221 (2%)  
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 543 TCGTTACCTTGGATGTGAAAGCNCNGNCTCAACNTNCGAANTGCATCCTNAACTGNCTA 602  
      ||||| | ||||| || | ||||| | ||| ||||| ||||| | |  
Sbjct 526 TCGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCGA 585  
  
Query 603 GNTATTCTANGGAACANCGGTGGTGNAATTTCTNTNTNGCGCCTTNACTGCCTNTATAT 662  
      || | | | || ||| ||||| | | ||| | | ||| | ||||  
Sbjct 586 ACTAGAGTTGAGTAGAG-GGGAGTGGAATTTTCAGGTGTAGCG-GTGAAATGCGTAGATAT 643  
  
Query 663 ATGCAAAGACCACNAGTNGC-AANNGGAATCACNTGCCCTGATACTCACCCCTGAAGTGCN 721  
      || || || ||| ||| || || || || | || || | ||| || |||| || |  
Sbjct 644 CTG-AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC-CCTGGACTCAAACCTGACGCTGAGGTACG 701  
  
Query 722 AAAACGTGNGCNGCCAACAGGATTACATANCCTGGNAGNCC 762  
      ||| |||| | || ||||| ||| ||||| || ||  
Sbjct 702 AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC 742
```

Tabel 3 Hasil analisis sekuen gen 16S rRNA dengan menggunakan program BLAST-N

Isolat	Spesies Bakteri Metanotrof homolog	% identitas	No.akses
BGM 1	<i>Methylocystis rosea</i> strain SV97T	74%	AJ414656.1
BGM 2	<i>Methylococcus capsulatus</i> strain texas	83%	AJ563935.1
BGM 3	<i>Methylocystis rosea</i> strain SV97T	70%	AJ414656.1
BGM 9	<i>Methylococcus capsulatus</i> strain texas	85%	AJ563935.1
SKM 14	<i>Methylobacter</i> sp. Clone GASP-OKA-565-E11	65%	EU043582.1



0.05

KESIMPULAN TAHUN PERTAMA

Fiksasi N₂:

→ 4 isolat terbaik yaitu BGM 1, BGM 3, BGM 5, dan BGM 9.

Aktivitas Oksidasi metan :

→ 3 isolat terbaik : BGM 2, BGM 9 dan SKM 14

→ BGM 2 udara saturasi 10%

→ BGM 9 udara saturasi 50%.

→ SKM 14 udara saturasi 20%

Identifikasi berdasar sekuen gen16S rRNA:

→ BGM 1 \simeq *Methylocystis rosea* strain SV97T (74%)

