

## Karakterisasi Sejumlah Isolat Bakteri Fotosintetik Anoksigenik untuk Pupuk Hayati Padi

### *(Characterization of a Number of Anoxygenic Photosynthetic Bacteria Isolates for Biofertilizer in The Rice Field)*

CECILIA A. SEUMAHU, ANTONIUS SUWANTO\*, DAN ARIS TJAHOLEKSONO

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144  
Tel. 62-251-625965, Fax. 62-251-621724, E-mail: asuwanto@indo.net.id

Diterima 15 Juli 1997/Disetujui 25 November 1997

It has been known that in submerged rice field, harvest can always be produced even without the use of chemically synthesized fertilizer. Microbiological studies in the rice fields indicated that many  $N_2$ -fixing bacteria, especially photosynthetic bacteria were present in high population. These groups of bacteria were apparently the major contributors for sustaining nitrogen supply in the rice field. In this study, ten anoxygenic photosynthetic bacteria isolates from rice field were analysed genetically employing schizotyping. Those isolates were further tested for their ability to support rice growth in culture media lacking fixed nitrogen. The results showed that all of the anoxygenic photosynthetic bacteria isolates analyzed were able to grow in Sistrom media without nitrogen. In addition, the leaf color, vigor and dry weight of the plants demonstrated better growth when compared to the negative control plants that were not inoculated with anoxygenic photosynthetic bacteria. We also observed that the roots treated with anoxygenic photosynthetic bacteria were significantly longer than the ones that were not inoculated with bacteria or only inoculated with *E. coli*.

#### PENDAHULUAN

Di Asia Tenggara, padi umumnya dapat tumbuh dengan baik tanpa pemupukan. Produksinya memang relatif rendah, namun hasil panen dapat terus diperoleh (Kobayashi *et al.* 1967). Penambatan nitrogen hayati, dalam hal ini penambatan  $N_2$ , diperkirakan merupakan faktor utama yang memberikan kontribusi kesuburan, baik pada tanah sawah maupun tanah lainnya (Watanabe & Lee 1977). Penambatan nitrogen secara hayati ini sangat penting karena nitrogen di alam mempunyai kecenderungan untuk berada dalam bentuk gas (Paul & Clark 1989).

Kobayashi *et al.* (1967) melaporkan bahwa mikroorganisme fotosintetik tersebar secara luas di lahan-lahan sawah basah Asia Tenggara, yang dikenal sebagai daerah tropis dengan suhu minimum yang tinggi dan intensitas cahaya matahari yang cukup besar, sehingga berbagai macam alga penambat nitrogen dan bakteri fotosintetik dapat hidup dengan baik. Dalam kondisi lahan tergenang, sianobakter dan bakteri fotosintetik anoksigenik, sebagai organisme diazotrof, dapat menambat  $N_2$  dengan menggunakan energi yang berasal dari cahaya yang pada gilirannya memasok kebutuhan nitrogen tanaman. Istilah kemampuan penambatan nitrogen dalam tulisan ini berarti penambatan  $N_2$  (diazotrofi).

Semua bakteri fotosintetik anoksigenik (BFA) yang telah dilaporkan bersifat diazotrof dengan kemampuan penambatan nitrogen yang cukup besar. Hal ini ditunjukkan

oleh adanya aktivitas nitrogenase yang cukup tinggi, terutama pada *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides* dan *Rhodospseudomonas viridis* (Madigan *et al.* 1984). Bakteri fotosintetik anoksigenik dapat hidup secara aerobik, anaerobik maupun secara fermentasi (Brock & Madigan 1991). Selain itu juga mampu menggunakan cahaya spektrum merah sampai infra merah, tahan terhadap herbisida tertentu dan mampu mendetoksikasi  $H_2S$  (Habte & Alexander 1980). Dilaporkan pula bahwa bakteri fotosintetik anoksigenik mampu hidup dalam kondisi gelap (sampai kedalaman 8 cm di dalam tanah) sehingga memiliki lingkungan hidup yang lebih luas (Kobayashi *et al.* 1967), dan memiliki ketahanan yang tinggi terhadap oksidan logam tanah jarang (*rare earth oxides and oxyanions*) (Moore & Kaplan 1992).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan inokulum bakteri fotosintetik anoksigenik terhadap pertumbuhan tanaman padi serta analisis keragaman genetik sejumlah isolat menggunakan Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

