

STRUKTUR KOMUNITAS ARKEA, BAKTERI, METANOGEN, DAN METANOTROF DI TANAH SAWAH SERTA HUBUNGANNYA DENGAN EMISI CH₄

YULI SITI FATMA



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2019**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengummumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul Struktur Komunitas Arkea, Bakteri, Metanogen, dan Metanotrof di Tanah Sawah serta Hubungannya dengan Emisi CH₄ adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Desember 2019

Yuli Siti Fatma
NIM G361160058

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



RINGKASAN

YULI SITI FATMA. Struktur Komunitas Arkea, Bakteri, Metanogen, dan Metanotrof di Tanah Sawah serta Hubungannya dengan Emisi CH₄. Dibimbing oleh MAN RUSMANA, ARIS TRI WAHYUDI, dan HAMIM.

Mikrob memainkan peran penting dalam emisi CH₄ di tanah sawah. Sejumlah mikrob berkontribusi dalam proses degradasi dan fermentasi senyawa organik tanah pada rantai respirasi anaerob yang selanjutnya menyediakan substrat bagi mikrob penghasil CH₄ (metanogen). Selanjutnya, sebagian CH₄ yang dihasilkan akan dioksidasi oleh mikrob pengoksidasi CH₄ (metanotrof) sebelum diemisikan ke atmosfer. Emisi CH₄ dari lahan sawah mencapai 7-17% dari total emisi CH₄ global. Indonesia menjadi salah satu dari lima negara penyumbang CH₄ tertinggi dari lahan sawah dan diperkirakan akan terus mengemisikan CH₄ seiring pemanfaatan sawah untuk memenuhi permintaan beras. CH₄ terdapat di atmosfer dengan konsentrasi tertinggi kedua setelah CO₂. Gas ini memiliki potensi pemanasan global sebesar 25 kali lebih tinggi dibandingkan CO₂ dan mampu bertahan di atmosfer sekitar 8.4 tahun.

Upaya peningkatan produksi beras perlu dilakukan seiring dengan penurunan laju emisi CH₄. Salah satu strategi yang dilakukan untuk menurunkan laju emisi CH₄ di sawah adalah memanipulasi komunitas metanotrof di daerah perakaran padi dengan aplikasi bakteri metanotrof sebagai pupuk hayati. Pada penelitian ini, padi ditumbuhkan di sawah yang diberi dua perlakuan pupuk, yaitu urea 100% (250 kg ha⁻¹) (B0) dan urea 50% (125 kg ha⁻¹) dengan pupuk hayati (B1). Pupuk hayati yang digunakan pada penelitian ini merupakan kombinasi 4 isolat bakteri metanotrof (*Methylocystis rosea* BGM1, *Methylocystis parvus* BGM3, *Methylococcus capulatus* BGM9, dan *Methylobacter* sp. SKM14) dan 1 isolat bakteri pereduksi N₂O (*Ochrobactrum anthropi* BL2). Aplikasi urea 50% dengan pupuk hayati (B1) mampu menurunkan laju emisi CH₄ dan memacu pertumbuhan padi. Namun, struktur komunitas arkea, bakteri, metanogen, dan metanotrof pada tanah sawah dengan dua perlakuan tersebut belum diketahui. Hubungan antara metanogen dan metanotrof dengan emisi CH₄ selama pertumbuhan padi juga belum diinvestigasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menganalisis struktur komunitas arkea dan bakteri di tanah sawah, serta komunitas metanogen dan metanotrof dan kaitannya dengan emisi CH₄ selama periode penanaman padi pada perlakuan pupuk urea 100% (B0) dan pupuk urea 50% dengan pupuk hayati (B1).

Struktur komunitas mikrob pada 0, 36, dan 69 hari setelah tanam (HST) dianalisis dengan *amplicon sequencing* menggunakan teknik *next generation sequencing* (NGS). Analisis struktur komunitas arkea dan bakteri pada tanah di sekitar perakaran padi dilakukan dengan menggunakan gen 16S rRNA. Selanjutnya, kelompok metanogen dan metanotrof diinvestigasi berdasarkan hasil analisis gen 16S rRNA tersebut. Selain itu, komunitas metanogen dan metanotrof pada 36 HST masing-masing dianalisis menggunakan gen fungsional, yaitu gen *mcrA* dan *pmoA*. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara rasio metanogen:metanotrof dan laju emisi CH₄ pada fase vegetatif dan generatif padi.

Komunitas arkea dan bakteri mengalami perubahan selama pertumbuhan padi. Suksesi dan dinamika populasi arkea dideteksi pada setiap perlakuan sejak 0

HST (sebelum aplikasi pupuk) hingga 69 HST (fase generatif padi). Selama periode tersebut, komunitas arkea di dua perlakuan didominasi oleh filum Crenarcaeota (71.6-77.2%). Komunitas bakteri juga mengalami perubahan selama pertumbuhan padi, baik pada B0 maupun B1. Proteobacteria mendominasi komunitas bakteri di dua perlakuan tersebut dengan kelimpahan relatif sebesar 21-23.3%. Meskipun dominansi arkea dan bakteri tidak berbeda antarperlakuan, struktur komunitas arkea dan bakteri masing-masing terbagi atas 2 klaster menurut perlakuan pemupukan. Hal ini menunjukkan bahwa komunitas arkea dan bakteri lebih dipengaruhi oleh perlakuan pemupukan dibandingkan fase pertumbuhan tanaman.

Berdasarkan gen 16S rRNA, kelimpahan relatif metanogen lebih tinggi pada B0 dibandingkan B1. Selama masa pertumbuhan padi, metanogen lebih melimpah pada fase vegetatif daripada generatif padi. Hal ini diduga karena pada fase vegetatif, padi mengeluarkan eksudat akar yang melimpah sehingga menyediakan substrat bagi metanogen. *Methanosarcinaceae* dan *Methanomassiliicoccaceae* terdeteksi sebagai metanogen yang dominan, sehingga diduga berperan penting pada produksi CH₄. *Methanosarcinaceae* mendominasi pada perlakuan B0 dari 0 hingga 69 HST. Sementara itu, *Methanomassiliicoccaceae* mendominasi pada B1 pada fase vegetatif dan generatif padi. *Methanosarcinaceae* merupakan famili yang umum ditemukan di tanah sawah, sedangkan *Methanomassiliicoccaceae* jarang terdeteksi. Adapun kelompok metanotrof yang terdiri atas *Methylocystaceae* dan ANME-2D secara umum lebih melimpah pada perlakuan B1 dibandingkan B0.

Hasil analisis metanogen dan metanotrof pada 36 HST dengan menggunakan gen fungsional menunjukkan bahwa metanogen lebih beragam pada B0, sedangkan metanotrof lebih beragam pada B1. Berdasarkan gen *mcrA*, komunitas metanogen pada perlakuan B0 didominasi oleh Uncultured methanogenic archaeon (69.3%), sedangkan pada B1 didominasi oleh Uncultured archaeon (52.4%). Kelompok metanotrof yang mendominasi pada perlakuan B0 dan B1 adalah Uncultured Methanotrophic bacterium yang masing-masing mencapai 72.4% dan 68.5%.

Aplikasi pupuk hayati pada perlakuan B1 menyebabkan rasio metanogen terhadap metanotrof lebih rendah dibandingkan pada B0. Rasio metanogen:metanotrof berdasarkan gen 16S rRNA berkorelasi positif dengan laju emisi CH₄ selama masa pertumbuhan padi ($r = 0.843$; $P = 0.157$). Hal ini mengindikasikan bahwa rasio metanogen:metanotrof dapat menggambarkan laju emisi CH₄ dan dapat dijadikan sebagai landasan dalam upaya mitigasi CH₄.

Kata kunci: mikrobiom tanah, mitigasi CH₄, padi, pupuk hayati, tanah tropis



SUMMARY

YULI SITI FATMA. Community Structure of Archaea, Bacteria, Methanogen, and Methanotroph in Rice Fields and Its Correlation with CH₄ Emissions. Supervised by IMAN RUSMANA, ARIS TRI WAHYUDI, and HAMIM.

Microbes play pivotal roles in CH₄ emissions in rice soils. A number of microbes contribute to degradation and fermentation process of soil organic compounds in the anaerobic respiration chain, which then provides substrates for CH₄-producing microbes (methanogens). Subsequently, some CH₄ will be oxidized by CH₄-oxidizing microbes (methanotroph) before being emitted into the atmosphere. CH₄ emissions from rice fields account for 7-17% of total global CH₄ emissions. Indonesia is one of the five highest countries contributing to CH₄ emission from rice fields and is predicted to constantly emit CH₄ along with rice fields utilization to meet rice demand. CH₄ in the atmosphere is the second most important GHG after carbon dioxide (CO₂). This gas has global warming potential by 25 times greater than that of CO₂ and is able to survive in the atmosphere around 8.4 years.

Efforts to increase rice production need to be conducted in line with the reduction in CH₄ emissions. One strategy to reduce CH₄ emission rates in rice fields is manipulating the methanotrophic community in the rice root area with methanotrophic bacterial application as biofertilizer. In this study, rice was grown in the rice fields treated with two fertilizer treatments, i.e., 100% urea (250 kg ha⁻¹) (B0) and approximately 50% urea (125 kg ha⁻¹) and biofertilizer (B1). Biofertilizer used in this study was a combination of 4 isolates of methanotrophic bacteria (*Methylocystis rosea* BGM1, *Methylocystis parvus* BGM3, *Methylococcus capulatus* BGM9, and *Methylobacter* sp. SKM14) and 1 isolate of N₂O-reducing bacteria (*Ochrobactrum anthropi* BL2). Application of 50% urea and biofertilizer (B0) was able to reduce CH₄ emission rates and promote rice growth. However, the structure of archaeal, bacterial, methanogenic, and methanotrophic communities in the rice fields with these two treatments remains unknown. The correlation between methanogenic and methanotroph community with CH₄ emission rates during rice growth phase has not been investigated. Therefore, this study aimed to analyze the archaeal and bacterial community structure in the rice fields, and the methanogen and methanotroph community and their correlation to CH₄ emissions during the rice-growing period under the application of urea 100% (B0) and urea 50% with biofertilizer (B1).

Microbial community structure at 0, 36, 69 days after transplanting (DAT) was analyzed by amplicon sequencing using next generation sequencing (NGS). Analysis of the archaeal and bacterial community structure in the soil surrounding rice roots was conducted using 16S rRNA gene. Methanogen and methanotroph were investigated based on the results of 16S rRNA gene analysis. In addition, methanogenic and methanotrophic community at 36 DAT were analyzed using functional genes, i.e., *mcrA* and *pmoA* gene, respectively. A correlation test was performed to determine the correlation between methanogen:methanotroph ratio with CH₄ emission rates.

Hak cipta dilindungi Undang-undang

IPB University

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

Archaeal and bacterial communities changed during the rice-growing period. The succession and dynamics of the archaeal population were detected in each treatment from 0 DAT (before fertilizer application) to 69 DAT (the rice generative phase). During this period, the archaeal community in the two treatments was dominated by Crenarcaeota phylum (71.6-77.2%). The bacterial community also changed over the rice growth, both in B0 and B1. Proteobacteria dominated bacterial assemblages in both treatments with relative abundance of 21-23.3%. Although the dominance of archaea and bacteria did not differ between treatments, archaeal and bacterial communities were divided into two clusters by the treatments (B0 and B1), respectively. This result showed that fertilizer treatments had more affect the soil microbial community rather than the rice growth phase.

Based on 16S rRNA gene, the relative abundance of methanogens was higher at B0 than that of B1. During the rice-growing period, methanogens were more abundant in the rice vegetative phase compared to the generative phase. It might be caused by high root exudates released by rice plant which provide substrates for methanogens. *Methanosarcinaceae* and *Methanomassiliicoccaceae* were detected as most dominant methanogens, were presumably to be important contributors to CH₄ emission. *Methanosarcinaceae* dominated in the B0 treatment from 0 to 69 DAT. Meanwhile, *Methanomassiliicoccaceae* was frequently detected in B1 during the rice vegetative and generative phase. *Methanosarcinaceae* has been reported as common methanogens in the rice field, while *Methanomassiliicoccaceae* was rarely detected in the rice field soil. Methanotroph, consisting of *Methylocystaceae* and ANME-2D, was generally more abundant in B1 treatment, in contrast to B0 treatment.

The results of the methanogens and methanotrophs analysis using functional genes showed that methanogens and methanotrophs at 36 DAT were more diverse in B0 and B1, respectively. According to *mcrA* gene, methanogenic community in B0 treatment was dominated by Uncultured methanogenic archaeon (69.3%), whereas, in B1, it was dominated by Uncultured archaea (52.4%). Most dominant methanotroph in B0 and B1 treatments were Uncultured methanotrophic bacterium with the relative abundance accounting for 72.4% and 68.5%, respectively.

The application of biofertilizer in the B1 treatment led to the ratio of methanogens to methanotrophs to be lower than that of B0. Methanogen:methanotroph ratio based on 16S rRNA gene was positively correlated with the CH₄ emission rates during the rice-growing period ($r = 0.843$; $P = 0.157$). This indicates that methanogen:methanotroph ratio is able to reflect CH₄ emission rates and can be used as a basis for CH₄ mitigation.

Keywords: soil microbiome, CH₄ mitigation, rice plants, biofertilizer, tropical soil



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2019
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

STRUKTUR KOMUNITAS ARKEA, BAKTERI, METANOGEN, DAN METANOTROF DI TANAH SAWAH SERTA HUBUNGANNYA DENGAN EMISI CH₄

YULI SITI FATMA

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor
pada
Program Studi Mikrobiologi

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2019**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

Penguji Luar Komisi pada Ujian Tertutup : 1. Prof Dr I Made Sudiana, MSc
2. Dr Rika Indri Astuti, MSi

Penguji Luar Komisi pada Ujian Terbuka : 1. Prof Dr I Made Sudiana, MSc
2. Dr Rika Indri Astuti, MSi

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Judul Disertasi : Struktur Komunitas Arkea, Bakteri, Metanogen, dan Metanotrof di Tanah Sawah serta Hubungannya dengan Emisi CH₄
Nama : Yuli Siti Fatma
NIM : G361160058

Disetujui oleh

Komisi Pembimbing

Dr Ir Iman Rusmana, MSi
Ketua

Prof Dr Aris Tri Wahyudi, MSi
Anggota

Dr Ir Hamim, MSi
Anggota

Diketahui oleh

Ketua Program Studi Mikrobiologi

Dekan Sekolah Pascasarjana

Prof Dr Anja Meryandini, MS



Prof Dr Anas Miftah Fauzi, MEng

Tanggal Sidang Tertutup : 27 September 2019

Tanggal Lulus : **13 NOV 2019**

Tanggal Sidang Promosi : 13 November 2019

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga karya ilmiah ini dapat diselesaikan. Penelitian ini bertema struktur komunitas mikrob di tanah sawah dengan karya ilmiah yang berjudul Struktur Komunitas Arkea, Bakteri, Metanogen, dan Metanotrof di Tanah Sawah serta Hubungannya dengan Emisi CH₄.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr Ir Iman Rusmana, MSi sebagai ketua komisi pembimbing, serta Prof Dr Aris Tri Wahyudi, MSi dan Dr Ir Hamim, MSi sebagai anggota komisi pembimbing yang dengan kesabarannya memberikan saran, solusi, nasihat, dan motivasi kepada penulis selama proses penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Prof Dr I Made Sudiana, MSc dan Dr Rika Indri Astuti, MSi sebagai penguji luar komisi atas saran dan masukannya untuk perbaikan karya ilmiah. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Prof Dr Anja Meryandini, MS sebagai Ketua Program Studi Mikrobiologi atas saran dan nasihat yang diberikan.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia atas kesempatan beasiswa yang diberikan kepada penulis pada Program Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) *batch* II melalui Dr Ir Iman Rusmana, MSi. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada IR Crew, PMDSU Mikrobiologi 2015, anggota laboratorium Mikrobiologi, teman-teman S2 Mikrobiologi 2015, teman-teman S3 Mikrobiologi 2016, para teknisi laboratorium Mikrobiologi dan laboratorium Terpadu Departemen Biologi IPB, serta berbagai pihak yang memberikan dukungan dan bantuan kepada penulis. Ungkapan terima kasih penulis sampaikan kepada Mama, Bapak, adik-adik, serta seluruh keluarga besar atas do'a dan kasih sayangnya.

Demikian karya tulis ini dibuat. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Desember 2019

Yuli Siti Fatma

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Perumusan Masalah	2
Tujuan Penelitian	3
Hipotesis Penelitian	3
Manfaat Penelitian	3
Kebaruan Penelitian (<i>Novelty</i>)	4
TINJAUAN PUSTAKA	4
Komunitas Mikrob di Tanah Sawah	4
Emisi CH ₄ di Lahan Sawah	6
Metanogen	9
Metanotrof	12
Aplikasi Bakteri Metanotrof sebagai Pupuk Hayati	15
Analisis Metagenom Menggunakan <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)	16
Gen Marka pada Analisis Metagenom	18
METODE	20
Waktu dan Tempat Penelitian	20
Kerangka Penelitian	20
Prosedur Penelitian	20
Aplikasi Sifat Fisika dan Kimia Tanah	20
Aplikasi Pupuk di Lahan Sawah	20
Pengambilan Sampel Tanah	21
Ekstraksi DNA dari Sampel Tanah	22
Analisis Komunitas Mikrob dengan <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)	22
Analisis Data Sekuens DNA	23
Analisis Komunitas Metanogen dan Metanotrof serta Hubungannya dengan Laju Emisi CH ₄	25
HASIL	25
Sifat Fisika dan Kimia Tanah	25
Struktur Komunitas Arkea	26
Keragaman Arkea pada Setiap Sampel (<i>Alpha Diversity</i>)	26
Suksesi Arkea Selama Masa Pertumbuhan Padi	27
Komposisi Komunitas Arkea pada Setiap Sampel	29
Keragaman Arkea di antara Semua Sampel (<i>Beta Diversity</i>)	31
Struktur Komunitas Bakteri	31

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



Keragaman Bakteri pada Setiap Sampel (<i>Alpha Diversity</i>)	31
Suksesi Bakteri Selama Masa Pertumbuhan Padi	32
Komposisi Komunitas Bakteri pada Setiap Sampel	34
Keragaman Bakteri di antara Semua Sampel (<i>Beta Diversity</i>)	36
Struktur Komunitas Metanogen dan Metanotrof	37
Komposisi Komunitas Metanogen dan Metanotrof Berdasarkan Gen 16S rRNA	37
Rasio Metanogen:Metanotof Berdasarkan Gen 16S rRNA dan Hubungannya dengan Laju Emisi CH ₄	39
Keragaman Metanogen dan Metanotrof Berdasarkan Gen Fungsional	39
Komposisi Komunitas Metanogen dan Metanotrof Berdasarkan Gen Fungsional	42
PEMBAHASAN	43
Struktur Komunitas Arkea	43
Struktur Komunitas Bakteri	45
Komunitas Metanogen dan Metanotrof	48
SIMPULAN DAN SARAN	54
Simpulan	54
Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	67
RIWAYAT HIDUP	70

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

DAFTAR TABEL

1 Mikrob yang terlibat dalam reaksi reduksi-oksidasi di tanah sawah (Inglett <i>et al.</i> 2004)	5
2 Taksonomi metanogen (Liu dan Whitman 2008; Borrel <i>et al.</i> 2011; Borrel <i>et al.</i> 2013; Nazaries <i>et al.</i> 2013)	10
3 Reaksi pembentukan CH ₄ oleh metanogen (Liu dan Whitman 2008)	11
4 Tipe bakteri metanotrof aerob (Fazli <i>et al.</i> 2013; Nazaries <i>et al.</i> 2013)	13
5 Spesifikasi teknis empat <i>platform</i> NGS yang banyak digunakan (Quail <i>et al.</i> 2012; van Dijk <i>et al.</i> 2014; Hodkinson dan Grice 2015)	17
6 Kode sampel tanah sawah yang diambil dari setiap perlakuan selama pertumbuhan padi	22
7 Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA komunitas arkea, bakteri, metanogen dan metanotrof pada sampel DNA asal tanah sawah	24
8 Sifat fisika dan kimia tanah	26
9 Jumlah sekuens dan <i>alpha diversity</i> arkea dari 6 sampel tanah berdasarkan gen 16S rRNA	27
10 Jumlah sekuens dan <i>alpha diversity</i> bakteri dari 6 sampel tanah berdasarkan gen 16S rRNA	32
11 Kelimpahan relatif metanogen dan metanotrof, rasio metanogen: metanotrof, serta laju emisi CH ₄ dari lahan sawah	39
12 Jumlah sekuens dan <i>alpha diversity</i> kelompok metanogen dan metanotrof pada 36B0 dan 36B1	40