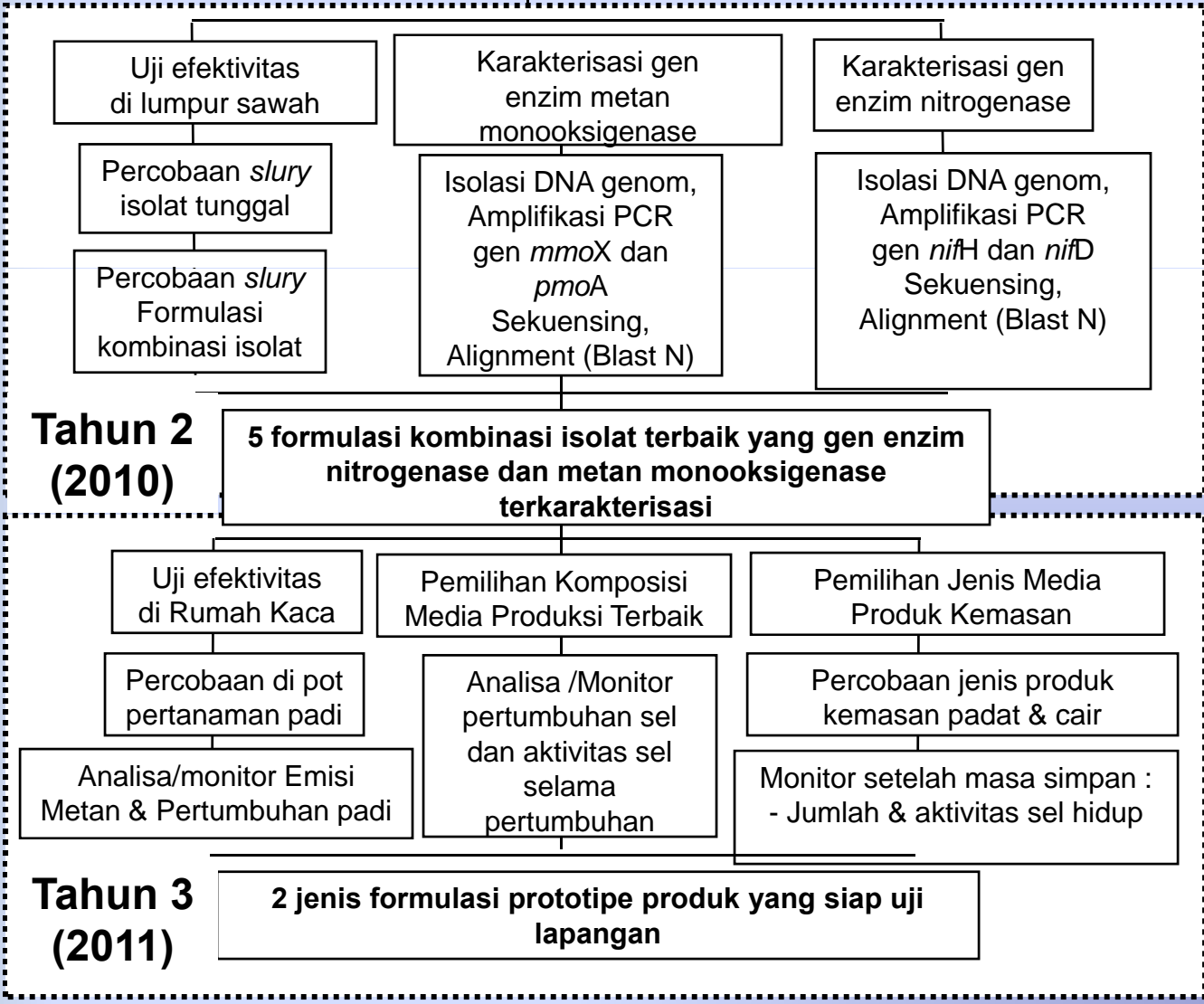
→ BGM 3 \simeq *Methylocystis parvus* strain 57 (69%),

→ BGM 2 dan BGM 9 \simeq *Methylococcus capsulatus* strain
texas (83% dan 85%),

→ SKM 14 \simeq *Methylobacter* sp. clone GASP-OKA-565-E11 (65%).

RENCANA PENELITIAN TAHUN SELANJUTNYA

Hasil penelitian Tahun I (2009)
5 Isolat terbaik terkarakterisasi aktivitas fiksasi N₂ dan Oksidasi metan yang teridentifikasi secara molekuler



Isolasi DNA

- Genomic DNA of selected isolates will be extracted using alkaline lyses methods (Sambrook *et al*, 1989).

Amplifikasi gen *pmoA* and *mmoX*

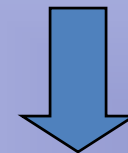
- Amplification of *pmoA* and *mmoX* genes will used specific primers (Bourne et al, 2001).

Primer	Sequence (5' to 3')	Target
A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG	<i>pmoA</i>
mb661	CCGGMGCAACGTCYTTACC	<i>pmoA</i>
<i>mmoXA</i>	ACCAAGGARCARTTCAAG	<i>mmoX</i>
<i>mmoXB</i>	TGGCACTCRTARCGCTC	<i>mmoX</i>

- PCR condition: (Bourne et al, 2001).
- initial denaturation : 96°C for 5 min,
- Denaturation : 94°C for 1 min,
- Annealing : 56°C for 1 min,
- Extention : 72°C for 1 min.
- A final extention : 72°C for 5 min

} 30 cycles

PCR Products



Sequencing and alignment

Amplifikasi, Sekuensing dan Aligment gen *nifH* dan *nifD*

Amplifikasi gen *nifH* dan *nifD* menggunakan primer spesifik.

Primer den *nifH* (Dedysh *et al*, 2004). :

→F1 (TAYGGNAARGGNGGNATYGG NAARTC)

→*nifH*-R (ADNGCCATCATYCTNCC)

Primer gen *nifD*(Dedysh *et al*, 2004). :

→*nifHD*-F (CAGGAAATCT ACATCGTCATGTC)

→*nifD*-R (TCCCANGARTGCATCTGRC GGA)

Proses PCR:

→tahapan denaturasi awal (94°C 30 detik),

→ 35 siklus 92°C 1 menit, 55°C 1 menit, dan 72°C 1 menit.

→Final extention: 72°C selama 5 menit (Dedysh *et al*, 2004).

Thank You