#### BAHAN DAN METODE

**Analisis Total DNA Genom.** Pembuatan gel sisipan untuk analisis total DNA genom dilakukan sesuai metode Smith dan Cantor (1987) sedangkan pemotongan DNA dengan enzim restriksi *AseI* dilakukan seperti yang dilaporkan Suwanto dan Kaplan (1989). Pemisahan DNA genom yang telah dipotong dilakukan dengan menggunakan elektroforesis medan berpulsa (PFGE) pada piranti CHEF-DRII (BioRad, Richmond, CA). Kondisi elektroforesis yang

\* Penulis untuk korespondensi

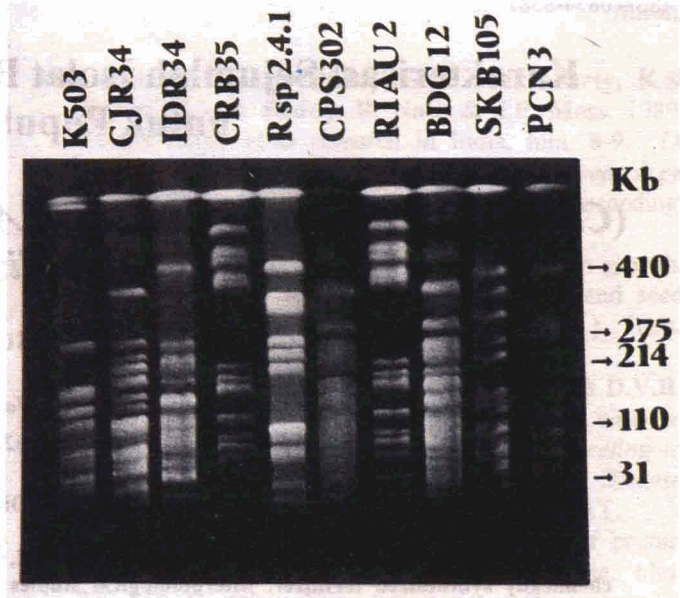
digunakan adalah sebagai berikut: waktu pulsa awal (It) 20 detik, waktu pulsa akhir (Ft) 50 detik, lamanya elektroforesis (Rt) 20 jam dengan tegangan listrik 180 V, dan konsentrasi agarose 1% (Sea Kem GTG, FMC Bioproducts).

**Pengujian Kemampuan Hidup Isolat BFA pada Media Tanpa Nitrogen.** Isolat BFA yang digunakan merupakan koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, PAU Bioteknologi, IPB. Semua isolat disimpan dalam larutan gliserol 10% pada suhu  $-65^{\circ}\text{C}$ . Seleksi isolat-isolat bakteri fotosintetik anoksigenik dilakukan dengan mengambil 200  $\mu\text{l}$  suspensi sel bakteri pada kepekatan  $10^8$  sel/ml lalu diinokulasikan pada media Sistrom tanpa nitrogen dalam tabung-tabung berulir (Volume  $\pm$  8 ml). Inkubasi dilakukan secara statis pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  dengan lampu tungsten 40 W sebagai sumber cahaya pada jarak 25 cm (Lueking *et al.* 1978). Penghitungan sel dilakukan setelah kultur diinkubasi selama enam hari.

**Pengaruh BFA terhadap Pertumbuhan Padi.** Satu ml suspensi sel (kepekatan  $\pm$   $10^7$  sel/ml) dicuci sebanyak dua kali dengan menggunakan garam fisiologis (0.85% NaCl). Kemudian diinokulasikan pada tanaman padi yang telah dikedambahkan selama 7 hari di dalam botol-botol selai berisi kertas serap (tissue tidak berparfum) yang telah dibasahi larutan hara tanpa nitrogen (Yoshida *et al.* 1976). Untuk kontrol media yang mengandung nitrogen, larutan hara ditambahi 0.05% (w/v)  $\text{KNO}_3$ . Sebelum dikedambahkan, benih padi (varietas IR 64) didesinfeksi permukaannya dengan cara mencelupkan 2X2 menit dalam etanol 70% lalu dibilas 1X5 menit dalam akuades steril. Pengujian ini dilakukan terhadap empat macam isolat (K503, RIAU2, SKB105 dan *R. sphaeroides* 2.4.1; untuk selanjutnya *R. sphaeroides* disingkat *R. sp* 2.4.1) yang diinokulasikan secara terpisah, maupun dengan kombinasi antar isolat. Suhu rumah kaca menunjukkan kisaran suhu harian yang berkisar  $26-30^{\circ}\text{C}$  pada malam hari dan  $27-37^{\circ}\text{C}$  pada siang hari, dengan kelembaban nisbi 80-87%. Berat kering tanaman padi diukur pada umur 14 hari. Data yang diperoleh kemudian diuji dengan menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) serta uji Duncan (Gaspersz 1991).