DAFTAR GAMBAR

1 Skema emisi CH ₄ di lahan sawah	7
2 Skema lintasan oksidasi CH ₄ dan asimilasi formaldehid (Hanson dan Hanson 1996; Scheutz <i>et al.</i> 2009)	13
3 Tahapan metode amplicon sequencing dengan menggunakan Illumina <i>platform</i> (gambar dimodifikasi dari Atlas of Oral Microbiology 2015)	18
4 Kerangka penelitian	21
5 <i>Rarefaction curve</i> sekuens arkea pada semua sampel berdasarkan gen 16S rRNA	27
6 Diagram Venn keragaman arkea pada perlakuan B0 (A) dan B1 (B) selama masa pertumbuhan padi	27
7 Diagram Venn keragaman arkea antara dua perlakuan pada setiap umur tanaman, yaitu 0 HST (A), 36 HST (B), dan 69 HST (C)	28
8 Persentase OTU arkea yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi	29
9 Kelimpahan relatif arkea yang terdapat di setiap sampel tanah sawah pada tingkat filum (A) dan kelas (B) berdasarkan gen 16S rRNA	30
10 Analisis pengelompokkan komunitas arkea pada semua sampel berdasarkan metode UPGMA	31
11 <i>Rarefaction curve</i> sekuens bakteri pada semua sampel berdasarkan gen 16S rRNA	32
12 Diagram Venn keragaman bakteri pada perlakuan B0 (A) dan B1 (B)	

selama masa pertumbuhan padi	33
13 Diagram Venn keragaman bakteri antara dua perlakuan pada setiap umur tanaman, yaitu 0 HST (A), 36 HST (B), dan 69 HST (C)	34
14 Persentase OTU bakteri yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi	35
15 Kelimpahan relatif bakteri yang terdapat di setiap sampel tanah sawah pada tingkat filum (A) dan kelas (B) berdasarkan gen 16S rRNA	36
16 Analisis pengelompokan komunitas bakteri pada semua sampel berdasarkan metode UPGMA	37
17 Struktur komunitas metanogen (A) dan metanotrof (B) pada setiap sampel berdasarkan gen 16S rRNA	38
18 <i>Rarefaction curve</i> sekuens <i>mcrA</i> pada sampel 36B0 dan 36B1	40
19 <i>Rarefaction curve</i> sekuens <i>pmoA</i> pada sampel 36B0 dan 36B1	41
20 Diagram Venn keragaman metanogen berdasarkan gen <i>mcrA</i> (A) dan keragaman metanotrof berdasarkan gen <i>pmoA</i> (B) pada 36 HST	41
21 Struktur komunitas metanogen (A) dan metanotrof (B) pada sampel 36B0 dan 36B1 berdasarkan gen fungsional	42

DAFTAR LAMPIRAN

1 Persentase OTU arkea yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi	67
2 Kelimpahan relatif filum arkea yang dominan pada setiap sampel	67
3 Kelimpahan relatif kelas arkea yang dominan pada setiap sampel	67
4 Persentase OTU bakteri yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi	67
5 Kelimpahan relatif filum bakteri yang dominan pada setiap sampel	68
6 Kelimpahan relatif kelas bakteri yang dominan pada setiap sampel	68
7 Kelimpahan relatif metanogen berdasarkan gen 16S rRNA pada setiap sampel	68
8 Kelimpahan relatif metanotrof berdasarkan gen 16S rRNA pada setiap sampel	69
9 Kelimpahan relatif metanogen berdasarkan gen <i>mcrA</i> pada sampel 36B0 dan 36B1	69
10 Kelimpahan relatif metanotrof berdasarkan gen <i>pmoA</i> pada sampel 36B0 dan 36B1	69

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Mikrob di tanah sawah memainkan peran penting dalam siklus biogeokimia. Setiap populasi mikrob memiliki peranannya masing-masing di dalam ekosistem tersebut. Karakteristik komunitas mikrob memengaruhi siklus biogeokimia yang terjadi di tanah termasuk di daerah perakaran tanaman, serta berdampak secara global (Phillippot *et al.* 2009). Struktur komunitas bakteri di tanah sawah berkontribusi terhadap kesuburan tanah dan siklus metana (CH_4) selama masa pertumbuhan padi (Liesack *et al.* 2000; Luo *et al.* 2015). Komunitas mikrob tersebut mengalami perubahan seiring pertumbuhan tanaman padi (Edwards *et al.* 2018). Selain itu, komunitas mikrob tanah sawah, termasuk mikrob yang terlibat dalam emisi CH_4 , juga dipengaruhi oleh pemberian pupuk nitrogen (Mishra *et al.* 2018; Liu *et al.* 2019).

Emisi CH_4 dihasilkan dari proses respirasi anaerob di tanah sawah. Berbagai mikrob yang terlibat dalam rantai respirasi anaerob, antara lain mikrob yang memiliki aktivitas hidrolitik, bakteri fermentatif, sintrofik, dan asetogenik. Komunitas mikrob tersebut menghasilkan produk, seperti H_2 dan asetat, yang merupakan substrat bagi arkea metanogen dalam menghasilkan CH_4 pada tahap terakhir proses respirasi anaerob (Conrad 2007). Produksi CH_4 utamanya dipicu oleh pengairan lahan sawah selama pertumbuhan padi. Penggenangan pada tanah sawah menyediakan lingkungan anaerob yang mendukung pertumbuhan arkea metanogen. Sebelum dilepaskan ke atmosfer, sebanyak 80% CH_4 dioksidasi di lingkungan aerob tanah sawah (Conrad dan Rothfus 1991). Oksidasi CH_4 tersebut sebagian besar dilakukan secara biologi oleh mikrob metanotrof (Conrad 2007). CH_4 digunakan sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan metanotrof (Hanson dan Hanson 1996). Struktur komunitas dan aktivitas metanogen dan metanotrof di suatu lingkungan memengaruhi besarnya emisi CH_4 (Lee *et al.* 2014).

Sawah mengemisikan gas rumah kaca (GRK) berupa CH_4 sebesar 7-17% dari total emisi CH_4 global, sehingga berdampak pada pemanasan global (Liu dan Whitman 2008). Menurut USEPA (2013), Indonesia pada tahun 2010 menjadi salah satu dari lima negara penyumbang CH_4 tertinggi dari lahan sawah. Penggunaan lahan sawah diperkirakan akan semakin meningkat sebagai upaya untuk memenuhi permintaan beras. Permintaan beras tersebut diduga mengalami kenaikan seiring pertumbuhan penduduk Indonesia yang mencapai 1.19% per tahun dari tahun 2015 hingga 2020 (BPS 2013). Oleh karena itu, aktivitas pertanian padi sawah berpotensi meningkatkan emisi CH_4 , baik yang berasal dari perluasan area panen padi maupun upaya peningkatan produksi padi.

Salah satu strategi yang dilakukan untuk menurunkan emisi CH_4 di lahan sawah adalah aplikasi bakteri metanotrof sebagai pupuk hayati. Aplikasi bakteri metanotrof bertujuan memanipulasi komunitas dan aktivitas metanotrof yang berdampak pada penurunan rasio metanogen:metanotrof dan laju emisi CH_4 di lahan sawah. Pupuk hayati diaplikasikan bersama dengan pupuk sintetik dosis rendah untuk menjaga angka produksi padi. Kombinasi pupuk hayati dan pupuk sintetik dosis rendah mampu menurunkan emisi gas CH_4 , serta meningkatkan pertumbuhan tanaman padi di Sukabumi (Pingak *et al.* 2014; Sukmawati *et al.*

2015). Aplikasi bakteri metanotrof (*Methylocystis rosea* BGM1, *Methylocystis parvus* BGM3, *Methylococcus capsulatus* BGM9, dan *Methylobacter* sp. SKM14) dan pereduksi N₂O (*Ochrobactrum anthropi* BL2) sebagai pupuk hayati juga telah dilakukan pada lahan sawah di Tegal, Jawa Tengah. Penelitian tersebut dilakukan dalam dua perlakuan pupuk yang berbeda, yaitu urea 100% (250 kg ha⁻¹) (B0) dan urea 50% (125 kg ha⁻¹) dengan pupuk hayati (B1). Aplikasi urea 50% dengan pupuk hayati (B1) dilaporkan mampu menurunkan laju emisi CH₄, serta memacu pertumbuhan padi (Fatma 2019). Namun, struktur komunitas arkea dan bakteri pada tanah sawah dengan dua perlakuan tersebut belum diketahui. Selain itu, komunitas metanogen dan metanotrof belum dianalisis, termasuk hubungannya dengan emisi CH₄ selama masa pertumbuhan padi.

Komunitas mikrob di suatu lingkungan dapat dianalisis melalui teknik pengulturan (*culture-dependent method*) dan tanpa pengulturan (*culture-independent method*). Teknik pengulturan mikrob yang ada saat ini tidak mampu menggambarkan keseluruhan komunitas mikrob yang terdapat di suatu lingkungan. Spesies mikrob yang mampu dikulturkan merupakan bagian kecil dari seluruh keragaman yang ada, yaitu hanya sekitar 1% (Amman *et al.* 1995). Oleh karena itu, komunitas mikrob pada penelitian ini dianalisis melalui pendekatan metagenom, yaitu analisis keseluruhan materi genetik dari lingkungan tanpa melakukan pengulturan mikrob pada medium artifisial. Teknik metagenom yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Next Generation Sequencing* (NGS). Teknik ini memiliki keunggulan dalam menggambarkan keseluruhan mikrob di suatu lingkungan dibandingkan dengan teknik metagenom lain dan saat ini banyak digunakan di berbagai bidang kajian.

Komunitas arkea dan bakteri dideteksi menggunakan gen 16S rRNA sebagai penanda molekuler yang universal. Data yang diperoleh berdasarkan gen tersebut dapat digunakan untuk menganalisis metanogen dan metanotrof di suatu lingkungan. Deteksi komunitas metanogen dan metanotrof di tanah sawah masing-masing juga dilakukan berdasarkan gen fungsional. Metanogen dideteksi melalui keberadaan gen *mcrA* penyandi subunit α enzim methyl-coenzymeM reductase yang mengkatalisis tahap akhir pembentukan CH₄ (Friedrich 2005). Gen tersebut terdapat pada semua metanogen, sehingga digunakan secara luas dalam mendeteksi metanogen di lingkungan. Adapun kelompok metanotrof dideteksi berdasarkan gen penyandi enzim methane monooxygenase (MMO), baik enzim yang terdapat di sitoplasma (sMMO) maupun yang terintegrasi pada membran sel (pMMO) (Hanson dan Hanson 1996). Menurut Hakemian dan Rosenzweig (2007), pMMO yang disandikan oleh gen *pmoA*, *pmoB*, dan *pmoC* ditemukan secara umum pada semua metanotrof. Gen *pmoA* merupakan gen yang lestari (*conserved*) dan sering digunakan sebagai biomarka metanotrof di lingkungan. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini menggunakan gen 16S rRNA untuk menggambarkan keseluruhan arkea dan bakteri di tanah sawah, termasuk kelompok metanogen dan metanotrof. Selain itu, komunitas metanogen dan metanotrof juga dideteksi masing-masing menggunakan gen *mcrA* dan *pmoA*.

Perumusan Masalah

Komunitas mikrob di tanah sawah berkontribusi pada emisi CH₄ yang merupakan GRK dengan konsentrasi tertinggi kedua setelah CO₂. Gas ini

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

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

dihasilkan dari lahan sawah sebagai akibat dari aktivitas antropogenik. Salah satu upaya mitigasi CH_4 di lahan sawah yaitu aplikasi bakteri metanotrof sebagai pupuk hayati. Aplikasi pupuk hayati dilakukan untuk memanipulasi komunitas metanotrof di sawah, sehingga menurunkan rasio metanogen:metanotrof dan emisi CH_4 . Pupuk hayati yang dikombinasikan dengan urea 50% juga menurunkan penggunaan pupuk urea dan diharapkan meminimalkan dampak negatif penggunaannya. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aplikasi pupuk hayati dengan urea 50% (B1) mampu menurunkan laju emisi CH_4 di Tegal, Jawa Tengah dibandingkan dengan aplikasi urea 100% (B0) (Fatma 2019). Namun, karakteristik struktur komunitas arkea dan bakteri, serta kaitan antara kelompok metanogen dan metanotrof dengan emisi CH_4 selama masa pertumbuhan padi belum diketahui. Berdasarkan hal tersebut, analisis tentang komunitas mikrob pada perlakuan pupuk tersebut perlu dilakukan untuk mendukung penggunaannya secara lebih luas dalam upaya mitigasi emisi CH_4 dari lahan sawah. Adapun permasalahan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bagaimana struktur komunitas arkea di tanah sawah pada perlakuan pupuk urea 100% (B0) dan pupuk urea 50% dengan pupuk hayati (B1)?
2. Bagaimana perbedaan struktur komunitas bakteri di tanah sawah pada dua perlakuan pemupukan tersebut?
3. Bagaimana komunitas metanogen dan metanotrof pada dua perlakuan tersebut dan kaitannya dengan laju emisi CH_4 di sawah?

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan menganalisis struktur komunitas arkea dan bakteri tanah sawah, serta komunitas metanogen dan metanotrof dan kaitannya dengan emisi CH_4 selama periode penanaman padi pada perlakuan pupuk urea 100% (B0) dan pupuk urea 50% dengan pupuk hayati (B1).

Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Struktur komunitas arkea berubah selama periode pertumbuhan padi pada setiap perlakuan
2. Struktur komunitas bakteri mengalami perubahan selama pertumbuhan padi pada dua perlakuan
3. Komunitas metanogen dan metanotrof berbeda antara dua perlakuan dan berkaitan dengan laju emisi CH_4 selama masa pertumbuhan padi

Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait struktur komunitas arkea dan bakteri di tanah sawah, serta komunitas metanogen dan metanotrof yang berperan dalam emisi CH_4 di tanah sawah pada dua perlakuan pemupukan selama masa penanaman padi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai landasan ilmiah dalam pengembangan pupuk hayati yang berpotensi menurunkan rasio metanogen:metanotrof dan laju emisi CH_4 dari tanah



sawah, terutama untuk diaplikasikan secara luas di Indonesia. Penggunaan pupuk hayati yang dikombinasikan dengan pupuk sintetis di bawah dosis standar tidak hanya memacu pertumbuhan tanaman padi tetapi juga menurunkan laju emisi CH₄ di lahan sawah dan menurunkan penggunaan pupuk kimia sintetis. Dengan demikian, informasi yang diperoleh juga mendukung penggunaan pupuk sintetis secara efisien dalam rangka mitigasi CH₄ dan mendukung keberlanjutan fungsi lingkungan.

Kebaruan Penelitian (*Novelty*)

Penelitian ini menyediakan informasi baru terkait struktur komunitas arkea, bakteri, metanogen, dan metanotrof pada tanah sawah di Kabupaten Tegal, Jawa Tengah, Indonesia dengan dua perlakuan pemupukan yang berbeda, yaitu urea 100% dan urea 50% dengan pupuk hayati. Selain itu, penelitian ini menargetkan manipulasi komunitas metanotrof untuk menurunkan rasio metanogen:metanotrof yang berhubungan dengan laju emisi CH₄ di tanah sawah. Kebaruan yang diperoleh dari penelitian ini menambah khasanah ilmu pengetahuan tentang komunitas arkea dan bakteri di tanah sawah Indonesia, serta komunitas mikrob yang berperan dalam emisi CH₄.

TINJAUAN PUSTAKA

Komunitas Mikrob di Tanah Sawah

Tanah dihuni oleh arkea dan bakteri dalam jumlah yang tinggi yaitu berturut-turut sekitar 10⁸ dan 10⁹ sel per gram bobot kering tanah (Aislabie and Deslippe 2013). Mikrob tersebut tersebar di lingkungan sawah dengan sifat fisik dan kimia yang berbeda, di antaranya permukaan tanah yang aerob, lingkungan tanah anaerob, serta rizosfer (daerah sekitar perakaran tanaman) dan *rhizoplane* (daerah permukaan akar tanaman). Komunitas mikrob tanah berperan dalam siklus biogeokimia dan aliran energi. Aktivitas utama di tanah sawah terdiri atas produksi CH₄, oksidasi CH₄, serta siklus karbon (C), nitrogen (N), sulfur (S), dan besi (Fe) (Liesack *et al.* 2000).

Reaksi kimia yang terjadi dikontrol oleh input senyawa organik, potensial redoks atau konsentrasi penerima elektron terakhir, dan komunitas mikrob (Conrad dan Frenzel 2002; Inglett *et al.* 2004) (Tabel 1). Senyawa organik di tanah yang tidak tergenang dapat dioksidasi menjadi CO₂ dengan cepat karena ketersediaan O₂ yang melimpah sebagai penerima elektron terakhir. Proses degradasi senyawa organik di tanah yang tergenang berlangsung secara lebih kompleks (Liesack *et al.* 2000). Proses degradasi senyawa organik di tanah tersebut melibatkan penerima elektron terakhir selain O₂, yaitu NO₃⁻, Mn⁴⁺, Fe³⁺, SO₄²⁻, dan CO₂ (Conrad 1996). Ketika penerima elektron tersebut tersedia, metanogen tidak mampu berkompetisi dengan bakteri lain dalam memanfaatkan asetat dan H₂, seperti bakteri denitrifikasi, pereduksi sulfat, dan pereduksi besi. Senyawa tersebut lebih baik dalam menerima elektron dan secara termodinamika lebih disukai daripada reduksi CO₂. Proses

reduksi NO_3^- , Fe^{3+} , dan SO_4^{2-} yang terjadi di daerah rizosfer, permukaan tanah, dan daerah peralihan antara oksidasi dan anoksik menyebabkan konsentrasi penerima elektron tersebut menurun (Conrad dan Frenzel 2002). Kondisi ini memicu terjadinya proses fermentasi bahan organik. Selain itu, terjadi inisiasi proses produksi CH_4 (metanogenesis) (Liu dan Whitman 2008).

Tabel 1 Mikrob yang terlibat dalam reaksi reduksi-oksidasi di tanah sawah (Inglett *et al.* 2004)

Potensial redoks (mV)	Penerima elektron	Produk akhir dekomposisi senyawa organik	Mikrob yang terlibat
Aerob >+300	O_2	CO_2 , H_2O	Mikrob aerob
Fermentasi <-100 hingga +300	Senyawa organik	Asam organik, CO_2 , H_2 , alkohol, asam amino	Mikrob fermentatif
Anaerob fakultatif +100 hingga +300	NO_3^-	N_2O , N_2 , CO_2 , H_2O	Mikrob denitrifikasi
	Mn^{4+}	Mn^{2+} , CO_2 , H_2O	Pereduksi Mn^{4+}
	Fe^{3+}	Fe^{2+} , CO_2 , H_2O	Pereduksi Fe^{3+}
Anaerob obligat <-100	SO_4^{2-}	HS^- , CO_2 , H_2O	Pereduksi sulfat
	CO_2 dan asetat	CH_4 , CO_2 , H_2O	Metanogen
	Asam organik	Asetat, CO_2 , H_2	Bakteri penghasil H_2

Struktur komunitas mikrob di rizosfer dimediasi oleh eksudat akar tanaman sebagai akibat interaksi antara mikrob dan tanaman (Jackson dan Ilamurugu 2014; Edwards *et al.* 2014). Umur dan masa perkembangan tanaman menstimulasi adanya perubahan komposisi pada komunitas mikrob (Edwards *et al.* 2018). Komunitas mikrob tersebut juga berbeda berdasarkan genotip padi (Shenton *et al.* 2016). Interaksi antara mikrob dan tanaman menyebabkan proses biokimia kompleks dan dapat memacu kesuburan tanah (Kennedy dan Smith 1995; Kennedy *et al.* 1999). Beberapa kelompok bakteri yang termasuk *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPB) mampu memacu pertumbuhan tanaman melalui peningkatan ketersediaan nutrisi dan menghambat serangan patogen (Whipps 2001). Bakteri fermentatif di tanah juga berkontribusi pada penyediaan nutrisi yang mudah diserap oleh tanaman. Beberapa kelompok bakteri lain berperan dalam regulasi pH tanah yang menyediakan kondisi optimum bagi keberlangsungan fungsi mikrob dalam memacu produksi tanaman (Chapparo *et al.* 2012). Setiap spesies mikrob di tanah memiliki peran dan fungsinya masing-masing. Aktivitas antropogenik dapat secara langsung memengaruhi keragaman dan fungsinya dalam suatu sistem. Oleh karena itu, keragaman dan fungsi mikrob yang stabil perlu dijaga untuk mendukung keberlanjutan ekosistem pertanian (Kennedy dan Smith 1995). Keragaman bakteri yang rendah dapat mendorong kurangnya kestabilan ekosistem (Chaer *et al.* 2009) dan dapat mengganggu keberlanjutan fungsi mikrob di lingkungan (Zhou *et al.* 2017).

