



BAHAN DAN METODE

Bahan

Isolat yang digunakan yaitu isolat tipe liar *Pseudomonas* sp. Crb 17, *Pseudomonas* sp. Crb 64, dan *Bacillus* sp. Cr 76 yang diisolasi dari rizosfer tanaman kedelai di daerah Cirebon (Wahyudi & Mubarik 2008). Media kultur yang digunakan ialah media agar dan cair King's B (20 g pepton; 15 ml gliserol; 1,5 g K_2HPO_4 ; 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 15 g agar; 1000 ml akuades) untuk *Pseudomonas* sp. serta *Nutrient Agar/NA* dan *Nutrient Broth/NB* (23 g NB; 15 g agar; 1000 ml akuades) untuk *Bacillus* sp.

Metode

Mutasi Spontan dengan Rifampisin sebagai Penanda

Isolat-isolat tipe liar yang telah diremajakan dimutasi secara spontan dengan cara ditumbuhkan pada media cair (King's B atau NB) dengan penambahan konsentrasi rifampisin secara bertahap dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi, berturut-turut 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Mula-mula, isolat ditumbuhkan dalam media cair + rifampisin 25 $\mu\text{g/ml}$ lalu diinkubasi selama tiga hari di inkubator bergoyang. Setelah itu, kultur sebanyak 1,5 ml dipindahkan ke dalam media cair baru yang telah ditambahkan rifampisin dengan konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 50 $\mu\text{g/ml}$, kemudian prosesnya berulang untuk media dengan penambahan rifampisin 100 $\mu\text{g/ml}$. Sel bakteri yang mampu tumbuh pada media dengan penambahan rifampisin 100 $\mu\text{g/ml}$ merupakan sel mutan yang diinginkan (mutan resisten rifampisin 100 $\mu\text{g/ml}$). Selanjutnya, dilakukan pengenceran serial terhadap kultur mutan tersebut dan disebar ke dalam media agar cawan (King's B atau NA) + rifampisin 100 $\mu\text{g/ml}$, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni tunggal yang didapatkan ditumbuhkan kembali ke dalam media agar miring (King's B atau NA) + rifampisin 100 $\mu\text{g/ml}$ dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Dengan cara ini, didapatkan biakan murni mutan resisten rifampisin 100 $\mu\text{g/ml}$.

Uji Resistensi Antibiotik sebagai Faktor Seleksi

Jenis antibiotik yang digunakan dalam pengujian yaitu ampicilin, streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, dan kanamisin pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$. Masing-masing jenis

antibiotik ditambahkan pada media agar cawan King's B dan NA. Tiap isolat mutan kemudian ditumbuhkan pada media tersebut dengan cara digores dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Inokulasi Mutan ke Benih Kedelai

Benih kedelai varietas Willis terlebih dahulu disterilisasi dengan cara direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, diikuti dengan perendaman dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 1% selama 5 menit, dan dibilas dengan aquades steril ± 5 kali. Lalu, benih tersebut direndam semalaman dalam aquades steril. Setelah itu, benih direndam dalam suspensi isolat mutan kisaran konsentrasi 10^8 sel/ml selama 60 menit. Pengukuran konsentrasi sel mutan dilakukan dengan cara suspensi isolat mutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer (*Thermo Spectronic Genesys 20*) pada panjang gelombang (λ) 620 nm, kemudian nilai absorbansi yang diperoleh dibandingkan dengan kurva standar masing-masing isolat (Lampiran 1). Setelah benih direndam dalam suspensi isolat mutan, kemudian dilakukan pengenceran serial terhadap 1 butir benih hingga faktor pengenceran 10^{-6} dan tiga pengenceran terakhir disebar ke dalam media agar (King's B atau NA) + rifampisin 100 $\mu\text{g/ml}$ + ampicilin 50 $\mu\text{g/ml}$ untuk mengetahui populasi awal mutan yang menempel pada permukaan benih sebelum ditanam (minggu ke-0). Benih yang sudah diinokulasi lainnya dikecambahkan dalam cawan Petri steril berisi kertas saring yang telah dibasahi dengan aquades steril, kemudian diinkubasi selama 2 hari dalam keadaan gelap. Benih yang berkecambah kemudian ditanam ke dalam polibag berisi tanah steril dan non steril. Pada tanah steril, permukaan atas tanah ditutup dengan pasir steril untuk menjaga kontak langsung permukaan tanah dengan udara. Tiap polibag ditanami dua kecambah kedelai pada lubang yang berbeda. Setelah kecambah tumbuh, satu tanaman dicabut, sehingga hanya tersisa satu tanaman di dalam polibag. Proses penanaman ini dilakukan sebanyak tiga ulangan, baik pada tanah steril maupun non-steril. Analisis data dilakukan dengan uji T berpasangan pada taraf 5 % menggunakan program SAS.