## HASIL

Hasil schizotyping ditunjukkan dengan perbedaan jumlah dan distribusi pita-pita DNA hasil pemotongan enzim restriksi *AseI*. Pola pita-pita tersebut pada umumnya bersifat khas untuk tiap isolat (Gambar 1). Pertumbuhan bakteri fotosintetik anoksigenik pada media tanpa nitrogen terlihat dari penampakan fisik media yang keruh dan berwarna merah bata seperti pada Gambar 2 yang diiringi peningkatan jumlah sel bakteri (Tabel 1). Pada umumnya tanaman padi yang diberi perlakuan inokulasi BFA menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik daripada tanaman kontrol yang tidak diberi nitrogen terikat. Semua galur-galur BFA yang telah dideskripsikan bersifat diazotrof (Robert & Ludden 1992). Oleh karena itu, kontribusi nitrogen terikat akibat inokulasi BFA merupakan faktor yang tak dapat diabaikan dalam menentukan kebugaran tanaman. Pengaruh inokulasi BFA terhadap pertumbuhan tanaman padi dapat



Gambar 1. Skisotipe *AseI* dari sepuluh isolat bakteri fotosintetik anoksigenik.

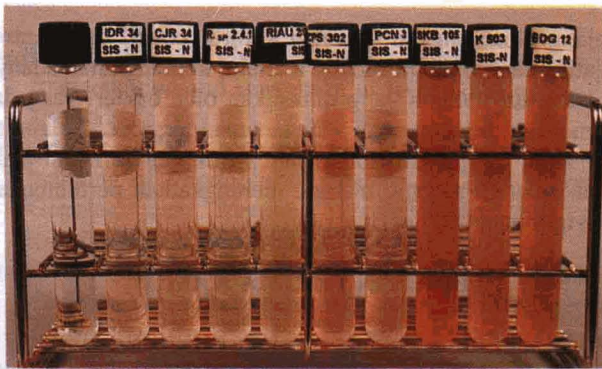
Tabel 1. Jumlah sel dari sembilan isolat bakteri fotosintetik anoksigenik yang ditumbuhkan di dalam media sistrom tanpa nitrogen pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  secara fotosintetik selama enam hari.

Kode isolat	Jumlah sel/ml pada ulangan pertama	Jumlah sel/ml pada ulangan kedua	Rata-rata jumlah sel/ml
SKB105	$9.68 \times 10^{11}$	$1.81 \times 10^{10}$	$4.93 \times 10^{11}$
BDG12	$7.81 \times 10^{11}$	$1.39 \times 10^{11}$	$4.60 \times 10^{11}$
K503	$7.20 \times 10^{10}$	$1.39 \times 10^{11}$	$1.05 \times 10^{11}$
RIAU2	$4.93 \times 10^9$	$6.52 \times 10^{12}$	$3.26 \times 10^{12}$
PCN3	$3.43 \times 10^9$	$1.48 \times 10^{11}$	$7.57 \times 10^{10}$
CPS302	$2.55 \times 10^9$	$3.06 \times 10^{10}$	$1.66 \times 10^{10}$
CJR34	$7.56 \times 10^8$	$2.82 \times 10^{10}$	$1.45 \times 10^9$
<i>R. sp</i> 2.4.1	$6.21 \times 10^8$	$1.69 \times 10^{12}$	$8.45 \times 10^{11}$
IDR34	$3.49 \times 10^8$	$3.85 \times 10^{11}$	$1.93 \times 10^{11}$

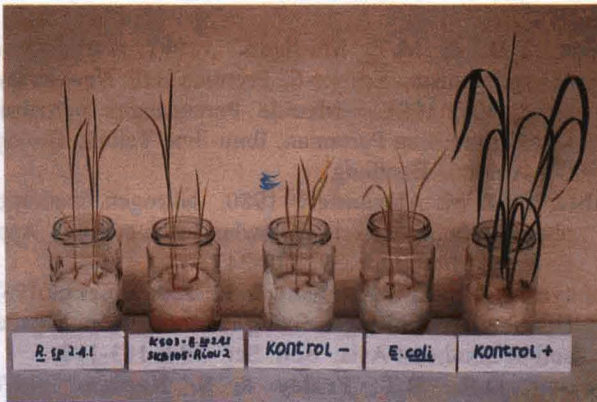
dilihat pada Gambar 3. Pada penelitian ini juga teramat bahwa akar tanaman yang diinokulasi bakteri lebih panjang dibandingkan akar tanaman yang tidak diinokulasi (Gambar 4).