Emisi CH₄ di Lahan Sawah

IPCC (2014) melaporkan bahwa komposisi GRK di atmosfer pada tahun 2010 terdiri atas 76% CO₂, 16% CH₄, 6.2% N₂O, dan 2.0% *fluorinated gases* (F-gases). Lahan sawah berkontribusi besar terhadap emisi CH₄ global. Berdasarkan total emisi CH₄ global sebesar 600 Tg per tahun, Liu dan Whitman (2008) memperkirakan bahwa lahan sawah mengemisikan CH₄ ke atmosfer sebesar 7-17% dari total CH₄ global. Sementara menurut Philippot *et al.* (2009), emisi CH₄ dari pertanian padi berkisar antara 30 hingga 50 Tg per tahun atau mencapai 10-20% dari total CH₄ global. CH₄ mampu bertahan di atmosfer sekitar 8.4 tahun dan memiliki potensi pemanasan global sebesar 25 kali lebih tinggi dibandingkan CO₂ dalam kurun waktu 100 tahun (IPCC 2007). Perubahan kecil pada konsentrasi CH₄ di atmosfer dapat meningkatkan pemanasan global secara signifikan (Bridgham *et al.* 2013). Molekul ini dapat hilang melalui oksidasi kimia di troposfer, diserap oleh tanah, atau rusak di lapisan stratosfer (IPCC 2007). Sebagai negara agraris, sektor pertanian padi di Indonesia diperkirakan menyumbang emisi CH₄ nasional sebesar 12% (PEACE 2007). Emisi CH₄ dari lahan sawah Indonesia diperkirakan sekitar 4 Tg per tahun atau 6-7% dari total emisi CH₄ global tahunan dari sektor pertanian padi yang mencapai ~60 Tg per tahun (Husin *et al.* 1995).

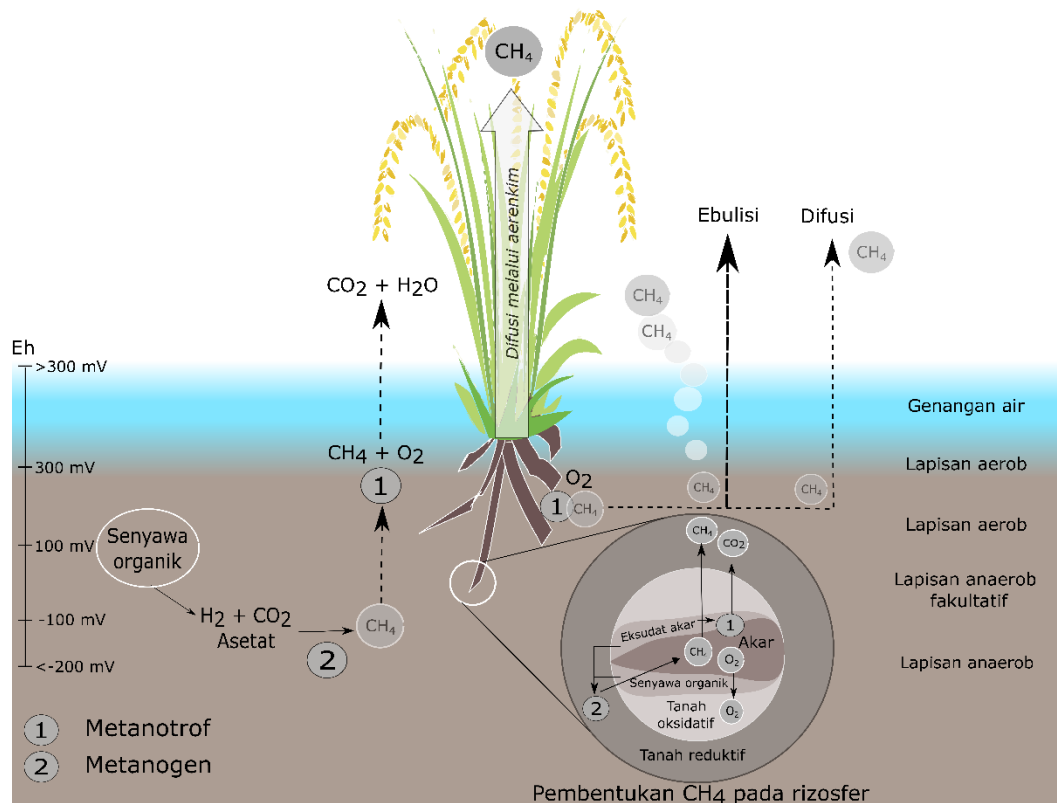
Emisi CH₄ di lahan sawah merupakan hasil dari proses produksi, oksidasi, dan transportasi CH₄ (Gambar 1). Produksi CH₄ melibatkan berbagai komunitas mikroba pada rantai respirasi anaerob. CH₄ diproduksi melalui 4 tahap, yaitu hidrolisis, asidogenesis, asetogenesis, dan metanogenesis. Proses hidrolisis merupakan penguraian senyawa organik kompleks menjadi monomer-monomer penyusunnya. Proses tersebut dapat terjadi pada berbagai lingkungan mulai dari aerob hingga anaerob obligat (Kimura *et al.* 2004). Asidogenesis mengubah monomer dari hasil hidrolisis menjadi asam lemak (asetat, butirrat, propionat, dan laktat), alkohol (metanol dan etanol), ammonia, CO₂, dan H₂ pada kondisi aerob fakultatif atau anaerob obligat. Pada proses asetogenesis, asam lemak diubah menjadi asetat, H₂, dan CO₂ pada kondisi anaerob obligat (Rosencrantz *et al.* 1999). Proses hidrolisis hingga asetogenesis di tanah sawah umumnya terjadi secara fermentatif. Hasil fermentasi senyawa organik, seperti asetat, H₂, CO₂, dan metanol, digunakan oleh kelompok metanogen sebagai sumber energi pada proses metanogenesis (Thauer 1998). Kelompok metanogen membentuk sintrofi dengan spesies lain pada proses respirasi anaerob, terutama mikroba penghasil hidrogen (Liesack *et al.* 2000). Proses metanogenesis terjadi secara anaerob dan menghasilkan CH₄ sebagai produk akhir. Sebanyak 80% CH₄ yang dihasilkan kemudian dioksidasi di lapisan aerob tanah, yaitu rizosfer dan lapisan permukaan tanah (Conrad dan Rotfus 1991). Menurut Frenzel (2000), sebesar 75% dari proses oksidasi tersebut terjadi di rizosfer, sehingga oksidasi CH₄ di daerah tersebut merupakan proses penting yang mengontrol aliran CH₄ ke atmosfer. Oksidasi CH₄ secara biologi melibatkan peran penting kelompok metanotrof. Selanjutnya, sebagian besar CH₄ diemisikan melalui jaringan aerenkima padi, sedangkan hanya sebagian kecil CH₄ keluar dari tanah melalui difusi dan ebulisi (Le Mer dan Roger 2001). CH₄ yang diemisikan melalui tanaman padi dapat mencapai 90% dari total CH₄ yang dikeluarkan ke atmosfer (Conrad 2007).

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



Gambar 1 Skema emisi CH_4 di lahan sawah (gambar dimodifikasi dari Malyan *et al.* 2016)

Beberapa faktor yang memengaruhi emisi CH_4 di lahan sawah, antara lain sifat fisik dan kimia tanah (Hou *et al.* 2000), manajemen air (Cai *et al.* 1997), fase pertumbuhan tanaman dan kultivar tanaman (Aulakh *et al.* 2001a; Setyanto *et al.* 2004), aplikasi pupuk (Cai *et al.* 1997; Krüger dan Frenzel 2003), serta komunitas mikrob (Lee *et al.* 2014). Menurut Hou *et al.* (2000), proses mikrobiologi yang memproduksi gas, seperti metanogenesis, dipengaruhi oleh faktor fisik dan kimia tanah, antara lain potensial redoks (Eh), pH, suhu, dan kelembaban tanah. Sementara itu, Bao *et al.* (2014) melaporkan bahwa produksi CH_4 merupakan hasil dari interaksi yang kompleks dan kompresensif antara faktor biotik dan abiotik di tanah.

Penggenangan merupakan karakter utama dalam budidaya padi sawah. Fluktuasi nilai potensial redoks terjadi selama periode penggenangan dan pengeringan tanah sawah. Potensial redoks dapat mencapai lebih dari $+300$ mV sebelum penggenangan, kemudian menurun tajam selama penggenangan dengan ketinggian air 5-10 cm. Potensial redoks dapat mencapai kurang dari -200 mV setelah 30 hari penggenangan. Nilai potensial redoks tersebut mengalami peningkatan dengan cepat ketika memasuki periode pengeringan selama fase pematangan padi. Setelah tiga hari pengeringan, potensial redoks bisa mencapai $+145$ mV (Hou *et al.* 2000).

Kondisi lahan sawah yang digenangi selama pertumbuhan padi mendukung produksi dan emisi CH_4 . Emisi CH_4 terjadi secara signifikan ketika potensial redoks kurang dari -100 mV (Hou *et al.* 2000). Ketika potensial redoks berkisar antara -150 mV hingga -200 mV, metanogen berada dalam jumlah yang melimpah dan

emisi CH_4 terjadi secara signifikan, sedangkan akseptor elektron berupa O_2 , NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , dan SO_4^{2-} terdapat dalam jumlah yang terbatas. Apabila akseptor elektron tersebut tersedia di suatu habitat, metanogen tidak dapat berkompetisi dengan bakteri lain, seperti bakteri denitrifikasi, bakteri pereduksi besi, dan bakteri pereduksi sulfat. Penerima elektron tersebut lebih disukai dibandingkan CO_2 , meskipun jumlah CO_2 cukup melimpah pada lingkungan anaerob yang dihasilkan secara simultan selama fermentasi. Selain CO_2 , fermentasi menghasilkan produk berupa asetat, format, metilamin, metanol, dan H_2 . Apabila kondisi sesuai, produk fermentasi tersebut akan dimanfaatkan oleh metanogen sebagai substrat dalam proses produksi CH_4 , sehingga laju emisi CH_4 meningkat (Liu dan Whitman 2008).

Faktor kimia tanah memengaruhi komunitas mikroba yang terlibat dalam produksi dan emisi CH_4 . Komunitas mikroba di lahan sawah dipengaruhi oleh karbon organik terlarut (*dissolved organic carbon* [DOC]), pH, dan kandungan nitrogen anorganik (Seo *et al.* 2014). Emisi CH_4 berkorelasi positif secara signifikan dengan kandungan senyawa organik total (*total organic carbon* [TOC]), kandungan nitrogen total (*total nitrogen* [TN]), dan suhu tanah, namun berkorelasi negatif dengan konsentrasi sulfat. TOC, TN, suhu, dan pH tanah mengalami peningkatan dari 0 hingga 90 hari setelah tanam (HST) padi. Peningkatan tersebut seiring dengan peningkatan laju emisi CH_4 . Angka maksimum TOC (11.5 g-C kg^{-1}) TN (1.11 g-N kg^{-1}), suhu ($25.7 \text{ }^\circ\text{C}$), dan pH (6.89) tanah terjadi pada 90 HST ketika padi memasuki fase keluar malai (*heading stage*). Pada fase tersebut, laju emisi CH_4 juga menunjukkan angka maksimum ($552.2 \text{ mg m}^{-2} \text{ hari}^{-1}$) (Lee *et al.* 2014). Sementara menurut Hou *et al.* (2000), kisaran pH yang optimum untuk produksi CH_4 yaitu 6.9-7.0 dan suhu optimum mencapai $\pm 24 \text{ }^\circ\text{C}$. Laju produksi CH_4 maksimum di tanah sawah terjadi pada suhu $35\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$ (Conrad 2007). Sementara itu, karbon organik tanah (*soil organic content* [SOC]) di tanah sawah Jakenan, Pati, Indonesia mencapai 0.48% (van Bodegom *et al.* 2001). Studi lain menunjukkan bahwa kandungan karbon total (*total carbon* [TC]) dan TN tanah di Jakenan masing-masing sebesar 0.52% dan 0.03% dengan pH 5.1 (Setyanto *et al.* 2004). Laporan terbaru menyebutkan bahwa SOC dan TN tanah di Jakenan berturut-turut mencapai 5.3 g-C kg^{-1} dan 0.47 g-N kg^{-1} (Setyanto *et al.* 2017).

Penggenangan dan pengeringan lahan terjadi berturut-turut selama masa pertumbuhan padi. Kondisi tersebut membuat metanogen di sawah lebih tahan terhadap O_2 dan kekeringan dibandingkan metanogen di lingkungan air lainnya (Watanabe *et al.* 2009). Periode penggenangan dan pengeringan lahan sawah berpengaruh pada komunitas metanogen (Liu dan Whitman 2008). Pada saat penggenangan selama fase vegetatif padi, metanogen tumbuh secara optimal, sehingga aktif memproduksi CH_4 . Sementara itu, periode pengeringan pada fase generatif padi menurunkan populasi metanogen, sehingga produksi dan emisi CH_4 menurun. Perubahan struktur komunitas dan aktivitas metabolik metanogen berpengaruh terhadap emisi CH_4 (Watanabe *et al.* 2010).

Laju emisi CH_4 di lahan sawah juga dipengaruhi oleh komunitas pengoksidasi CH_4 atau metanotrof. Populasi metanotrof meningkat dari fase vegetatif ke generatif padi. Hal tersebut terjadi karena peningkatan O_2 akibat pengeringan lahan ketika padi memasuki fase generatif. Oleh karena itu, laju emisi CH_4 pada fase vegetatif lebih tinggi daripada fase generatif padi (Sutanto *et al.* 2014). Oksigen merupakan faktor penting untuk pertumbuhan bakteri metanotrof (Henckel *et al.*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

2000). Aktivitas oksidasi CH₄ bergantung pada ketersediaan CH₄ dan O₂ di lingkungan (Conrad dan Rotfus 1991).

Fase pertumbuhan tanaman padi berkontribusi terhadap emisi CH₄ (Aulakh *et al.* 2001a). Emisi CH₄ dipicu oleh proses fotosintesis selama masa pertumbuhan padi. Sebanyak 17% dari karbon yang difiksasi oleh tanaman ditransfer ke daerah perakaran berupa eksudat akar (Nguyen 2003). Eksudat akar padi mengandung berbagai senyawa, antara lain 7 asam amino (alanin, prolin, tirosin, arginin, serin, glisin, dan metionin), 4 karbohidrat (xilosa, galaktosa, α -glukosa, dan mannososa), serta 4 asam organik (asam asetat, asam oksalat, asam malat, dan asam sitrat) (Jackson dan Ilamurugu 2014). Selama pertumbuhan padi, eksudat akar meningkat dari awal pertumbuhan hingga tahap inisiasi malai, selanjutnya akan menurun dari tahap pembungaan hingga pematangan bulir. Peningkatan eksudat akar terjadi seiring dengan peningkatan laju fotosintesis (Aulakh *et al.* 2001a). Sebagian besar eksudat akar dioksidasi dalam beberapa jam saja (Jones dan Hodge 1999) dan kurang dari 5% karbon tersebut yang menjadi TOC tanah (Nguyen 2003). Selain eksudat akar, bagian tanaman yang mati, seperti anakan dan sel-sel akar, menjadi substrat bagi metanogen dalam memproduksi CH₄ (Aulakh *et al.* 2001b). Watanabe *et al.* (1999) melaporkan bahwa substrat utama bagi produksi CH₄ berasal dari tanaman dalam bentuk eksudat akar dan jaringan yang mati, bukan dari TOC tanah.

Emisi CH₄ berkorelasi dengan beberapa karakteristik pertumbuhan tanaman padi, antara lain bobot dan panjang akar, bobot tajuk, dan jumlah anakan (Aulakh *et al.* 2001b). Karakteristik tersebut berbeda pada setiap varietas padi. Selain itu, karakteristik tanaman padi berupa diameter, jumlah, dan kerapatan aerenkima juga menunjukkan perbedaan di antara varietas padi. Setiap varietas padi juga memiliki karakteristik eksudat akar dan kemampuan mentransfer gas yang berbeda-beda (Aulakh *et al.* 2001b; Wassmann dan Aulakh 2000). Oleh karena itu, laju emisi CH₄ bergantung pada varietas padi (Aulakh *et al.* 2001a; 2001b). Berdasarkan hal tersebut, penanaman varietas padi yang memiliki karakteristik produksi tinggi dengan eksudasi akar yang rendah akan menghasilkan emisi CH₄ yang lebih rendah (Aulakh *et al.* 2001b). Setyanto *et al.* (2004) melaporkan bahwa varietas padi IR64 berpotensi menghasilkan emisi CH₄ yang lebih rendah dibandingkan dengan Way Apoburu, Membramo, dan Cisadane.

Metanogen

Metanogen merupakan arkea penghasil CH₄ yang bersifat anaerob obligat. Metanogen termasuk anggota dari filum Euryarchaeota dengan 6 ordo tetap, yaitu Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanocellales (Rice Cluster I), Methanomicrobiales, Methanococcales, dan Methanopyrales (Liu dan Whitman 2008; Borrel *et al.* 2011), serta 1 ordo yang diusulkan yaitu Methanomassiliicoccales (Borrel *et al.* 2013) (Tabel 2). Setiap ordo dibedakan berdasarkan struktur lapisan luar bakteri (*bacterial envelope*), komposisi lipid, kisaran substrat, dan karakteristik biologi lainnya (Liu dan Whitman 2008). Metanogen tersebar luas di berbagai lingkungan, antara lain *anaerobic digester*, sedimen perairan tawar dan laut, rumen, rawa, sawah, sumber mata air panas, dan lingkungan berkadar garam tinggi.



Tabel 2 Taksonomi metanogen (Liu dan Whitman 2008; Borrel *et al.* 2011; Borrel *et al.* 2013; Nazaries *et al.* 2013)

Ordo	Famili	Genus/Spesies	Substrat		
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	H ₂ , (format)		
		<i>Methanobrevibacter</i>	H ₂ , format		
		<i>Methanosphaera</i>	H ₂ + metanol		
		<i>Methanothermobacter</i>	H ₂ , (format)		
Methanococcales	Methanothermaceae	<i>Methanothermus</i>	H ₂		
	Methanococcaceae	<i>Methanococcus</i>	H ₂ , format		
		<i>Methanothermococcus</i>	H ₂ , format		
	Methanocaldococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i>	H ₂		
		<i>Methanotorris</i>	H ₂		
Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i>	H ₂ , format		
		<i>Methanoculleus</i>	H ₂ , format		
		<i>Methanofollis</i>	H ₂ , format		
		<i>Methanogenium</i>	H ₂ , format		
		<i>Methanolacinia</i>	H ₂		
		<i>Methanoplanus</i>	H ₂ , format		
		<i>Methanospirillum</i>	H ₂ , format		
		Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	H ₂ , format	
		Methanosarcinales	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	H ₂ , format
				<i>Methanocalculus</i>	H ₂ , format
Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>		(H ₂), MeNH ₂ , Asetat		
	<i>Methanococcoides</i>		MeNH ₂		
	<i>Methanohalobium</i>		MeNH ₂		
	<i>Methanohalophilus</i>		MeNH ₂		
	<i>Methanolobus</i>		MeNH ₂		
	<i>Methanomethylovorans</i>		MeNH ₂		
	<i>Methanimicrococcus</i>		H ₂ + MeNH ₂		
	<i>Methanosalsum</i>		MeNH ₂		
Methanosaetaeaceae	<i>Methanosaeta</i>	Asetat			
Methanopyrales	Methanopyraceae	<i>Methanopyrus</i>	H ₂		
Methanocellales (Rice Cluster I)	Methanocellaceae	<i>Methanocella</i>	H ₂		
		<i>Methanococcoides</i>	Asetat, format		
		<i>Methanohalobium</i>	Asetat, format		
		<i>Methanohalophilus</i>	Asetat, format		
Methanomassiliicoccales	Methanomassiliicoccaceae	<i>Methanomassiliicoccus</i>	H ₂		
		<i>luminyensis</i>			
		<i>Candidatus</i>	H ₂		
		<i>Methanomethylophilus</i>			
		<i>alvus</i>			

MeNH₂: metilamin. Tanda kurung menunjukkan bahwa substrat hanya digunakan oleh beberapa spesies/strain.