Pemantauan Daya Hidup dan Kolonisasi Isolat Mutan pada Rizosfer Tanaman Kedelai

Pemantauan perkembangan populasi isolat mutan di rizosfer kedelai dilakukan

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Diarangi 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 IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



setiap minggu hingga minggu ke-6 setelah penanaman, baik pada tanah steril maupun non-steril. Pengambilan kembali isolat mutan dari rizosfer dilakukan dengan pencawanan tanah rizosfer. Caranya adalah akar beserta tanah rizosfer yang menempel dipotong dan diencerkan dalam 100 ml larutan garam fisiologis 0,85%, kemudian diletakkan pada inkubator bergoyang selama 2 jam untuk melepaskan tanah rizosfer yang mengandung sel-sel bakteri. Setelah itu, dilakukan pengenceran serial sampai faktor pengenceran 10^{-4} dan tiga pengenceran terakhir disebar dalam agar cawan (King's B atau NA) + rifampisin 100 µg/ml + ampisilin 50 µg/ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh dihitung dan dinyatakan dalam satuan sel/g berat kering tanah rizosfer (sel/g). Berat kering tanah rizosfer ditentukan dengan cara menguapkan (dikeringudarkan) suspensi tanah rizosfer kemudian dikeringkan dalam oven 105°C selama 4 jam.

HASIL

Isolat Mutan Resisten Rifampisin

Isolat-isolat mutan resisten rifampisin 100 µg/ml berhasil didapatkan dari isolat tipe liar *Pseudomonas* sp. Crb 17, Crb 64, dan *Bacillus* sp. Cr 76 yang mampu tumbuh pada media dengan penambahan rifampisin 100 µg/ml setelah dilakukannya mutasi secara spontan.

Resistensi Antibiotik Isolat Mutan

Hasil pengujian resistensi antibiotik menunjukkan bahwa ketiga isolat mutan resisten terhadap antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 50 µg/ml (Tabel 1). Uji resistensi

antibiotik ini dilakukan untuk seleksi lebih lanjut terhadap bakteri uji, sehingga pada saat proses pencawanan tanah rizosfer, kemungkinan tumbuhnya bakteri *indigenus* yang jumlahnya mencapai $2,2 \times 10^9$ sel/g (9,3 log sel/g) (Gambar 2A) semakin kecil.

Dengan demikian, media yang digunakan untuk menyeleksi mutan juga sekaligus untuk perhitungan populasi mutan (Gambar 2 C-E) mengandung dua jenis antibiotik, yaitu rifampisin 100 µg/ml dan ampisilin 50 µg/ml. Media tersebut juga digunakan untuk perlakuan kontrol, yaitu pencawanan tanah rizosfer yang tidak diinokulasi dengan bakteri uji. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada mikroorganisme *indigenus* yang mampu tumbuh pada media dengan penambahan dua jenis antibiotik tersebut, baik pada media NA (Gambar 2B) maupun King's B (gambar tidak ditampilkan).

Inokulasi Mutan ke Benih Kedelai

Berdasarkan hasil inokulasi isolat mutan ke benih kedelai didapatkan bahwa jumlah populasi awal mutan yang menempel pada satu butir benih kedelai adalah sebesar 5,7 log sel/benih untuk mutan Crb 17 dan 5,5 log sel/benih untuk mutan Crb 64 dan Cr 76. Masing-masing jumlah populasi awal mutan pada benih kedelai ini selanjutnya berfluktuasi di dalam tanah rizosfer setelah benih ditanam ke dalam tanah steril dan non steril. Dinamika populasinya pada tanah rizosfer dipantau dari minggu ke-1 hingga minggu ke-6 setelah tanam.

Tabel 1 Uji resistensi antibiotik isolat-isolat mutan

| Jenis Antibiotik (Konsentrasi 50 µg/ml) | Isolat Mutan | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | <i>Pseudomonas</i> sp. Crb 17 | <i>Pseudomonas</i> sp. Crb 64 | <i>Bacillus</i> sp. Cr 76 |
| Ampisilin | + | + | + |
| Streptomisin | + | + | - |
| Kloramfenikol | + | - | - |
| Tetrasiklin | + | - | - |
| Kanamisin | - | - | - |

Keterangan : + = resisten
- = sensitif