## PEMBAHASAN

**Analisis DNA Genom Total dengan Schizotyping.** Hasil analisis DNA total yang diperoleh dengan menggunakan elektroforesis medan berpulsa (PFGE) menunjukkan sejumlah pita-pita DNA hasil pemotongan enzim restriksi *AseI* yang dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk melihat keragaman isolat. Keragaman isolat perlu diketahui sebelum melakukan uji pembuktian perbedaan isolat secara genetik. Analisis DNA genom total dengan menggunakan enzim restriksi yang memotong jarang dan dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis medan berpulsa yang disebut *Schizotyping*, merupakan metode yang sangat



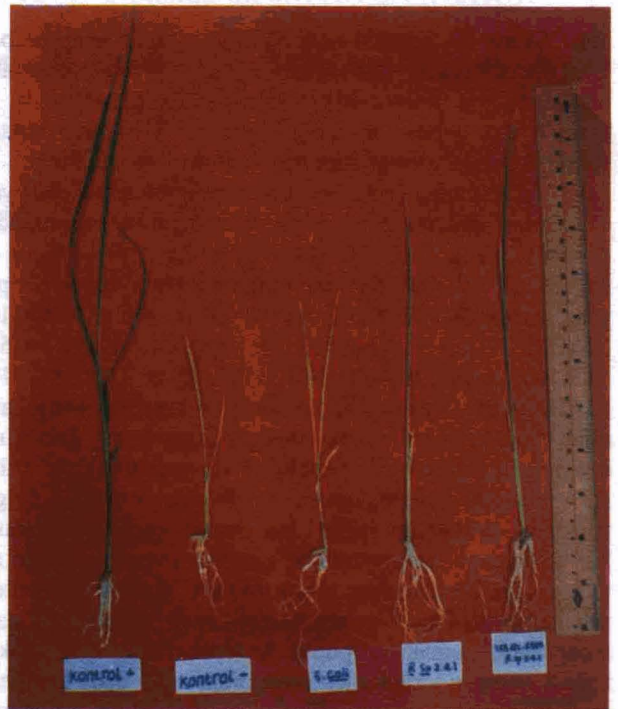
Gambar 2. Uji kemampuan tumbuh bakteri fotosintetik anoksigenik pada media sistrom tanpa nitrogen (tabung yang paling kiri hanya berisi media sistrom tanpa nitrogen).



Gambar 3. Pengaruh inokulasi bakteri fotosintetik anoksigenik terhadap pertumbuhan tanaman padi.

diskriminatif dan dapat diandalkan (Suwanto & Kaplan 1992). Schizotyping mampu membedakan patovar-patovar *X. campestris* dan galur-galur *X. campestris* pv. *glycines*, *X. campestris* pv. *glycines* 8ra dan *X. campestris* pv. *campestris* NRRL-B-1459 yang secara morfologi dan fisiologi sulit dibedakan (Rosana *et al.* 1995). Selain itu, schizotyping juga mampu menampilkan variasi genetik galur *X. campestris* di dalam patovar *glycines* yang diperoleh dari lokasi geografis berbeda di Pulau Jawa (Rukayadi 1995).

Berdasarkan pola pita PFGE (skisotipe *AseI*) terlihat bahwa dari sepuluh isolat yang digunakan ternyata ada dua isolat yang menunjukkan skisotipe *AseI* yang mirip yaitu isolat CRB35 dan RIAU2. Selain itu teramati pula bahwa skisotipe *AseI* dari isolat RIAU2 menampilkan pita tambahan berukuran sekitar 30,4 kb dan 26,8 kb. Adanya pita tambahan ini mungkin disebabkan oleh adanya perbedaan ukuran atau jumlah plasmid endogenus. Adanya plasmid endogenus unik pada isolat RIAU2 ini sedang dipelajari pada penelitian yang terpisah. Untuk pengamatan selanjutnya hanya digunakan satu isolat saja yaitu RIAU2. Delapan isolat lainnya menampilkan pola pita yang berbeda sehingga dapat dikatakan bahwa isolat-isolat ini benar-benar berbeda satu terhadap yang lain secara genetik dan dapat digunakan dalam pengujian kemampuan penambatan nitrogen dan pengaruhnya pada pertumbuhan padi.