Metanogen memperoleh energi dari proses pembentukan CH₄ (Table 3). Menurut Liu dan Whitman (2008), metanogen dibedakan menjadi 3 tipe berdasarkan jenis substrat dan lintasan pembentukan CH₄. Tipe 1 merupakan kelompok metanogen yang memanfaatkan H₂ sebagai donor elektron dan CO₂ sebagai penerima elektron, namun ada beberapa yang menggunakan format sebagai donor elektron (*hydrogenotrophic methanogens*). Beberapa anggota dari kelompok ini juga menggunakan turunan alkohol sebagai donor elektron, antara lain 2-propanol, 2-butanol, dan cyclopentanol. Sebagian besar metanogen termasuk ke dalam tipe 1. Tipe 2 adalah kelompok metanogen yang menggunakan senyawa metil, seperti metanol, metilamin, dan metil sulfida sebagai donor elektron (*methylotrophic methanogens*). Metanogen tipe 3 menggunakan asetat sebagai

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

substrat (*acetivlastic methanogens*). Asetat merupakan senyawa intermediet utama pada rantai respirasi anaerob.

Tabel 3 Reaksi pembentukan CH₄ oleh metanogen (Liu dan Whitman 2008)

Reaksi	$\Delta G^{\circ 'a}$ (kJ mol ⁻¹ CH ₄)	Kelompok metanogen
I. Tipe CO₂		
4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2 H ₂ O	-135	Sebagian besar metanogen
4 HCOOH → CH ₄ + 3 CO ₂ + 2 H ₂ O	-130	Sebagian besar <i>hydrogenotrophic methanogen</i>
CO ₂ + 4 isopropanol → CH ₄ + 4 aseton + 2 H ₂ O	-37	Beberapa <i>hydrogenotrophic methanogen</i>
4 CO + 2 H ₂ O → CH ₄ + 3 CO ₂	-196	<i>Methanothermobacter</i> dan <i>Methanosarcina</i>
II. Senyawa C1 ber-metil		
CH ₃ OH → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ O	-105	<i>Methanosarcina</i> dan <i>methylotrophic methanogen</i> lain
CH ₃ OH + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O	-113	<i>Methanomicrococcus blatticola</i> dan <i>Methanosphaera</i>
2 (CH ₃) ₂ -S + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ S	-49	Beberapa <i>methylotrophic methanogen</i>
4 CH ₃ -NH ₂ + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₃	-75	Beberapa <i>methylotrophic methanogen</i>
2 (CH ₃) ₂ -NH + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 NH ₃	-73	Beberapa <i>methylotrophic methanogen</i>
4 (CH ₃) ₃ -N + 6 H ₂ O → 9 CH ₄ + 3 CO ₂ + 4 NH ₃	-74	Beberapa <i>methylotrophic methanogen</i>
4 CH ₃ NH ₃ Cl + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ Cl	-74	Beberapa <i>methylotrophic methanogen</i>
III. Asetat		
CH ₃ COOH → CH ₄ + CO ₂	-33	<i>Methanosarcina</i> dan <i>Methanosaeta</i>

^a Perubahan standar pada energi bebas dihitung dari energi bebas pembentukan spesies ionik yang paling melimpah pada pH 7, contohnya: CO₂ adalah HCO₃⁻ dan HCOOH adalah HCOO⁻ + H⁺

Sesaat setelah penggenangan lahan sawah, *hydrogenotrophic methanogens* mendominasi, kemudian *acetivlastic methanogens* meningkat dan mencapai maksimum pada 70-80 hari setelah penggenangan (Roy *et al.* 1997; Krüger *et al.* 2005). CH₄ pada akar padi utamanya berasal dari H₂/CO₂ yaitu sekitar 60-80% (Chin *et al.* 2004; Lu dan Conrad 2005). Pada tanah sawah, CH₄ berasal dari asetat (50-83%) dan didominasi oleh *acetivlastic methanogens* (Lu dan Conrad 2005). Menurut Joulain *et al.* (1997), metanogen yang terdapat pada setiap gram bobot kering tanah sawah terdiri atas <10¹ sampai 10⁶ sel *hydrogenotrophic methanogens*, 10⁵ sel *methylotrophic methanogens*, dan 10⁴ sel *acetivlastic methanogens*.

Proses metanogenesis merupakan reaksi kompleks yang melibatkan berbagai enzim dan koenzim. Enzim yang khas pada metanogenesis yaitu methyl-coenzymeM reductase (MCR) (Thauer 1998). Enzim MCR berperan pada tahap terakhir pembentukan CH₄, yaitu mereduksi grup metil yang berikatan dengan coenzymeM (methyl-CoM) menjadi CH₄. Terdapat dua tipe MCR, yaitu MCR I

yang disandikan oleh operon *mcrBDCGA* dan ditemukan pada semua metanogen, serta MCR II (isoenzim) yang disandikan oleh operon *mrtBDGA* yang ditemukan pada beberapa anggota Methanococcales dan Methanobacteriales (Lueders *et al.* 2001).

Metanotrof

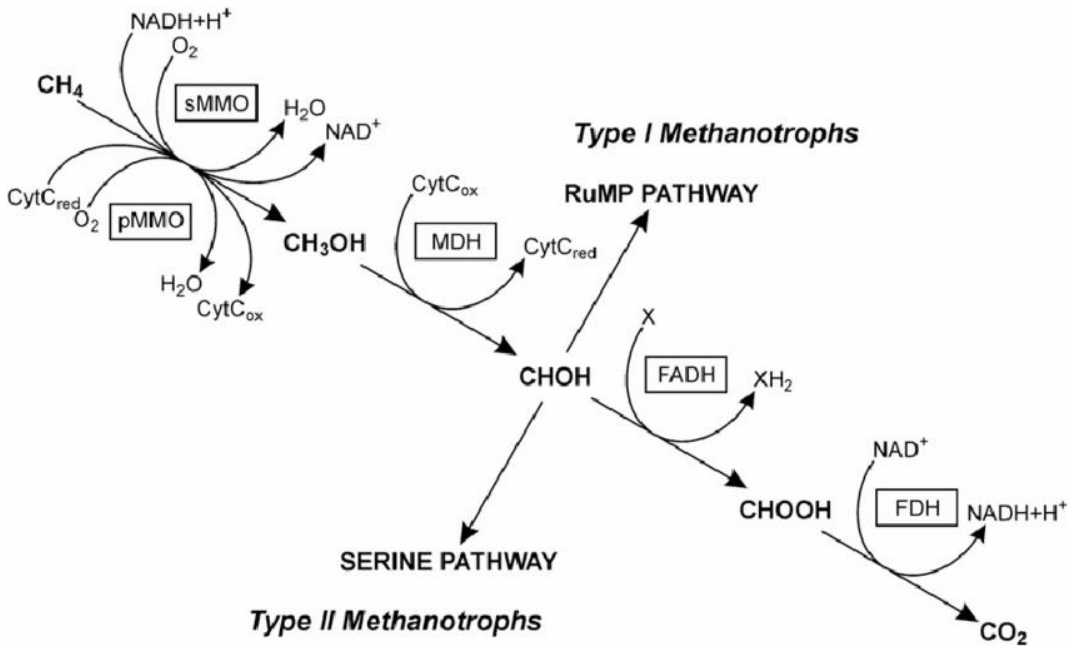
Oksidasi CH₄ secara biologi dilakukan oleh metanotrof secara aerob atau anaerob. CH₄ dioksidasi secara aerob oleh bakteri metanotrof yang terdapat dalam jumlah melimpah pada lingkungan aerob di sawah, yaitu berkisar antara 10³ hingga 10⁷ sel per gram bobot kering tanah (Joulian *et al.* 1997). Bakteri metanotrof aerob tersebar luas dalam beberapa kelompok, antara lain Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, dan Verrucomicrobia (Tabel 4). Bakteri metanotrof aerob secara umum dibedakan menjadi 2 tipe berdasarkan filogeni, struktur internal sel, dan lintasan asimilasi karbon. Tipe I termasuk anggota Gammaproteobacteria dengan membran internal berupa vesikel berbentuk *disc*, di antaranya *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, dan *Methylobacter*. Metanotrof tipe I mengasimilasi karbon melalui lintasan ribulosa monofosfat (RuMP). Tipe II merupakan metanotrof dengan membran internal berpasangan di sekeliling sel dan termasuk Alphaproteobacteria, antara lain *Methylosinus*, *Methylocystis*, dan *Methylocella* (Hanson dan Hanson 1996). Metanotrof tipe II melakukan asimilasi karbon melalui lintasan serin. Tipe ini dibedakan menjadi 2 grup berdasarkan perbedaan pada pembentukan membran intrasitoplasmik, struktur yang menyerupai karboksisom atau vesikel, asam lemak utama pada fosfolipid (*phospholipid fatty acid* [PLFA]), dan persentase GC (Semrau *et al.* 2010). Metanotrof yang tidak termasuk ke dalam dua tipe tersebut digolongkan menjadi tipe X, misalnya *Methanococcus capsulatus*. Namun, tipe ini cenderung digolongkan sebagai subgrup tipe I, yaitu metanotrof dengan lintasan karbon melalui RuMP tetapi mensintesis enzim yang terlibat dalam lintasan serin meskipun dalam level yang rendah. Tipe X dapat hidup pada suhu yang lebih tinggi daripada tipe I dan tipe II. Metanotrof tipe X memiliki komposisi GC sebesar 56-65%, sedangkan tipe I dan tipe II masing-masing sebesar 43-60% dan 60-67% (Hanson dan Hanson 1996). Sementara itu, Verrucomicrobia terdiri atas metanotrof termofilik dan mesofilik yang banyak ditemukan di lingkungan dengan pH rendah dan lingkungan geotermal (Islam *et al.* 2008).

Metanotrof mengoksidasi CH₄ sebagai sumber karbon dan energi (Gambar 2). Tahap pertama yaitu oksidasi CH₄ menjadi metanol (CH₃OH) dengan bantuan enzim methane monooxygenase (MMO). Setelah itu, metanol dioksidasi menjadi formaldehid (CHOH) oleh enzim methanol dehydrogenase (MDH). Formaldehid dioksidasi menjadi format (CHOOH) oleh formaldehyde dehydrogenase (FADH). Tahap terakhir yaitu oksidasi format menjadi CO₂ dengan bantuan enzim formate dehydrogenase (FDH). Formaldehid diasimilasi oleh metanotrof melalui lintasan RuMP atau serin (Hanson dan Hanson 1996).

Tabel 4 Tipe bakteri metanotrof aerob (Fazli *et al.* 2013; Nazaries *et al.* 2013)

Tipe	Grup	Genus/Strain
Tipe I ^a Kelas: Gammaproteobacteria Ordo: Methylococcales Famili: <i>Methylococcaceae</i>	-	<i>Methylobacter</i> , <i>Methyломicrobium</i> , <i>Methyломonas</i> , <i>Methylocaldum</i> , <i>Methylosphaera</i> , <i>Methylovulum</i> , <i>Methyломarinum</i> , <i>Methylotherrnus</i> , <i>Methylosarcina</i> , <i>Methylohalobius</i> , <i>Methylosoma</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylogaea</i> , <i>Clonothrix</i>
Tipe II Kelas: Alphaproteobacteria Ordo: Rhizobiales Famili: <i>Methylocystaceae</i>	Grup a Grup b	<i>Methylocystacea</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Beijerinckaceae</i> , <i>Methylocapsa</i> , <i>Methylocella</i> , <i>Methyloferula</i>
Verrucomicrobia Kelas: Verrucomicrobia Ordo: Methylacidiphilales Famili: <i>Methylacidiphilaceae</i>	-	Strain <i>Methylacidiphilaceae</i> , <i>Methylacidiphilum</i>

^a Bakteri metanotrof tipe X dianggap sebagai subgrup tipe I.



Gambar 2 Skema lintasan oksidasi CH₄ dan asimilasi formaldehid (Hanson dan Hanson 1996; Scheutz *et al.* 2009)

Oksidasi CH₄ menjadi metanol (CH₃OH) secara aerob dilakukan dengan bantuan enzim methane monooxygenase (MMO). MMO terdapat pada sitoplasma (*soluble* MMO [sMMO]) atau terintegrasi pada membran sel (*particulate* MMO [pMMO]). Enzim sMMO dan pMMO masing-masing disandikan oleh operon *mmoXYZCBG* dan *pmoABC*. MMO membutuhkan O₂ sebagai penerima elektron dan sitokrom c (CytC) atau NADH dalam keadaan tereduksi sebagai donor elektron dalam melakukan aktivitasnya. Enzim tersebut memotong ikatan O=O pada O₂, kemudian mereduksi salah satu atom oksigen untuk membentuk H₂O dan menggabungkan satu atom oksigen lainnya dengan CH₄ untuk membentuk metanol

(CH₃OH). Sebagian besar bakteri metanotrof memiliki pMMO yang membutuhkan ion tembaga (Cu²⁺) sebagai kofaktor. Ketika ketersediaan Cu²⁺ terbatas (< 1 μM), beberapa metanotrof mensintesis sMMO sebagai mekanisme pertahanan diri (Hanson dan Hanson 1996; Conrad 2007).

Berdasarkan kemampuan pemanfaatan senyawa karbon, metanotrof dibedakan menjadi metanotrof obligat dan metanotrof fakultatif. Metanotrof obligat hanya menggunakan senyawa berkarbon satu, seperti CH₄ dan metanol. Sebagian besar metanotrof termasuk ke dalam metanotrof obligat. Sementara itu, metanotrof fakultatif memanfaatkan senyawa berkarbon satu atau lebih, antara lain etanol, asetat, piruvat, suksinat, dan malat. Beberapa genus yang diketahui sebagai metanotrof fakultatif, yaitu *Methylocella*, *Methylocystis*, dan *Methylocapsa* (Dedys dan Dunfield 2011).

Pertumbuhan bakteri metanotrof dan induksi oksidasi CH₄ terjadi secara optimum pada pH 6.7-8.1, suhu 25-35 °C, kadar air 20-35%, konsentrasi ammonia 2-61 mM, dan konsentrasi Cu²⁺ kurang dari 4.3 mM (Bender dan Conrad 1995). Konsentrasi CH₄ dan ketersediaan O₂ memengaruhi pertumbuhan dan aktivitas bakteri metanotrof (Conrad dan Rotfus 1991). Metanotrof tipe I tumbuh baik pada lingkungan dengan konsentrasi CH₄ yang rendah dan O₂ yang tinggi, sedangkan metanotrof tipe II mendominasi pada lingkungan dengan konsentrasi CH₄ yang tinggi dan O₂ yang terbatas (Shrestha *et al.* 2008). Selain itu, bakteri metanotrof tipe II membutuhkan nitrogen dan Cu²⁺ yang rendah (Hanson dan Hanson 1996). Menurut afinitasnya terhadap CH₄, metanotrof dibedakan menjadi afinitas rendah (CH₄ > 100 ppm) dan afinitas tinggi (CH₄ < 0.8 ppm) (Bender dan Conrad 1992). Beberapa bakteri metanotrof dapat hidup pada lingkungan ekstrim, misalnya pada suhu 5-10 °C (*psycrophiles*), suhu >45 °C (*thermophiles*), NaCl 15% (*halophiles*), NaCl 12% dan pH 9-11 (*haloalkaliphiles*), serta pH 3.8-5.5 (*acidophiles*) (Nazaries *et al.* 2013)

Aktivitas oksidasi CH₄ secara anaerob (*anaerobic oxidation of methane* [AOM]) dilakukan oleh bakteri dan arkea. Bakteri metanotrof yang diketahui bersifat anaerob termasuk ke dalam filum NC10. Salah satu jenis bakteri tersebut adalah '*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*' yang menggunakan nitrat sebagai penerima elektron terakhir (*denitrifying anaerobic methane oxidizing* [DAMO]) (Ettwig *et al.* 2010). Sementara itu, kelompok arkea metanotrof yang bersifat anaerob adalah kelompok ANME-1, ANME-2, dan ANME-3. Beberapa anggota kelompok tersebut mengoksidasi CH₄ yang digabungkan dengan reduksi sulfat atau membentuk asosiasi dengan bakteri pereduksi sulfat. Mekanisme oksidasi CH₄ secara anaerob terjadi ketika bakteri pereduksi sulfat menggunakan H₂, sehingga konsentrasi H₂ menurun. Hal ini menyebabkan konsentrasi CH₄ lebih tinggi daripada H₂, dan reaksi yang mungkin terjadi secara termodinamika adalah oksidasi CH₄ menjadi CO₂ (Caldwell *et al.* 2008). Adapun kelompok ANME-2D mengoksidasi CH₄ dengan menggunakan nitrat sebagai penerima elektron terakhir. Nitrit yang dihasilkan selanjutnya direduksi oleh bakteri pengoksidasi amonium menjadi N₂ (*anaerobic ammonium oxidation* [anammox]) (Haroon *et al.* 2013).

Aplikasi Bakteri Metanotrof sebagai Pupuk Hayati

Manipulasi komunitas mikroba di rizosfer menjadi salah satu strategi dalam mengontrol siklus biogeokimia, antara lain mitigasi emisi CH_4 (Singh *et al.* 2010) dan meningkatkan kesuburan tanah (Chaparro *et al.* 2012). Penggunaan pupuk hayati yang mengandung bakteri metanotrof bertujuan mengoptimalkan struktur komunitas dan aktivitas metanotrof di daerah perakaran padi. Selain mampu mengoksidasi CH_4 , beberapa bakteri metanotrof diketahui memiliki kemampuan fiksasi N_2 , termasuk metanotrof tipe I dan tipe II (Auman *et al.* 2001). Bakteri tersebut terbukti memiliki gen *nifH* dan *nifD* yang masing-masing menyandikan enzim dinitrogenase reductase dan subunit α enzim dinitrogenase yang terlibat pada proses fiksasi N_2 (Dedysh *et al.* 2004). Berdasarkan hal tersebut, pupuk hayati yang mengandung bakteri metanotrof diharapkan tidak hanya mampu menurunkan emisi CH_4 , tetapi juga memacu pertumbuhan padi.

Bakteri metanotrof yang digunakan sebagai pupuk hayati pada penelitian ini, di antaranya isolat BGM1, BGM3, BGM9, dan SKM14. Isolat BGM1, BGM3, dan BGM9 diisolasi dari tanah sawah di Bogor, sedangkan SKM14 diisolasi dari tanah sawah di Sukabumi, Jawa Barat. *Methylocystis rosea* BGM1, *Methylocystis parvus* BGM3, *Methylobacter* sp. BGM9, dan *Methylococcus capsulatus* SKM14 merupakan bakteri Gram negatif yang mampu mengoksidasi CH_4 secara *in vitro* masing-masing sebesar 969.63, 4,186.25, 66,556.83, dan 25,654.72 mol hari⁻¹. Isolat BGM1 dan SKM14 terbukti memiliki gen *pmoA*, dan BGM9 memiliki gen *mmoX* yang menyandikan enzim MMO (Rusmana dan Akhdiya 2009). Isolat BGM1, BGM3, dan BGM9 diketahui memiliki aktivitas nitrogenase berturut-turut sebesar 10.9, 7.1, dan 15.3 nM jam⁻¹ mL⁻¹ kultur (Maisaroh 2009). Lebih lanjut, Bintarti *et al.* (2014) melaporkan bahwa BGM3 dan BGM9 memiliki gen *nifH* dan *nifD* penyandi enzim yang terlibat dalam fiksasi N_2 .

Aplikasi bakteri metanotrof terbukti mampu menurunkan laju emisi CH_4 di rumah kaca (Muttaqin 2012) dan sawah irigasi di Sukabumi, Jawa Barat (Pingak *et al.* 2014; Sutanto *et al.* 2014; Sukmawati *et al.* 2015). Aplikasi pupuk hayati di sawah masih dikombinasikan dengan pupuk sintetis untuk mempertahankan angka produksi padi. Beberapa penelitian sebelumnya mengombinasikan pupuk hayati dengan berbagai dosis pupuk sintetis. Bakteri metanotrof yang dikombinasikan dengan bakteri PGPR, bakteri pereduksi N_2O , dan pupuk NPK sebesar 62.5 kg ha⁻¹ atau 25% dari 100% dosis rekomendasi (250 kg ha⁻¹) mampu menurunkan emisi CH_4 , serta meningkatkan produktivitas padi dibandingkan dengan aplikasi pupuk NPK 100% dan pupuk NPK 25% tanpa bakteri (Pingak *et al.* 2014). Sutanto *et al.* (2014) melaporkan bahwa bakteri metanotrof yang diaplikasikan dengan pupuk NPK 200 kg ha⁻¹ juga mampu menurunkan laju emisi CH_4 dibandingkan aplikasi pupuk NPK 300 kg ha⁻¹. Selain itu, aplikasi bakteri metanotrof dan pereduksi N_2O yang dikombinasikan dengan pupuk NPK 50 kg ha⁻¹ (20% dari 100% dosis rekomendasi [250 kg ha⁻¹]) terbukti mampu menurunkan fluks CH_4 , serta memacu pertumbuhan tanaman padi (Sukmawati *et al.* 2015). Uji multilokasi perlu dilakukan untuk mengetahui efektivitas bakteri tersebut di berbagai lahan sawah. Selain diaplikasikan di sawah irigasi, bakteri metanotrof juga diaplikasikan pada sawah tadah hujan di Kupang, Nusa Tenggara Barat. Bakteri metanotrof dan pupuk NPK 50% menghasilkan produktivitas padi yang paling tinggi dan fluks CH_4 yang paling rendah (Taopan *et al.* 2018). Berdasarkan hasil pada penelitian sebelumnya,



penelitian ini menggunakan bakteri metanotrof dan pereduksi N₂O yang dikombinasikan dengan pupuk urea berdasarkan praktik penanaman padi yang biasa dilakukan oleh petani lokal di sawah irigasi, Kabupaten Tegal, Jawa Tengah.

Analisis Metagenom Menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS)

Keragaman mikrob di alam sangat tinggi dan hanya sekitar 1% diantaranya yang dapat dikulturkan (Amann *et al.* 1995; Torsvik dan Øvreås 2002). Sebagian besar mikrob beradaptasi pada lingkungan yang spesifik, sehingga tidak dapat ditumbuhkan pada kondisi kultur di laboratorium. Komposisi medium yang tepat untuk menumbuhkan sebagian besar mikrob belum banyak diketahui. Berdasarkan hal tersebut, analisis keragaman mikrob berbasis kultur tidak mampu menggambarkan keseluruhan komunitas mikrob di suatu lingkungan. Sebagai akibatnya, mikrob di lingkungan sulit diidentifikasi dan dikaji peranannya (Gibbons dan Gilbert 2015). Saat ini, teknik metagenom sedang berkembang pesat untuk mengatasi keterbatasan teknik kultur dalam mempelajari keragaman dan fungsi mikrob di suatu lingkungan. Metagenom dilakukan melalui analisis materi genetik seluruh organisme di suatu lingkungan tanpa perlu menumbuhkannya pada medium artifisial.

Teknik metagenom telah digunakan secara luas untuk mengkaji aspek mikrobiologi pada berbagai lingkungan, seperti tanah, perairan, saluran pencernaan hewan, lingkungan geotermal, dan sebagainya. Selain dapat digunakan untuk menggambarkan struktur komunitas mikrob di suatu lingkungan, penggunaan metagenom memungkinkan fragmen gen-gen fungsional dapat diperoleh langsung dari lingkungan, misalnya gen penyandi senyawa bioaktif, antibiotik, dan enzim. Beberapa teknik metagenom yang banyak digunakan, antara lain *length heterogeneity PCR* (LH-PCR), *automated ribosomal intergenic spacer analysis* (ARISA), *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), *temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE), *terminal restriction fragment length polymorphism* (TRFLP), *fluorescent in situ hybridization* (FISH), *amplified ribosomal DNA restriction analysis* (ARDRA), dan *single strand conformation polymorphism* (SSCP). Teknik-teknik tersebut memiliki keterbatasan, terutama untuk mendapatkan informasi detail tentang keseluruhan mikrob di suatu lingkungan. Keterbatasan tersebut umumnya muncul ketika menganalisis komunitas yang kompleks, ekstrim atau memiliki keragaman tinggi (Delmont *et al.* 2011).

Selama satu dekade terakhir, *next generation sequencing* (NGS) (*second generation sequencing*) telah berkembang pesat sebagai metode revolusioner dan efektif dalam menganalisis keseluruhan keragaman mikrob di lingkungan. Teknologi NGS mampu membaca sekuens DNA dengan jumlah yang banyak dalam satu waktu pembacaan (*massively parallel sequencing*). Oleh karena itu, teknik ini lebih murah, cepat, dan efektif dibandingkan teknik sekuensing Sanger (*first generation sequencing*). NGS menghasilkan data sekuens DNA yang besar, sehingga membutuhkan komputer dengan kapasitas memori yang tinggi dan keahlian khusus dalam mengolah data sekuens. Teknik NGS yang banyak digunakan adalah Roche 454, Illumina, Sequencing by Oligo Ligation Detection (SOLiD), Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), dan PacBio (Tabel 5). Roche 454 merilis 454 Genome Sequencer pada tahun 2005 sebagai *platform* NGS

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

@Hak cipta dilindungi IPB University

yang pertama. Setahun kemudian, Illumina meluncurkan Solexa/Illumina dan saat ini menjadi *platform* yang paling banyak digunakan. Applied Biosystems merilis SOLiD pada tahun 2007, kemudian Ion Torrent meluncurkan PGM pada tahun 2010 (van Dijk *et al.* 2014).

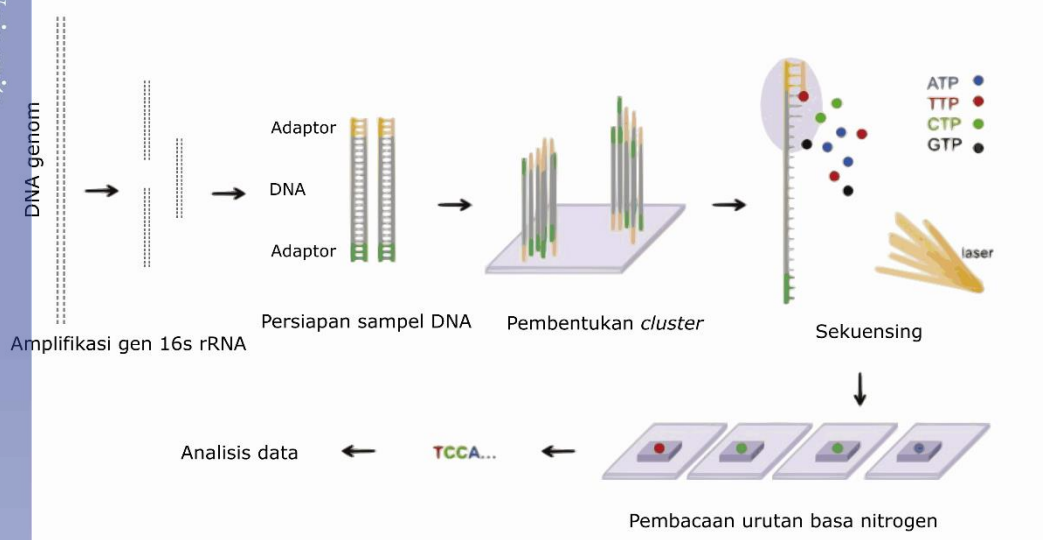
Tabel 5 Spesifikasi teknis empat *platform* NGS yang banyak digunakan (Quail *et al.* 2012; van Dijk *et al.* 2014; Hodkinson dan Grice 2015)

	Sanger	Roche 454	Illumina	SOLiD	Ion Torrent
Mekanisme sekuensing	<i>irreversible termination</i>	<i>pyro-sequencing</i>	<i>reversible termination</i>	<i>sequencing by ligation</i>	<i>semiconductor sequencing</i>
Panjang pembacaan basa (nt)	400 – 900	110-1,000	35 – 300	35 - 75	200 - 400
Error rates	0.1 %	1 %	>1 %	0.01 %	1 – 1.7 %
Akurasi	>Q20	>Q20	>Q30	Q20	Q20
Hasil pembacaan	1,9 – 84 kb	0.02-0.7 Gb	1-1,800 Gb	3-320 Gb	0.3-10 Gb
Biaya yang dibutuhkan (USD per Gb)	\$ 6,000	\$ 12,000	\$ 41 - 502	\$ 40	\$ 1,000
Waktu yang dibutuhkan	20 menit – 3 jam	24 jam	3 – 10 hari	7 – 14 hari	2 - 4 jam

Platform NGS yang digunakan pada penelitian ini adalah Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, US). *Platform* ini menggunakan kombinasi metode *bridge amplification* dan *sequencing by synthesis* dengan metode *reversible dye-termination* dalam mengurutkan basa nitrogen pada suatu utas DNA. Teknik ini dikembangkan dari prinsip sekuensing Sanger. Perbedaan antara dua teknik tersebut adalah bahwa proses terminasi selama polimerisasi DNA pada sekuensing Sanger tidak dapat dipulihkan (*irreversible dye-termination*), sedangkan pada Illumina bersifat dapat dipulihkan sehingga proses sintesis DNA dapat dilanjutkan pada utas yang sama (*reversible dye-termination*) (Quail *et al.* 2012; Liu *et al.* 2014).

Proses sekuensing DNA dengan menggunakan *platform* Illumina terdiri atas 4 tahapan utama, yaitu persiapan sampel DNA (*sample preparation*), pembentukan kluster (*cluster generation*), sekuensing, dan analisis data sekuens DNA. Pada *amplicon sequencing*, fragmen DNA target disiapkan salah satunya melalui *two-step PCR*. PCR tahap pertama bertujuan mengamplifikasi DNA target sekaligus menambahkan adapter Illumina pada ujung 5' dan 3' fragmen DNA target. Selanjutnya, PCR tahap kedua dilakukan untuk menambahkan *index* atau *barcode* pada ujung 5' dan 3' fragmen DNA tersebut (*multiplexing process*). *Index* atau *barcode* bersifat unik pada setiap sampel karena berfungsi sebagai pembeda antarsampel. Tahap selanjutnya yaitu pembentukan kluster pada Illumina MiSeq. Proses ini diawali dengan penempelan produk PCR pada *flow cell*, kemudian produk PCR diperbanyak melalui teknik *bridge amplification* hingga menghasilkan jutaan kopian DNA baru pada setiap *flow cell*. Proses *sequencing by synthesis* dimulai dengan menambahkan primer, DNA polimerase, dan empat jenis nukleotida *dideoxynucleotide triphosphates* (ddNTP) yang meliputi ddATP, ddGTP, ddCTP, dan ddTTP. Setiap ddNTP telah diberi penanda *fluorescens* yang terikat pada basa nitrogen dan *removable blocking group* pada atom oksigen di ujung 3'-OH gula pentosa. Grup 3'-OH dimodifikasi secara kimia untuk mencegah

enzim polimerase menambahkan lebih dari satu nukleotida pada setiap siklus. Salah satu modifikasi grup 3'OH adalah substitusi grup tersebut dengan grup 3'-o-azidomethyl. Setelah penambahan satu nukleotida yang tepat pada rantai DNA, *fluorescens* akan berpendar sesuai dengan jenis nukleotida yang ditambahkan kemudian pendaran tersebut dibaca oleh detektor. Selanjutnya, ujung 3'-OH diregenerasi dengan menghilangkan 3'-o-azidomethyl melalui penggunaan tris-(2-carboxyethyl)-phosphine, sehingga proses sintesis DNA dapat dilanjutkan (*reversible dye-terminators*). Satu siklus pembacaan sekuens DNA terdiri atas tiga tahap, yaitu penambahan satu ddNTP pada rantai DNA, pembacaan pendaraan *fluorescens*, dan proses regenerasi ujung 3'-OH (Bentley *et al.* 2006). Data yang diperoleh berupa jutaan sekuens DNA yang selanjutnya diolah menggunakan perangkat lunak khusus (Gambar 3).



Gambar 3 Tahapan metode *amplicon sequencing* dengan menggunakan Illumina *platform* (gambar dimodifikasi dari Atlas of Oral Microbiology 2015)

Illumina MiSeq dapat menghasilkan pembacaan sepanjang 300 basa hingga 1.5 Gb dalam waktu 10 jam (Liu *et al.* 2014). Illumina MiSeq memiliki ukuran pembacaan yang lebih pendek dibandingkan metode Sanger (Tabel 4). Namun, jumlah basa tersebut sudah cukup untuk analisis taksonomi dan *barcode* organisme (Vasileiadis *et al.* 2012). Selain itu, kapasitas hasil pembacaan yang lebih besar memungkinkan hasil analisis yang lebih luas, akurat, dan murah dibandingkan metode sekuensing Sanger (Liu *et al.* 2014; Hodkinson dan Grice 2015). Beberapa analisis metagenom yang menggunakan Illumina MiSeq, antara lain analisis metagenom mikroba pada pertambangan besi (Hong *et al.* 2015), sedimen danau (Fan dan Xing 2016), daerah perakaran padi (Edwards *et al.* 2014; Wu *et al.* 2018), tanah sawah (Liu *et al.* 2019).

Gen Marka pada Analisis Metagenom

Keragaman mikroba dipelajari dengan menggunakan suatu penanda molekuler yang bersifat universal. Penggunaan sekuens gen 16S rRNA sebagai

penanda universal merupakan standar umum dalam mengkaji hubungan filogenetik prokariot sejak pertama kali diperkenalkan oleh Woese (1987). Gen 16S rRNA memiliki ukuran sekitar $\pm 1,500$ pb yang terdiri atas daerah konservatif (*conserved region*) dan sembilan daerah variatif (*hypervariable region* [HVR]) yang menjadi ciri khas setiap mikroba. Beberapa takson dilaporkan memiliki lebih dari satu kopian gen 16S rRNA di dalam satu genom, yaitu 1-15 kopian pada bakteri dan 1-4 kopian pada arkea. Hal ini berdampak pada estimasi kelimpahan relatif suatu takson yang dianalisis menggunakan gen tersebut. Kelimpahan relatif cenderung *overestimation* untuk takson dengan kopian gen yang tinggi, seperti Gammaproteobacteria dan Firmicutes, dan *underestimation* untuk takson dengan kopian gen yang rendah, misalnya Acidobacteria (Větrovský dan Baldrian 2013). Selain itu, sekuens gen 16S rRNA bisa bervariasi meskipun dalam satu genom (*intragenomic heterogeneity*) dan variasi tersebut meningkat seiring peningkatan jumlah kopian gen (Sun *et al.* 2013; Větrovský dan Baldrian 2013). Daerah V4 dan V5 pada bakteri memiliki variasi dalam satu genom yang paling rendah, sehingga V4-V5 dapat meminimalkan *overestimation* pada takson bakteri (Sun *et al.* 2013). Sementara itu, arkea umumnya dideteksi dengan menggunakan daerah V4. Berdasarkan hal tersebut, analisis metagenom pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan daerah V4-V5 untuk bakteri dan V4 untuk arkea.

Beberapa penelitian sebelumnya mempelajari struktur komunitas metanogen untuk mengetahui hubungannya dengan emisi CH₄. Deteksi metanogen di lingkungan dapat dilakukan menggunakan gen 16S rRNA yang spesifik untuk metanogen (Watanabe *et al.* 2006; Watanabe *et al.* 2010; Breidenbach *et al.* 2016), gen fungsional *mcrA* (Luton *et al.* 2002; Watanabe *et al.* 2009; Wilkins *et al.* 2015; Seo *et al.* 2014), atau kombinasi kedua gen tersebut (Lee *et al.* 2014). Gen *mcrA* menyandikan subunit α pada enzim MCR yang merupakan enzim kunci pada tahap terakhir pembentukan CH₄. Gen ini diketahui terdapat pada semua metanogen sehingga sering digunakan sebagai marker metanogen di lingkungan (Friedrich 2005). Menurut Wilkins *et al.* (2015), deteksi menggunakan gen *mcrA* menunjukkan keragaman yang lebih tinggi dibandingkan gen 16S rRNA pada *anaerobic digester*. Hal ini mendukung penggunaan gen *mcrA* sebagai biomarker metanogen di lingkungan. Di samping itu, penggunaan *mcrA* sebagai penanda molekuler berpeluang mendapatkan spesies metanogen yang baru (Friedrich 2005). Analisis filogenetik menggunakan gen *mcrA* tidak hanya dapat menggambarkan keragaman metanogen, tetapi juga keragaman arkea metanotrof (Silva *et al.* 2014). Namun, primer yang digunakan pada penelitian ini mendeteksi gen *mcrA* yang terdapat pada metanogen (Luton *et al.* 2002).

Komunitas metanotrof di lingkungan dapat dikaji menggunakan gen 16S rRNA dan gen fungsional. Karakterisasi populasi metanotrof bisa dilakukan berdasarkan gen 16S rRNA yang spesifik untuk metanotrof. Adapun gen fungsional yang sering digunakan untuk mengidentifikasi metanotrof, antara lain *pmoA*, *mmoX*, dan *mxoF*. Gen *pmoA* menyandikan subunit β enzim pMMO, sedangkan *mmoX* dan *mxoF* masing-masing menyandikan subunit α dari enzim sMMO dan MDH (Henckel *et al.* 1999; Horz *et al.* 2001). Gen *pmoA* ditemukan pada hampir semua metanotrof, sehingga digunakan secara luas sebagai penanda molekuler dalam mempelajari komunitas metanotrof di lingkungan (McDonald dan Murrell 1997; Henckel *et al.* 1999; Hakemian dan Rosenzweig 2007; Sutanto *et al.* 2014; Lee *et al.* 2014; Seo *et al.* 2014).



METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan melalui dua tahap. Tahap pertama yaitu penanaman padi pada bulan Juli hingga November 2016 di lahan sawah daerah Lebaksiu (7°02'44.8" LS, 109°08'16.6" BT), Kabupaten Tegal, Jawa Tengah. Penelitian tahap kedua yaitu analisis metagenom yang dilakukan pada bulan Desember 2016 hingga Februari 2019 di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi FMIPA IPB dan perusahaan jasa sekuensing Axil Scientific, Singapura.

Kerangka Penelitian

Penelitian ini menganalisis struktur komunitas mikrob di tanah sawah yang diberi dua perlakuan pemupukan selama fase vegetatif dan generatif padi, serta hubungannya dengan emisi CH₄ di lahan sawah. Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahapan yang meliputi pengambilan sampel tanah, ekstraksi DNA, persiapan sampel DNA, sekuensing DNA dengan menggunakan NGS, analisis data sekuens DNA, dan analisis hubungan metanogen dan metanotrof dengan laju emisi CH₄ di sawah (Gambar 4).