Gambar 4. Pengaruh inokulasi bakteri terhadap pertumbuhan akar tanaman padi.

**Pertumbuhan Bakteri Fotosintetik Anoksigenik pada Media Tanpa Nitrogen.** Sembilan isolat yang diuji kemampuan hidupnya dalam media tanpa nitrogen terikat, menunjukkan kemampuan bakteri untuk tumbuh. Hal ini terlihat dari warna media yang menjadi keruh dan bertambahnya populasi bakteri tersebut seperti terlihat pada Tabel 1.

Bakteri-bakteri tersebut menunjukkan kemampuan tumbuh yang hampir sama, yang terlihat dari jumlah sel yang tidak berbeda nyata antara satu isolat dengan isolat yang lain. Kemampuan penambatan nitrogen (diazotrofi) yang dimiliki oleh kesembilan isolat ini mungkin disebabkan adanya enzim nitrogenase konvensional (dengan kofaktor molybdenum) seperti yang terdapat pada bakteri-bakteri penambat nitrogen dari kelompok Proteobacteria (Robert & Ludden 1992). Untuk melakukan verifikasi sifat diazotrofi isolat BFA perlu dilakukan asai yang dapat menentukan aktivitas nitrogenase secara kuantitatif, seperti *acetylene reduction assay*.

**Pertumbuhan Tanaman Padi yang di Inokulasi BFA.** Tanaman padi yang diberi perlakuan inokulasi BFA menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan tanaman padi kontrol negatif yang hanya diberi larutan hara tanpa nitrogen atau yang diinokulasi dengan *E. coli*. Warna daun dari tanaman padi yang diinokulasi bakteri fotosintetik anoksigenik lebih hijau, postur tanaman juga lebih tinggi. Walaupun demikian pertumbuhan tanaman padi yang diberi bakteri fotosintetik anoksigenik tidak sebaik tanaman kontrol positif yang diberi larutan hara dengan penambahan 0,05%  $KNO_3$ . Hal ini diduga karena di habitat alami, bakteri berinteraksi dengan mikroorganisme

lain. Selain itu, kondisi fisik dan kimia tanah yang berbeda turut menentukan. Kobayashi *et al.* (1967) menemukan bahwa bakteri fotosintetik selalu berada dalam suatu kelompok dan berkorelasi positif dengan kehadiran bakteri-bakteri kemoheterotrof atau kemoautotrof penambat N<sub>2</sub>.

Uji statistika terhadap berat kering tanaman padi yang diinokulasi bakteri fotosintetik anoksigenik menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata pada taraf 5% (Tabel 2). Perbedaan tersebut terlihat terutama pada tanaman padi yang diinokulasi dengan isolat K503, *R. sp* 2.4.1-SKB105-RIAU2, *R. sp* 2.4.1-K503, *R. sp* 2.4.1-RIAU2-K503-SKB105, *R. sp* 2.4.1-K503-SKB105, *R. sp* 2.4.1, SKB105-RIAU2, RIAU2 dibandingkan dengan tanaman yang hanya diberi larutan hara tanpa nitrogen atau yang diinokulasi dengan *E. coli*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa BFA mampu meningkatkan profil pertumbuhan (vigor) tanaman. Walaupun bakteri fotosintetik anoksigenik mungkin tidak dapat menggantikan peranan pupuk nitrogen sintetis secara keseluruhan, tetapi bakteri ini memiliki potensi sebagai penambat nitrogen hayati yang diharapkan dapat mengurangi pemakaian pupuk sintetis. Kemungkinan kontribusi nitrogen terikat oleh BFA didasarkan pada hasil-hasil penelitian yang menunjukkan bahwa semua galur-galur BFA yang telah dideskripsikan sejauh ini adalah bakteri diazotrof (Robert & Ludden 1992). Penelitian yang lebih intensif mengenai interaksi bakteri fotosintetik dengan mikroorganisme lain dalam habitat alaminya juga akan sangat menentukan keberhasilan dalam mengembangkan pupuk hayati yang andal dan konsisten.