Prosedur Penelitian

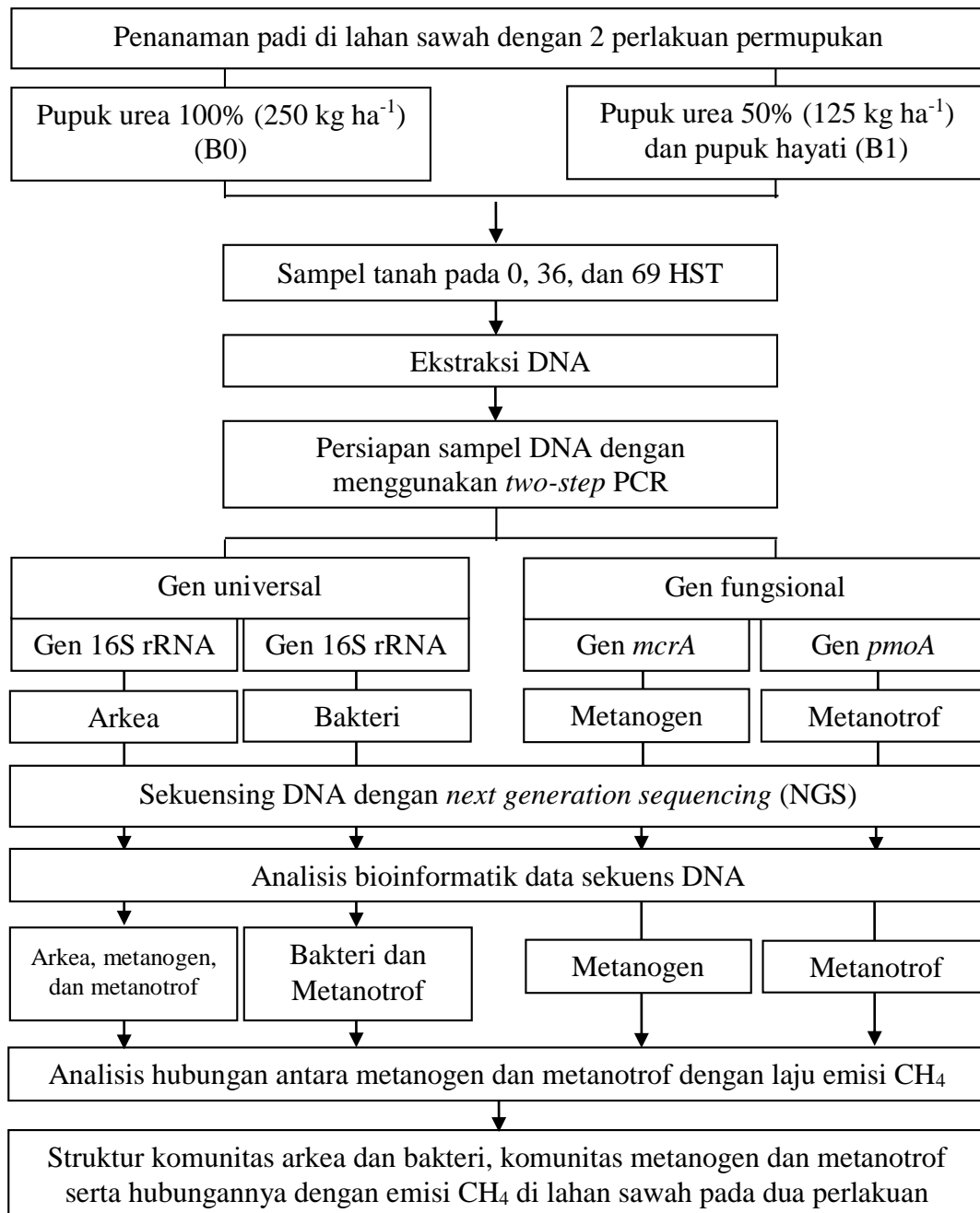
Analisis Sifat Fisika dan Kimia Tanah

Sebelum dilakukan aplikasi pupuk, sebanyak 1 kg tanah sawah diambil secara acak dalam 2 ulangan untuk dianalisis karakteristik fisika dan kimianya di Indonesian Center for Biodiversity and Biotechnology (ICBB), Bogor.

Aplikasi Pupuk di Lahan Sawah

Lahan sawah yang digunakan pada penelitian ini merupakan lahan yang biasa digunakan untuk penanaman padi dan tidak dimanfaatkan untuk budidaya tanaman lain. Aplikasi pupuk dilakukan di lahan sawah dengan 2 perlakuan pemupukan, yaitu urea 100% (250 kg ha⁻¹) (B0) dan sekitar 50% urea (125 kg ha⁻¹) dengan pupuk hayati (B1). Pupuk hayati yang digunakan pada penelitian ini merupakan kombinasi 4 isolat bakteri metanotrof (*Methylocystis rosea* BGM1, *Methylocystis parvus* BGM3, *Methylococcus capulatus* BGM9, dan *Methylobacter* sp. SKM14), dan 1 isolat bakteri pereduksi N₂O (*Ochrobactrum anthropi* BL2) dengan kepadatan sel mencapai 10⁸ sel mL⁻¹ dan volume total 40 L (Rusmana dan Akhdiya 2009; Setyaningsih *et al.* 2010). Setiap perlakuan dilakukan di 3 petak terpisah dengan luas total mencapai ±1,500 m². Bibit padi varietas Membramo dipindahtanamkan di lahan sawah sesuai perlakuan. Bibit ditanam sebanyak 3 batang per lubang tanam dengan jarak 20 cm x 20 cm pada setiap petak perlakuan. Pada perlakuan B0, bibit padi langsung dipindahtanamkan ke lahan sawah. Sementara pada perlakuan B1, akar bibit padi direndam dalam suspensi pupuk hayati selama ±15 menit sebelum dipindahtanamkan. Pemindahan tanam bibit padi ditandai sebagai 0 hari setelah tanam (HST). Selanjutnya, urea (CO(NH₂)₂)

diaplikasikan di setiap perlakuan pada 15 HST. Lahan sawah digenangi terus menerus hingga masa generatif padi, kemudian dikeringkan hingga pemanenan padi pada 106 HST.



Gambar 4 Kerangka penelitian

Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah sawah dilakukan pada Juli hingga Oktober 2016. Sampel tanah diambil dari daerah sekitar perakaran padi pada kedalaman 0-15 cm dengan menggunakan pipa plastik berdiameter 4.5 cm. Pada setiap perlakuan, sampel tanah diambil secara acak sebanyak 3 ulangan pada 3 waktu pengambilan sampel, yaitu 0 HST (sebelum aplikasi pupuk), 36 HST (fase vegetatif padi), dan

69 HST (fase generatif padi). Sebanyak 1 gram sampel tanah dari setiap ulangan pada perlakuan yang sama dicampurkan untuk memperoleh komposit tanah yang homogen. Secara keseluruhan, terdapat 6 sampel komposit tanah yang dianalisis (2 perlakuan x 3 waktu pengambilan sampel). Sampel diberi kode sesuai dengan waktu pengambilan sampel dan jenis perlakuan (Tabel 6).

Tabel 6 Kode sampel tanah sawah yang diambil dari setiap perlakuan selama pertumbuhan padi

No.	Kode Sampel	Waktu Pengambilan (HST)	Perlakuan
1.	0B0	0	Pupuk urea 100%
2.	36B0	36	Pupuk urea 100%
3.	69B0	69	Pupuk urea 100%
4.	0B1	0	Pupuk urea 50% dengan pupuk hayati
5.	36B1	36	Pupuk urea 50% dengan pupuk hayati
6.	69B1	69	Pupuk urea 50% dengan pupuk hayati

Ekstraksi DNA dari Sampel Tanah

DNA diekstraksi dari sampel tanah menggunakan DNeasy[®] PowerSoil[®] Kit (QIAGEN, Hilden, DE) dan ZymoBIOMICS DNA Mini Kit (Zymo Research, Irvine, CA, US) berdasarkan prosedur yang disarankan produsen. Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur dengan metode spektrofotometri menggunakan Nano drop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, US). DNA hasil ekstraksi juga dicek kualitasnya menggunakan elektroforesis pada gel agarosa 2% dalam buffer TAE 1x (40 mM Tris base, 20 mM asam asetat glasial, 1 mM EDTA, pH 8.0). Pita DNA diwarnai dengan ethidium bromide (EtBr) 0.1%, kemudian dilakukan visualisasi dengan UV Transiluminator. Ekstrak DNA disimpan pada suhu -20 hingga -80 °C hingga analisis selanjutnya.

Analisis Komunitas Mikrob dengan *Next Generation Sequencing* (NGS)

Komunitas arkea dan bakteri di tanah sawah dideteksi menggunakan gen 16S rRNA pada 0, 36, dan 69 HST. Selain itu, komunitas metanogen dan metanotrof juga dideteksi menggunakan gen fungsional pada 36 HST yang menunjukkan laju emisi CH₄ tinggi berdasarkan penelitian sebelumnya (Fatma 2019). Analisis komunitas mikrob tersebut dilakukan dengan teknik NGS menggunakan Illumina MiSeq Platform (Illumina, San Diego, CA, US). Tahap persiapan sampel hingga analisis data dilakukan oleh Axil Scientific, Singapura. Tahap persiapan sampel DNA dilakukan menggunakan *two-step PCR*. Sebelum tahap *two-step PCR*, komunitas arkea diamplifikasi sesuai prosedur Vissers *et al.* (2009). PCR pertama dilakukan dengan primer 21F (5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3') dan 958R (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3') untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan ukuran ~950 pb (DeLong *et al.* 1992). Reaksi PCR dibuat dengan total volume 25 µL yang mengandung 12.5 µL Q5 High-fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, US), 1.25 µL setiap 10 µM primer *forward* dan *reverse*, 5 µL template DNA, dan 5 µL *nuclease-free water*. Kondisi PCR yang digunakan meliputi 30 siklus yang terdiri atas denaturasi 94 °C selama 45 detik, penempelan primer pada 55 °C selama 60 detik, dan elongasi pada 72 °C selama 90

detik. Produk PCR yang diperoleh digunakan sebagai DNA cetakan pada tahap *two-step* PCR.

Tahap *two-step* PCR dilakukan sesuai dengan prosedur yang disarankan oleh Illumina. PCR tahap pertama bertujuan untuk mengamplifikasi daerah V4 gen 16S rRNA arkea, V4-V5 gen 16S rRNA bakteri, gen *mcrA* kelompok metanogen, dan gen *pmoA* kelompok metanotrof dengan menggunakan masing-masing pasangan primer yang telah ditambahkan sekuens adapter Illumina (Table 7). Reaksi PCR dibuat sebanyak 25 μL dengan menggunakan Q5 Hot Start High Fidelity PCR 2X Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, US) yang terdiri atas 12.5 μL Q5 High-Fidelity 2x Master Mix, 1.25 μL untuk setiap 10 μM primer *forward* dan *reverse*, 5 μL template DNA, dan 5 μL *nuclease-free water*. Kondisi PCR meliputi pradenaturasi pada 98 °C selama 30 detik, kemudian diikuti 30 siklus pada 98 °C selama 10 detik, x °C (suhu penempelan primer setiap gen target [Tabel 7]) selama 30 detik, dan 72 °C selama 30 detik, serta pasca elongasi pada 72 °C selama 2 menit. Kualitas dan kuantitas DNA diukur dengan menggunakan Agilent 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, US), Helixyte™ Green dsDNA Quantifying reagent (AAT Bioquest, Inc., CA, US), dan Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, US). Pita DNA yang berukuran sekitar 400-500 pb dipilih untuk tahap selanjutnya. Produk PCR tersebut kemudian dimurnikan dengan Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, DE). Produk PCR yang diperoleh digunakan sebagai DNA cetakan pada PCR tahap kedua. PCR tahap kedua ini bertujuan menambahkan *index* atau *barcode* yang dilakukan menggunakan Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, US). Reaksi PCR dibuat dalam 50 μL yang terdiri atas 25 μL Q5 High-Fidelity 2x Master Mix, 5 μL Nextera XT i7 indices, 5 μL Nextera XT i5 indices, 5 μL produk PCR pada PCR tahap pertama, dan 10 μL *nuclease-free water*. Reaksi PCR diawali dengan pradenaturasi pada 98°C selama 3 menit, diikuti 8 siklus pada 98°C selama 30 detik, 55°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik, serta pasca elongasi pada 72°C selama 5 menit. Setiap produk PCR dari sampel yang berbeda dengan konsentrasi yang sama dicampurkan menjadi satu, kemudian disekuensing menggunakan Illumina MiSeq *platform* berdasarkan standar prosedur Axil Scientific.

Analisis Data Sekuens DNA

Data sekuens DNA dianalisis sesuai standar prosedur Axil Scientific seperti yang diuraikan berikut ini. Sekuensing dengan menggunakan Illumina MiSeq *platform* menghasilkan *paired-end reads*. *Paired-end reads* adalah sekuens DNA hasil pembacaan satu fragmen DNA dari dua arah yang berbeda, yaitu *forward* dan *reverse*. *Paired-end reads* dipisahkan sesuai dengan *index* atau *barcode* yang spesifik pada setiap sampel, kemudian sekuens primer, adapter, dan *index/barcode* dipotong. *Paired-end reads* digabungkan menggunakan Fast Length Adjustment of Short Reads (FLASH) v1.2.7 (Magoč dan Salzberg 2011). Proses penggabungan (*reads merging*) terjadi ketika setidaknya beberapa sekuens DNA tumpang tindih dengan satu sekuens DNA yang disintesis dari ujung berlawanan pada fragmen DNA yang sama. Sekuens yang diperoleh (*splicing sequence*) disebut sebagai *raw reads* (total sekuens). *Raw reads* diseleksi sesuai dengan kualitasnya untuk memperoleh sekuens berkualitas tinggi (*high-quality sequences*) pada kondisi seleksi yang spesifik menurut Quantitative Insight into Microbial Ecology (QIIME) v1.7.0 (Caporaso *et al.* 2010; Bokulich *et al.* 2013). Parameter kualitas sekuens



DNA yang dinilai meliputi ukuran DNA, kualitas basa nitrogen, dan *missamplified taxa* seperti mitokondria dan kloroplas. *High-quality sequences* dibandingkan dengan Genomes Online Database (GOLD) database menggunakan UCHIME algorithm untuk mendeteksi kimera (*chimera*) (Edgar *et al.* 2011), kemudian kimera dikeluarkan dari proses analisis sehingga diperoleh *effective tags* (Haas *et al.* 2011).

Tabel 7 Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA komunitas arkea, bakteri, metanogen, dan metanotrof pada sampel DNA asal tanah sawah

Primer	Sekuens primer ^a	Suhu penempelan primer (x)	Gen target	Pustaka
Parch519f- Arch915r	Parch519 (5'-CAG CCG CCG CGG TAA-3') Arch915 (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3')	71 °C	V4 pada gen 16S rRNA arkea	Coolen <i>et al.</i> (2004)
515F-907R	515F (5'-GTG CCA GCA GCC GCG GTA A-3') 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3')	71 °C	V4-V5 pada gen 16S rRNA bakteri	Caporaso <i>et al.</i> (2011); Armitage <i>et al.</i> (2012)
mcrF-mcrR	mcrF (5'-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC-3') mcrR (5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT-3')	69 °C	gen <i>mcrA</i> pada metanogen	Luton <i>et al.</i> (2002)
A189f- A682r	A189f (5'- GGN GAC TGG GAC TTC TGG-3') A682r (5'-GAA SGC NGA GAA GAA SGC-3')	70 °C	gen <i>pmoA</i> pada metanotrof	Holmes <i>et al.</i> (1995); Henckel <i>et al.</i> (1999)

^a Primer *forward* dan *reverse* masing-masing ditambahkan adapter Illumina pada ujung 5'

Tahap selanjutnya yaitu pengelompokan OTU dengan menggunakan UPARSE v7.0.1001 (Edgar 2013). Sejumlah sekuens DNA yang memiliki kemiripan urutan basa nitrogen $\geq 97\%$ dikelompokkan menjadi satu *operational taxonomic unit* (OTU). Sekuens DNA yang paling sering muncul dalam satu OTU dipilih sebagai perwakilan sekuens (*representative sequence*). Selanjutnya, setiap perwakilan sekuens gen 16S rRNA arkea dan bakteri diklasifikasikan berdasarkan taksonomi (*taxonomic assignment*) menurut Greengene database (DeSantis *et al.* 2006) menggunakan RDP classifier algorithm V2.2 (Wang *et al.* 2007). Sementara itu, sekuens gen *mcrA* dan *pmoA* diidentifikasi menurut National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Informasi kelimpahan OTU dinormalisasi menggunakan standar jumlah sekuens berdasarkan sampel yang memiliki jumlah sekuens paling sedikit. Data yang sudah dinormalisasi menjadi dasar untuk analisis keragaman alfa (*alpha diversity*) dan keragaman beta (*beta diversity*).

Alpha diversity dilakukan untuk mengetahui keragaman mikrob pada setiap sampel, sedangkan *beta diversity* untuk mengetahui keragaman mikrob di antara sampel yang berbeda. *Alpha diversity* dianalisis pada komunitas arkea, bakteri, metanogen dan metanotrof, sedangkan *beta diversity* hanya dilakukan untuk

komunitas arkea dan bakteri. *Alpha diversity* dianalisis dalam bentuk 5 indeks, antara lain jumlah spesies (S), indeks keragaman Shannon (H'), indeks keragaman Simpson (D), dan indeks pemerataan jenis (Shannon *equitability index* [E_H]). Analisis *alpha diversity* dilakukan menggunakan QIIME V1.7.0 dan perangkat lunak R V2.15.3. Indeks keragaman Shannon dan Simpson digunakan untuk mengidentifikasi keragaman mikrob, termasuk kekayaan dan pemerataan spesies dalam komunitas. Indeks pemerataan jenis menggambarkan persebaran OTU pada spesies. Hasil analisis OTU juga ditampilkan dalam bentuk *rarefaction curve* dan diagram Venn. *Rarefaction curve* merupakan kurva yang digunakan untuk menggambarkan kedalaman pengambilan sampel yang dilakukan. Ketika kurva mencapai kejenuhan, dimana peningkatan jumlah sekuens DNA tidak menyebabkan peningkatan jumlah spesies, maka jumlah data yang dihasilkan dapat menggambarkan keseluruhan komunitas pada sampel secara akurat. Diagram Venn digunakan untuk menampilkan OTU yang spesifik pada waktu tertentu dan OTU yang selalu ada pada 0, 36, dan 69 HST pada setiap perlakuan, serta OTU yang ada di antara dua perlakuan. Analisis *beta diversity* dilakukan menggunakan analisis pengelompokan (*clustering analysis*) dengan metode Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) berdasarkan Weighted Unifrac distance matrix menggunakan QIIME V1.7.0. Dendrogram yang dihasilkan kemudian diintegrasikan dengan kelimpahan relatif mikrob pada tingkat filum.

Analisis Komunitas Metanogen dan Metanotrof serta Hubungannya dengan Laju Emisi CH₄

Komunitas metanogen dikelompokkan dari data komunitas arkea berdasarkan gen 16S rRNA. Famili-famili yang diketahui sebagai metanogen digabungkan, kemudian dihitung kelimpahan relatifnya. Sementara itu, kelompok metanotrof diperoleh dari data komunitas arkea dan bakteri. Famili-famili yang termasuk metanotrof dikelompokkan dan dihitung kelimpahan relatifnya. Berdasarkan data kelimpahan relatif metanogen dan metanotrof, rasio metanogen:metanotrof dihitung dengan membagi kelimpahan relatif metanogen terhadap metanotrof. Selanjutnya, hubungan antara rasio metanogen:metanotrof dengan laju emisi CH₄ pada fase vegetatif dan generatif padi dianalisis dengan menggunakan Minitab 16 (Minitab, Inc., State College, PA, US). Data laju emisi CH₄ pada fase vegetatif dan generatif padi diperoleh dari laporan sebelumnya (Fatma 2019).

HASIL

Sifat Fisika dan Kimia Tanah

Tanah sawah pada lokasi penelitian memiliki tekstur lempung berdebu dengan kandungan karbon organik sebesar 3.30% dengan pH 6.55. Sifat fisik dan kimia tanah disajikan pada Tabel 8.



Tabel 8 Sifat fisika dan kimia tanah sawah

No.	Parameter	Unit	Nilai	Kategori
1	C-organik	%	3.30	Tinggi
2	N-total	%	0.12	Sangat rendah
3	Rasio C/N	-	40.70	Sangat tinggi
4	P ₂ O ₅ tersedia	ppm	39.25	Sangat tinggi
5	K ₂ O tersedia	ppm	137.09	Tinggi
6	P ₂ O ₅ potensial	ppm	2658.79	Sangat tinggi
7	K ₂ O potensial	ppm	474.87	Tinggi
8	Kation dapat tukar			
	K ⁺	cmol/kg	0.29	Rendah
	Na ⁺	cmol/kg	1.99	Sangat tinggi
	Ca ⁺⁺	cmol/kg	0.08	Sangat rendah
	Mg ⁺⁺	cmol/kg	0.06	Sangat rendah
9	Kapasitas tukar kation (KTK)	cmol/kg	51.59	Sangat tinggi
10	pH (H ₂ O)		6.55	Netral
11	Tekstur 3 fraksi			Tekstur
	Pasir	%	23.31	lempung
	Debu	%	75.98	berdebu
	Liat	%	0.71	(<i>silt loam</i>)

Keterangan:

- 1) Nilai sifat fisik dan kimia tanah (No. 1 s.d. 10) digolongkan berdasarkan Balai Penelitian Tanah tahun 2009.
- 2) Tekstur tanah (No. 11) ditentukan berdasarkan United States Departement of Agriculture (USDA) tahun 1979.

Struktur Komunitas Arkea

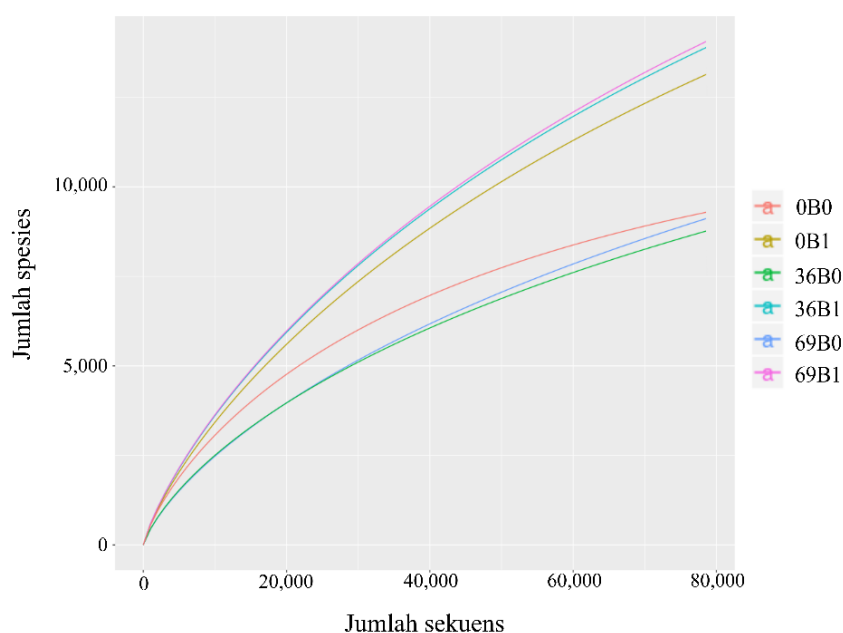
Keragaman Arkea pada Setiap Sampel (*Alpha Diversity*)

Total 2,577,911 sekuens arkea diperoleh dari 6 sampel tanah. Setelah penyaringan kualitas sekuens, sebanyak 1,996,532 *high-quality sequence* diperoleh untuk tahap pengklasifikasian OTU. Jumlah sekuens dan *alpha diversity* pada komunitas arkea ditunjukkan pada Tabel 9. Analisis *alpha diversity* menunjukkan bahwa perlakuan B1 memiliki keragaman arkea yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan B0 pada 0 hingga 69 HST. Indeks keragaman Shannon dan Simpson mengindikasikan bahwa arkea pada semua sampel memiliki keragaman tinggi yang masing-masing ditunjukkan dengan nilai $H' \geq 3.5$ dan D mendekati 1. Jumlah OTU pada B0 meningkat dari 0 hingga 69 HST, sedangkan pada B1 mengalami penurunan pada 36 HST dan meningkat pada 69 HST. *Alpha diversity* pada B0 secara umum mengalami penurunan, sedangkan pada B1 meningkat secara bertahap. Sementara itu, *rarefaction curve* menunjukkan bahwa setiap sampel hampir mencapai kejenuhan yang berarti bahwa komunitas arkea pada setiap sampel sangat beragam dan membutuhkan penambahan sampel untuk memperoleh kedalaman sampel yang tinggi (Gambar 5).

Tabel 9 Jumlah sekuens dan *alpha diversity* arkea dari 6 sampel tanah berdasarkan gen 16S rRNA

Sampel	Jumlah Sekuens			<i>Alpha diversity</i>			
	Total sekuens	<i>High-quality sequences</i>	Jumlah OTU	Jumlah spesies (S)	Shannon <i>diversity</i> (H')	Simpson <i>diversity</i> (D)	Shannon <i>Equitability</i> (E_H)
0B0	107,618	78,646	12,184	9,293	6.926	0.993	0.736
36B0	466,168	388,188	19,249	8,770	6.165	0.980	0.625
69B0	478,479	390,271	21,036	9,118	6.143	0.982	0.617
0B1	546,659	415,958	31,243	13,145	7.187	0.994	0.694
36B1	424,796	316,136	29,952	13,898	7.320	0.995	0.710
69B1	554,191	407,333	32,381	14,066	7.394	0.996	0.712

0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST



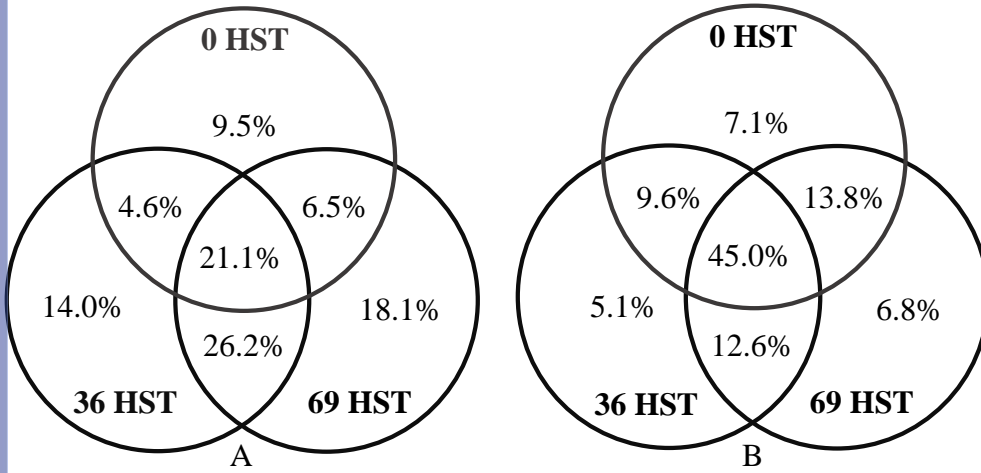
Gambar 5 *Rarefaction curve* sekuens arkea pada semua sampel berdasarkan gen 16S rRNA. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Suksesi Arkea Selama Masa Pertumbuhan Padi

OTU arkea yang teramati selama masa pertumbuhan padi ditampilkan dalam bentuk diagram Venn (Gambar 6). Diagram Venn menunjukkan suksesi atau perubahan komunitas arkea pada setiap perlakuan dari 0 hingga 69 HST. OTU yang spesifik pada waktu tertentu lebih banyak ditemukan pada perlakuan B0 daripada B1, yaitu masing-masing sebesar 9.5% dan 7.1% pada 0 HST, 14.0% dan 5.1% pada 36 HST, serta 18.1% dan 6.8% pada 69 HST. Pada perlakuan B0, persentase OTU spesifik yang paling tinggi terdapat pada 69 HST, yaitu sebesar 18.1%. OTU spesifik dengan persentase paling tinggi di perlakuan B1 terdapat pada 0 HST yang

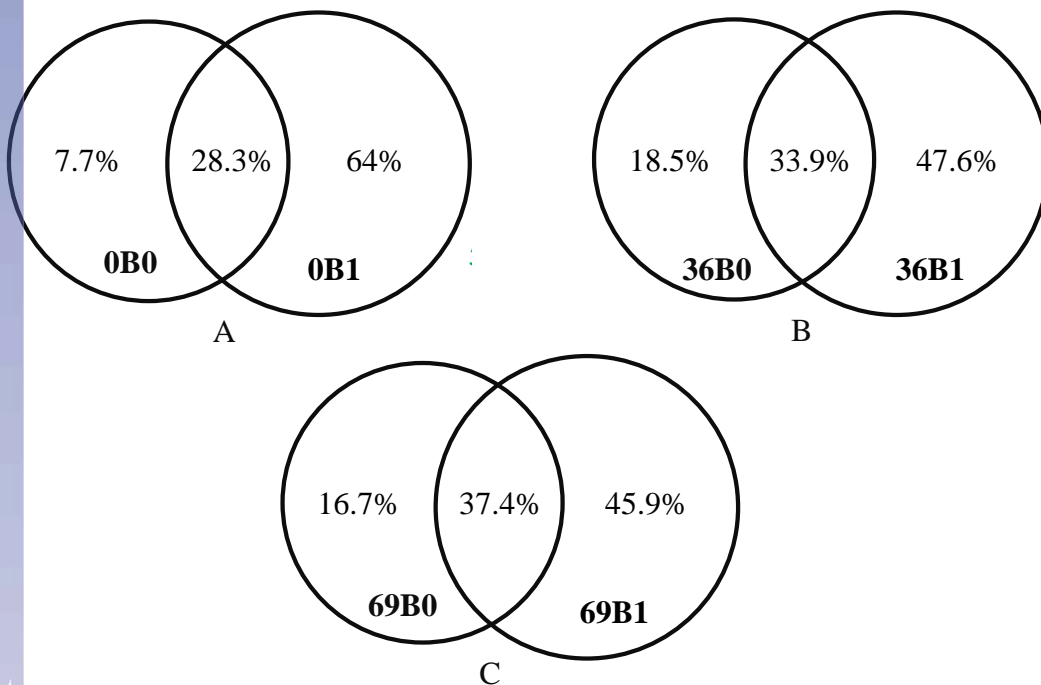
mencapai 7.1%. Sementara itu, OTU yang tetap ditemukan di semua waktu pengamatan memiliki persentase yang lebih tinggi pada B1 (45%) dibandingkan dengan B0 (21.1%).

@Hak cipta milik IPB University



Gambar 6 Diagram Venn keragaman arkea pada perlakuan B0 (A) dan B1 (B) selama masa pertumbuhan padi

Selama pertumbuhan padi, terdapat perbedaan OTU arkea antara B0 dan B1. OTU yang sama di antara dua perlakuan mengalami peningkatan dari 0, 36, hingga 69 HST yang berturut-turut mencapai 28.3, 33.9, dan 37.4% (Gambar 7A; B; C). Persentase OTU spesifik lebih tinggi pada B1 dibandingkan B0 pada semua umur tanaman yang diamati (Gambar 7).

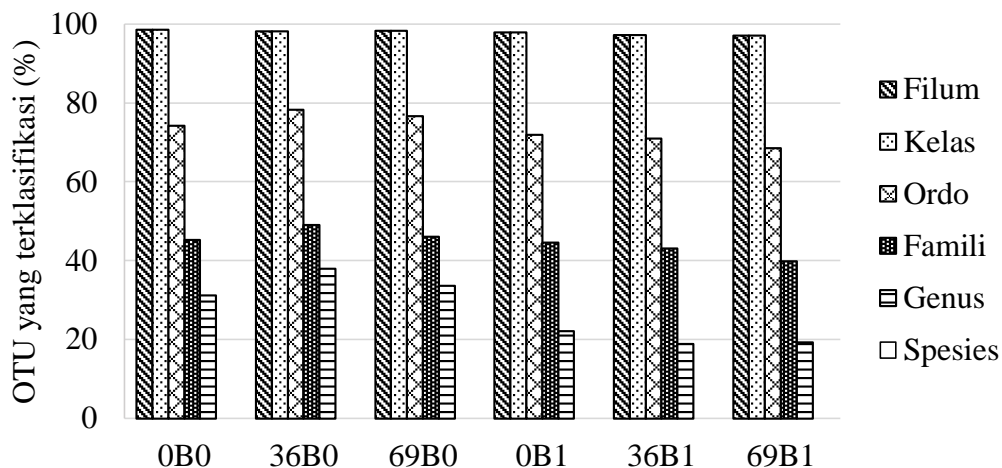


Gambar 7 Diagram Venn keragaman arkea antara dua perlakuan pada setiap umur tanaman, yaitu 0 HST (A), 36 HST (B), dan 69 HST (C). 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

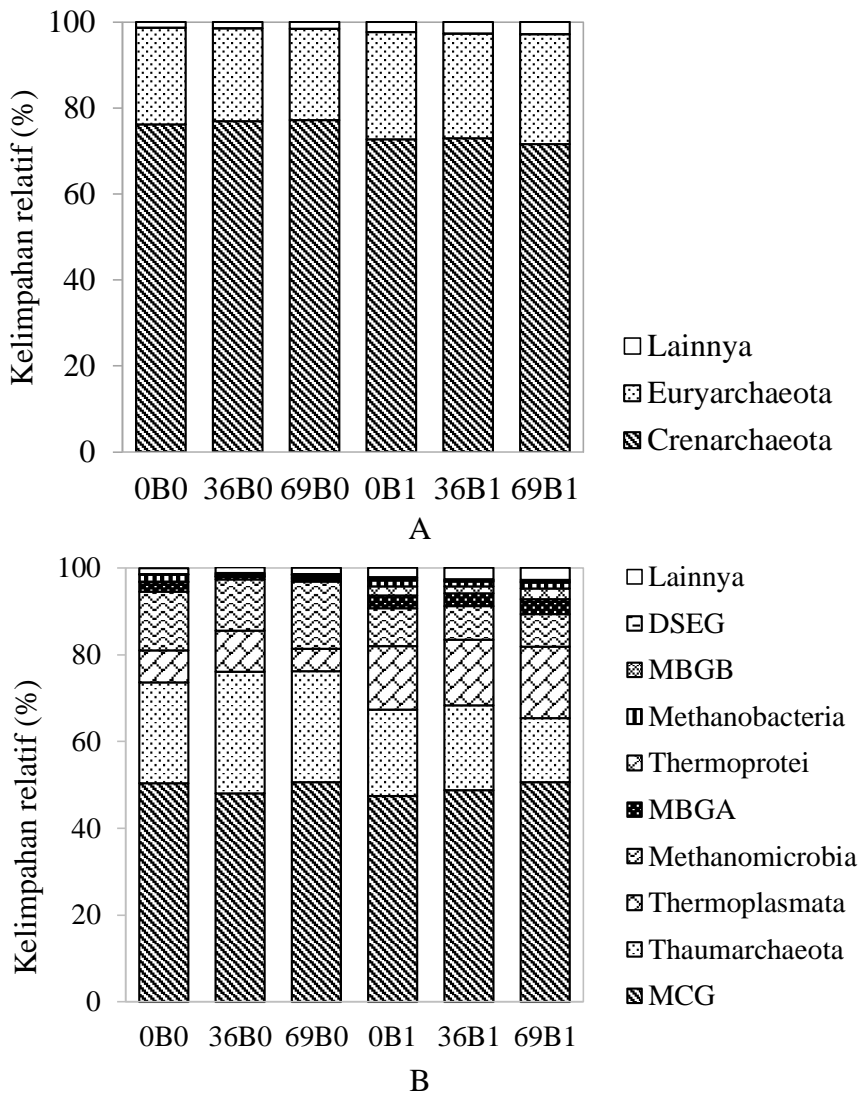
Komposisi Komunitas Arkea pada Setiap Sampel

OTU arkea yang terklasifikasi pada tingkat filum dan kelas menunjukkan persentase yang tinggi, yaitu 97-98.5%. Namun, OTU yang berhasil diklasifikasi pada tingkat ordo, famili, dan genus di setiap sampel mengalami penurunan yang berturut-turut mencapai 68.5-78.2%, 39.9-49%, dan 18.9-33.6% (Gambar 8; Lampiran 1).



Gambar 8 Persentase OTU arkea yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Kelimpahan relatif OTU arkea ditampilkan pada tingkat filum dan kelas (Gambar 9). Hasil klasifikasi menunjukkan bahwa Crenarchaeota (71.6-77.2%) merupakan filum yang paling dominan pada setiap sampel, kemudian diikuti oleh Euryarchaeota (21.2-25.6%) (Gambar 9A; Lampiran 2). Crenarchaeota berkisar antara 76.2-77.2% pada B0 dan 71.6-73% pada B1. Pada tingkat kelas, MCG (Miscellaneous Crenarchaeotic Group atau Bathyarchaeota) (47.4-50.6%) merupakan kelas paling dominan, yang diikuti oleh Thaumarchaeota (14.8-28.1%), Thermoplasmata (5.2-16.5%), Methanomicrobia (7.5-15.4%), MBGA (Marine Benthic Group A, 0.5-2.9%), Thermoprotei (0.1-2.4%), Methanobacteria (0.3-1.6%), MBGB (Marine Benthic Group B, 0.1-0.4%), dan DSEG (Deep Sea Euryarchaeotic Group, 0-0.3%) (Gambar 9B; Lampiran 3). Pada setiap perlakuan, komunitas arkea pada tingkat kelas mengalami perubahan minor selama periode penanaman padi.

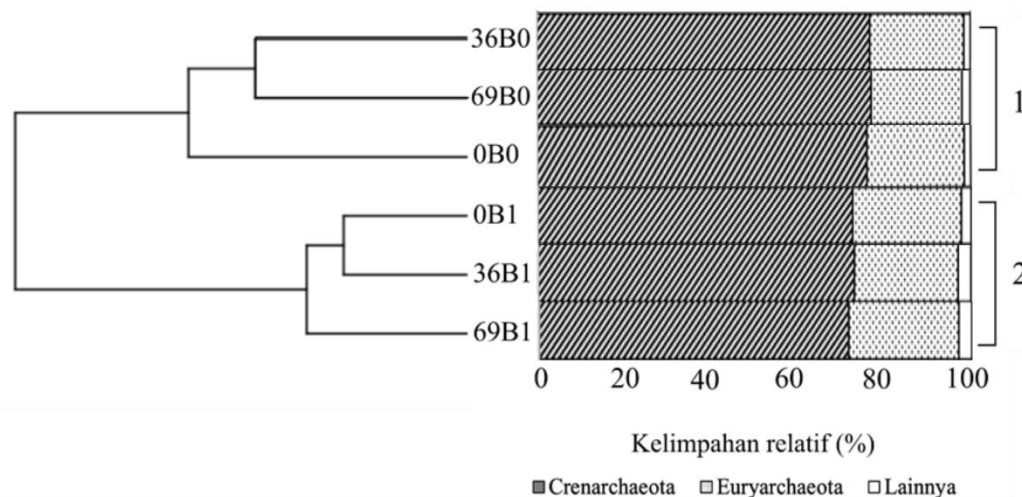


Gambar 9 Kelimpahan relatif arkea yang terdapat di setiap sampel tanah sawah pada tingkat filum (A) dan kelas (B) berdasarkan gen 16S rRNA. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Keragaman Arkea di antara Semua Sampel (*Beta Diversity*)

Komunitas arkea terbagi menjadi 2 kluster oleh perlakuan, yaitu B0 dan B1 (Gambar 10). Pada perlakuan B0, komunitas arkea pada 36 HST (36B0) memiliki kemiripan tinggi dengan komunitas arkea pada 69 HST (69B0). Pada perlakuan B1, komunitas arkea pada 0 HST (0B1) paling mirip dengan 36 HST (36B1).