Selain pertumbuhan tanaman yang baik, teramati pula bahwa pertumbuhan akar tanaman padi yang diinokulasi bakteri fotosintetik anoksigenik dan *E. coli* relatif lebih

panjang dibandingkan tanaman kontrol positif dan kontrol negatif. Saat ini kami sedang meneliti kemungkinan adanya zat pengatur tumbuh yang dihasilkan oleh bakteri yang dapat memacu pertumbuhan akar tanaman tersebut. Selain itu juga akan diteliti distribusi dan profil gen *nifHDK* pada isolat-isolat BFA yang mampu meningkatkan pertumbuhan dan vigor tanaman padi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Bersaing V/1, Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat dengan Kontrak Nomor: 08/P2 IPT/DPPM/96/PHB V/1/1996.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Brock, T.D. & M.T. Madigan.** 1991. *Biology of Microorganism*. Ed. ke-6. Prentice Hall. New Jersey.
- Gaspersz, V.** 1991. *Metode Perancangan percobaan Untuk Ilmu-ilmu Pertanian, Ilmu-ilmu Teknik, Biologi*. CV Armico. Bandung.
- Habte, M. & M. Alexander.** 1980. Nitrogen fixation by photosynthetic bacteria in lowland rice culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 342-347.
- Kobayashi, M., E. Takahashi & K. Kawaguchi.** 1967. Distribution of nitrogen fixing microorganism in paddy soil of Southeast Asia. *Soil. Sci.* **104**: 113-118.
- Lueking, D.R., R.T. Fraley & S. Kaplan.** 1978. Intracytoplasmic membrane synthesis in synchronous cell population of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **233**: 451-457.
- Madigan, M., S.S. Cox & R.A. Stegeman.** 1984. Nitrogen Fixation and Nitrogenase Activities in members of Family Rhodospirillaceae. *J. Bacteriol.* **157**: 73-78.
- Moore, M.D. & S. Kaplan.** 1992. Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class proteobacteria: Characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **174**: 1505-1514.
- Paul, E.A. & F.E. Clark.** 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Inc. San Diego.
- Robert, G.P. & P.W. Ludden.** 1992. Nitrogen Fixation by Photosynthetic Bacteria, hlm. 135-165. Di Dalam G. Stacey, R. H. Burris, & H. J. Evans (ed.). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall Inc. New York.
- Rosana, L., A. Suwanto, B. Tjahjono & E. Guhardja.** 1995. Profil DNA genom *Xanthomonas campestris* dengan menggunakan schizotyping. *Hayati* **2(1)**: 28-33.
- Rukayadi, Y.** 1995. Analisis Profil DNA Genom Sejumlah Isolat *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* dengan menggunakan Pulsed Field Gel Electrophoresis. Tesis Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Tabel 2. Pengaruh penambahan isolat bakteri fotosintetik anoksigenik terhadap bobot kering padi.

Kode isolat	Rata-rata bobot kering (g)
Kontrol Positif	0.0672
Kontrol Negatif	0.0246fg
<i>E. coli</i>	0.0257ef
K503	0.0307a
RIAU2	0.0254cd
<i>R. sp</i> 2.4.1	0.0278cd
SKB105	0.0245fg
SKB105-RIAU2	0.0275cd
RIAU2-K503	0.0262de
<i>R. sp</i> 2.4.1-K503	0.0292ab
<i>R. sp</i> 2.4.1-RIAU2	0.0248fg
<i>R.sp</i> 2.4.1-SKB105	0.0241g
K503-SKB105	0.0255efg
<i>R. sp</i> 2.4.1-RIAU2-K503	0.0271de
<i>R.sp</i> 2.4.1-K503-SKB105	0.0287bc
<i>R.sp</i> 2.4.1-SKB105-RIAU2	0.0303ab
<i>R. sp</i> 2.4.1-K503-SKB105-RIAU2	0.0288abc

- Smith, C.I. & C.R. Cantor.** 1987. Purification specific fragmentation and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol.* **155**: 449-467.
- Suwanto, A. & S. Kaplan.** 1989. Physical and genetic mapping of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome : Genome size, fragment identification, and gene localization. *J. Bacteriol.* **171**: 5840-5849.
- Suwanto, A. & S. Kaplan.** 1992. Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 1135-1145.
- Watanabe, I. & K.K. Lee.** 1977. Non Symbiotic Nitrogen Fixation in Rice and Rice Field, hlm. 289-305. Di Dalam A. Ayanaba & P.J. Dart ed.). *Biological Nitrogen Fixation in Farming System of The Tropics.* John Wiley and Sons. Chichester.
- Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock & K.A. Gomez.** 1976. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice.* Ed ke-3. The International Rice Research Institute. Los Banos. Laguna. Philippines.