Gambar 10 Analisis pengelompokkan komunitas arkea pada semua sampel berdasarkan metode UPGMA. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Struktur Komunitas Bakteri

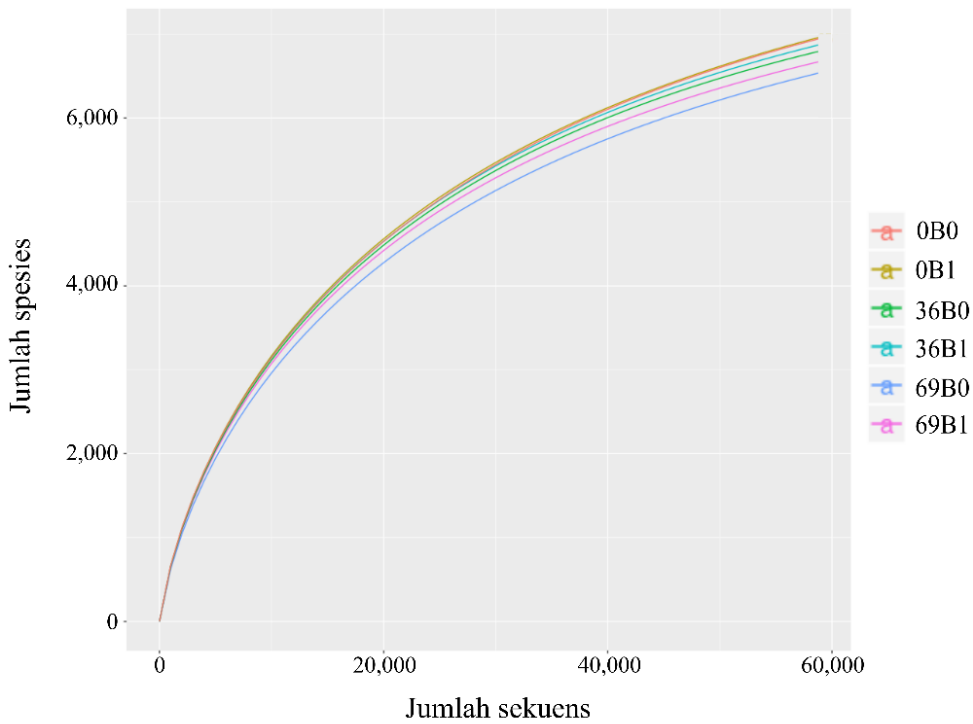
Keragaman Bakteri pada Setiap Sampel (*Alpha Diversity*)

Sebanyak total 3,074,783 sekuens bakteri diperoleh dari 6 sampel tanah. Setelah dilakukan penyaringan kualitas sekuens, diperoleh sebanyak 384,291 *high-quality sequences*. Jumlah sekuens dan *alpha diversity* pada setiap sampel ditampilkan pada Tabel 10. Berdasarkan jumlah spesies dan indeks keragaman Shannon, keragaman bakteri pada B1 sebelum perlakuan (0 HST) sedikit lebih rendah dibandingkan dengan B0. Selanjutnya, keragaman bakteri pada fase vegetatif (36 HST) dan fase generatif padi (69 HST) lebih tinggi pada B1 daripada B0. Keragaman bakteri pada dua perlakuan mengalami penurunan dari 0 hingga 69 HST. Indeks keragaman Shannon ($H' \geq 3.5$) dan Simpson (D mendekati 1) menandakan tingginya keragaman bakteri pada setiap sampel. Namun, indeks keragaman Simpson tidak menunjukkan perbedaan di antara semua sampel. Indeks Shannon *equitability* menggambarkan pemerataan jenis yang tinggi pada setiap sampel ($E_H > 0.6$). *Rarefaction curve* menunjukkan bahwa setiap sampel sudah mencapai kejenuhan, sehingga data sekuens bakteri yang diperoleh sudah cukup untuk menggambarkan keseluruhan komunitas bakteri pada setiap sampel (Gambar 11).

Tabel 10 Jumlah sekuens dan *alpha diversity* bakteri dari 6 sampel tanah berdasarkan gen 16S rRNA

Sampel	Jumlah Sekuens			<i>Alpha diversity</i>			
	Total sekuens	<i>High-quality sequences</i>	Jumlah OTU	Jumlah spesies (S)	Shannon <i>diversity</i> (H')	Simpson <i>diversity</i> (D)	Shannon <i>Equitability</i> (E _H)
0B0	600,111	73,264	8,997	6,944	7.530	0.998	0.827
36B0	487,255	64,466	8,393	6,794	7.457	0.998	0.825
69B0	490,903	65,850	8,364	6,536	7.289	0.997	0.807
0B1	510,743	60,955	8,851	6,960	7.517	0.998	0.827
36B1	498,281	60,864	8,582	6,871	7.484	0.998	0.826
69B1	487,490	58,892	8,255	6,670	7.432	0.998	0.824

0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

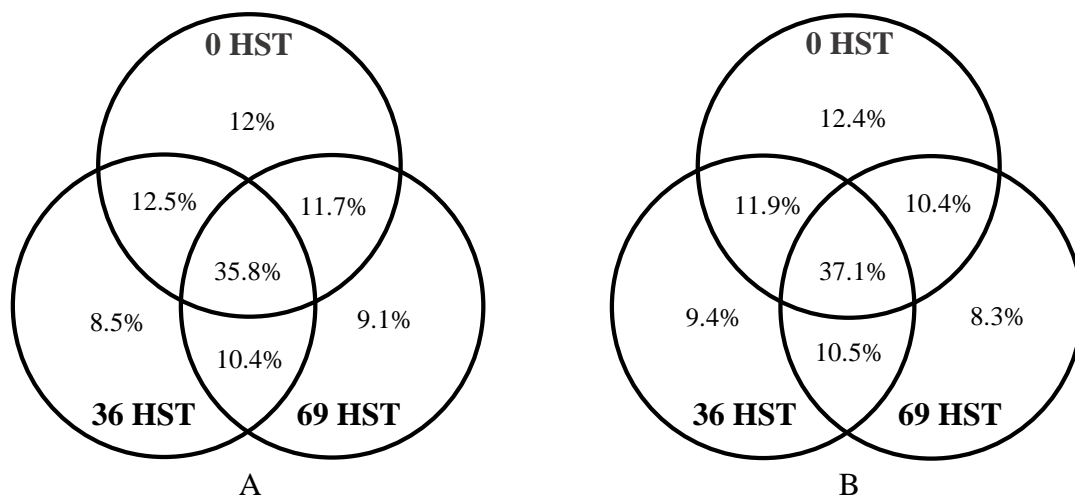


Gambar 11 *Rarefaction curve* sekuens bakteri pada semua sampel berdasarkan gen 16S rRNA. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Suksesi Bakteri Selama Masa Pertumbuhan Padi

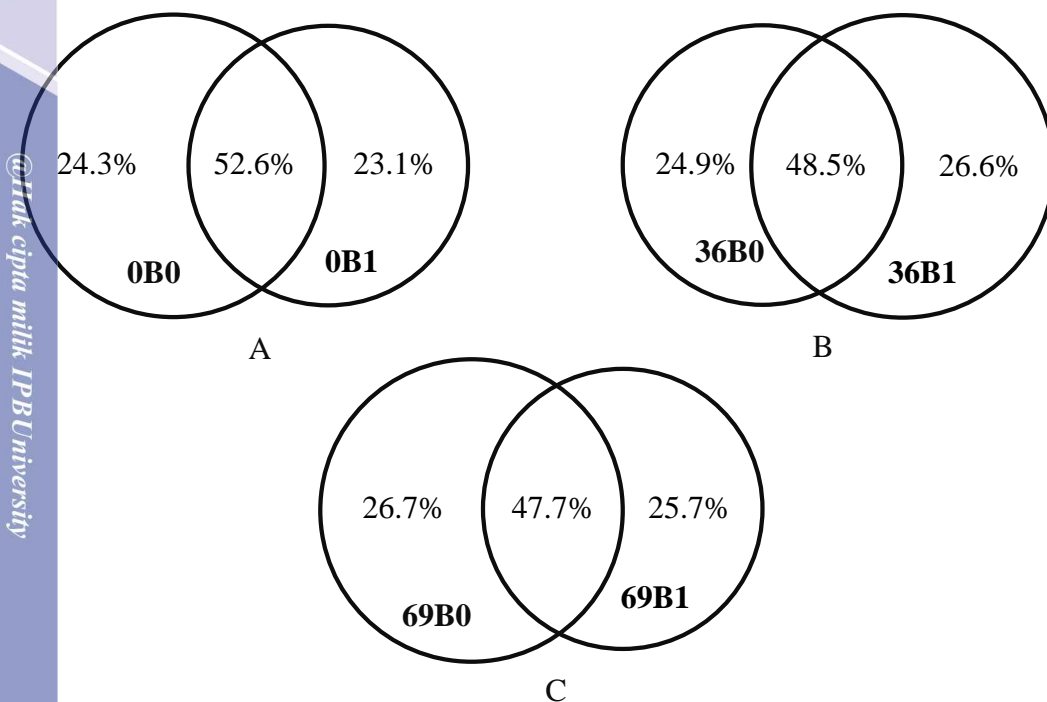
Diagram Venn menunjukkan suksesi komunitas bakteri selama masa pertumbuhan padi di setiap perlakuan (Gambar 12). Diagram tersebut menampilkan persentase OTU bakteri spesifik yang hanya ada pada suatu waktu tertentu (0, 36, atau 69 HST), dan OTU yang selalu ada selama selang waktu tertentu. Persentase

OTU spesifik yang tertinggi terdapat pada 0 HST, baik pada perlakuan B0 (12%) maupun B1 (12.4%). Persentase OTU spesifik mengalami penurunan dari 0 hingga 69 HST pada dua perlakuan tersebut. Pada perlakuan B0, bakteri yang selalu ada selama masa pertumbuhan padi mencapai 35.8% (Gambar 12A). Sementara itu, OTU pada B1 yang tetap muncul selama pertumbuhan padi adalah sebesar 37.1% dari total OTU yang terdeteksi (Gambar 12B).



Gambar 12 Diagram Venn keragaman bakteri pada perlakuan B0 (A) dan B1 (B) selama masa pertumbuhan padi

Selama pertumbuhan padi, terdapat perbedaan OTU antara B0 dan B1. OTU yang sama di antara dua perlakuan mengalami penurunan dari 0 hingga 69 HST yang berturut-turut mencapai 52.6, 48.5, dan 47.7% (Gambar 13). Sebelum aplikasi pupuk (0 HST), persentase OTU spesifik lebih tinggi pada B0 (24.3%) dibandingkan B1 (23.1%) (Gambar 13A). Pada fase vegetatif padi (36 HST), OTU spesifik lebih tinggi pada B1 (24.9%) daripada B0 (26.6%) (Gambar 13B). Pada fase generatif padi, OTU spesifik pada B0 (26.7%) lebih tinggi dibandingkan dengan B1 (25.7%) (Gambar 13C).

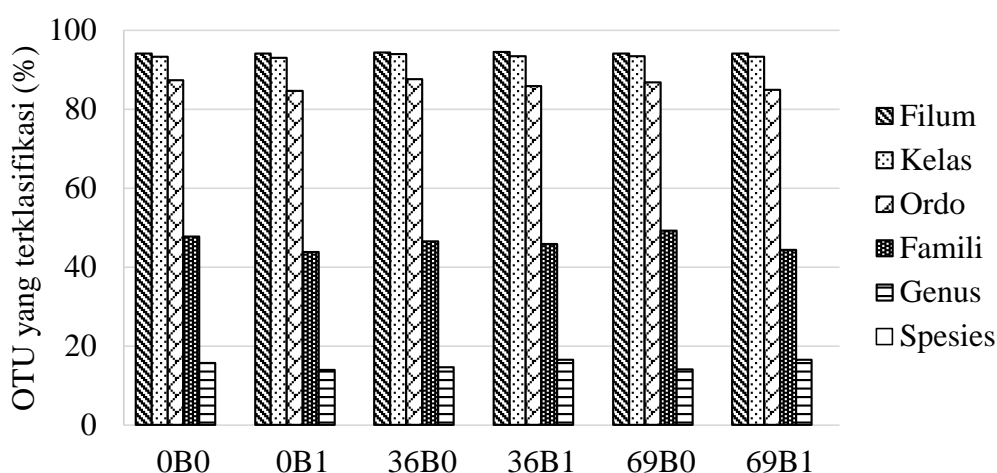


Gambar 13 Diagram Venn keragaman bakteri antara dua perlakuan pada setiap umur tanaman, yaitu 0 HST (A), 36 HST (B), dan 69 HST (C). 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Komposisi Komunitas Bakteri pada Setiap Sampel

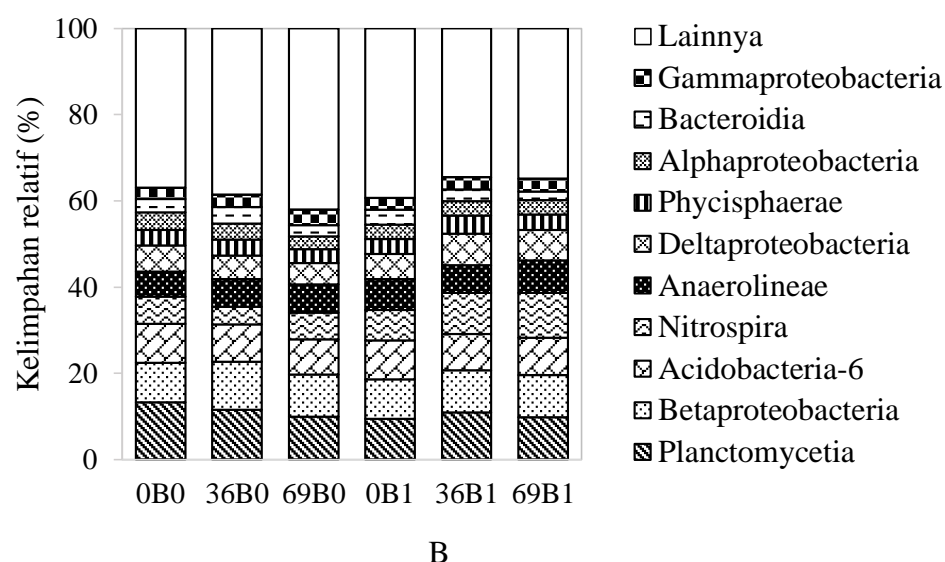
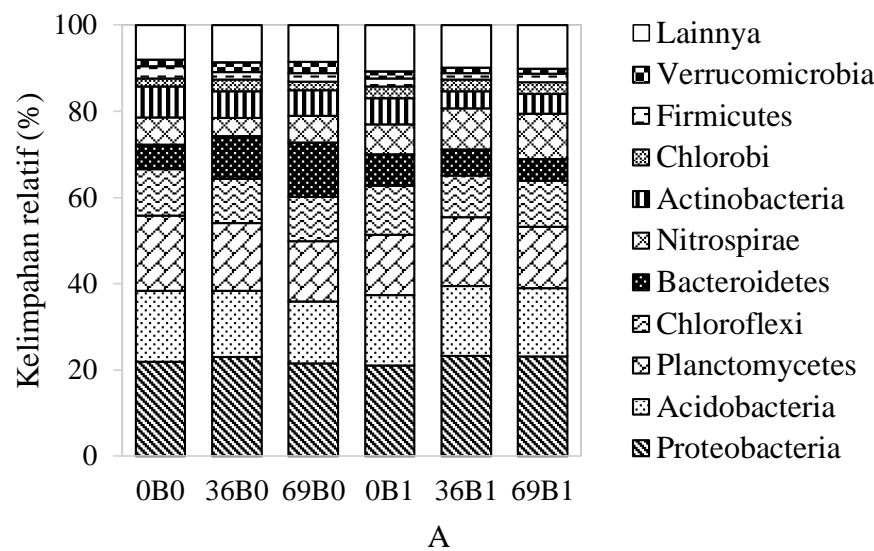
Klasifikasi OTU bakteri pada setiap sampel dilakukan pada beberapa tingkat taksonomi, yaitu filum, kelas, ordo, famili, dan genus (Gambar 14; Lampiran 4). Persentase OTU yang terklasifikasi mencapai 94.1-94.6% pada tingkat filum dan 93-94% pada tingkat kelas. Namun, persentase OTU yang terklasifikasi pada tingkat ordo, famili, dan genus mengalami penurunan, yaitu masing-masing mencapai 84.7-87.7%, 43.9-49.2%, dan 14-16.5%.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



Gambar 14 Persentase OTU bakteri yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Kelompok bakteri yang ditampilkan pada setiap perlakuan adalah 10 filum dominan dengan kelimpahan relatif >1% dan 10 kelas dominan dengan kelimpahan relatif >3% (Gambar 15). Hasil klasifikasi OTU pada tingkat filum menunjukkan bahwa Proteobacteria (21-23.3%) merupakan filum bakteri dominan di dua perlakuan selama masa pertumbuhan padi. Sekitar 85% dari total sekuens bakteri pada setiap sampel termasuk ke dalam filum Proteobacteria (21-23.3%), Acidobacteria (14.4-16.4%), Planctomycetes (13.9-17.5%), Chloroflexi (9.7-11.5%), Bacteroidetes (5-12.7%), Nitrospirae (4.2-10.5%), dan Actinobacteria (4.0-7.2%). Tiga filum dominan lain yaitu Chlorobi (1.8-2.8%), Firmicutes (1.5-2.9%), dan Verrucomicrobia (1.2-2.2%) (Gambar 15A; Lampiran 5). Pada tingkat kelas, hasil menunjukkan bahwa Planctomycetia (9.4-13.3%), Betaproteobacteria (9.2-11.1%), Acidobacteria-6 (8.4-9.1%), Nitrospira (4.2-10.5%), Anaerolineae (5.8-7.5%), Deltaproteobacteria (5-7.3%), Phycisphaerae (3.2-4.2%), Alphaproteobacteria (3-4%), Bacteroidia (2-3.9%), dan Gammaproteobacteria (2.6-3.6%) merupakan kelompok dominan di dua perlakuan tersebut (Gambar 15B; Lampiran 6).



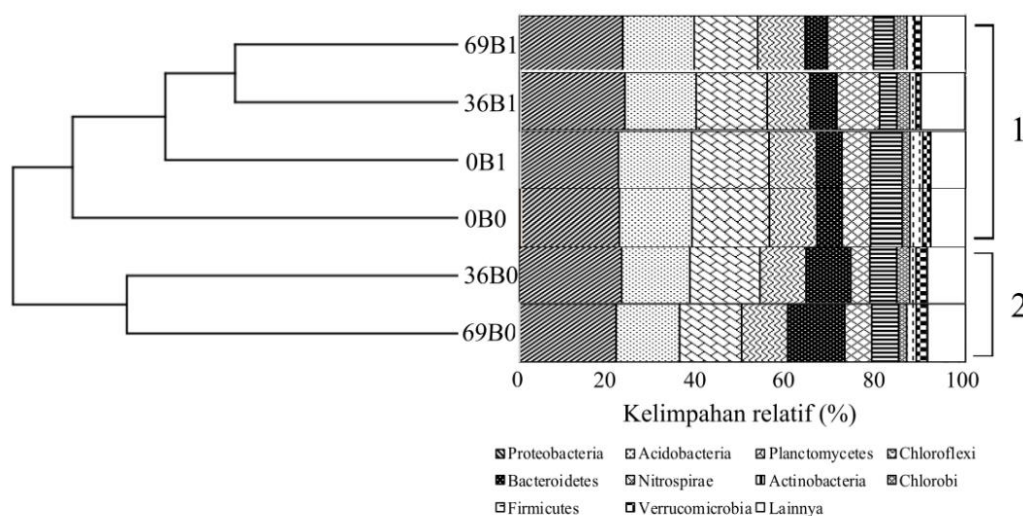
Gambar 15 Kelimpahan relatif bakteri yang terdapat di setiap sampel tanah sawah pada tingkat filum (A) dan kelas (B) berdasarkan gen 16S rRNA. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Keragaman Bakteri di antara Semua Sampel (Beta Diversity)

Komunitas bakteri dibandingkan antarsampel menggunakan analisis pengelompokan dengan metode UPGMA. Hasil analisis pengelompokkan disajikan dalam bentuk dendogram (Gambar 16). Berdasarkan kemiripannya, komunitas bakteri terbagi menjadi 2 klaster menurut perlakuan, antara lain klaster 1 (36B0 dan 69B0) dan klaster 2 (0B0, 0B1, 36B1, dan 69B1) (Gambar 16). Pada perlakuan B0, komunitas bakteri pada fase vegetatif (36B0) memiliki kemiripan yang tinggi dengan fase generatif padi (69B0), begitu pula pada B1. Hal tersebut menunjukkan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

bahwa komunitas bakteri pada fase vegetatif (36 HST) lebih mirip dengan fase generatif padi (69 HST) dibandingkan dengan komunitas bakteri sebelum aplikasi urea dengan pupuk hayati (0 HST).



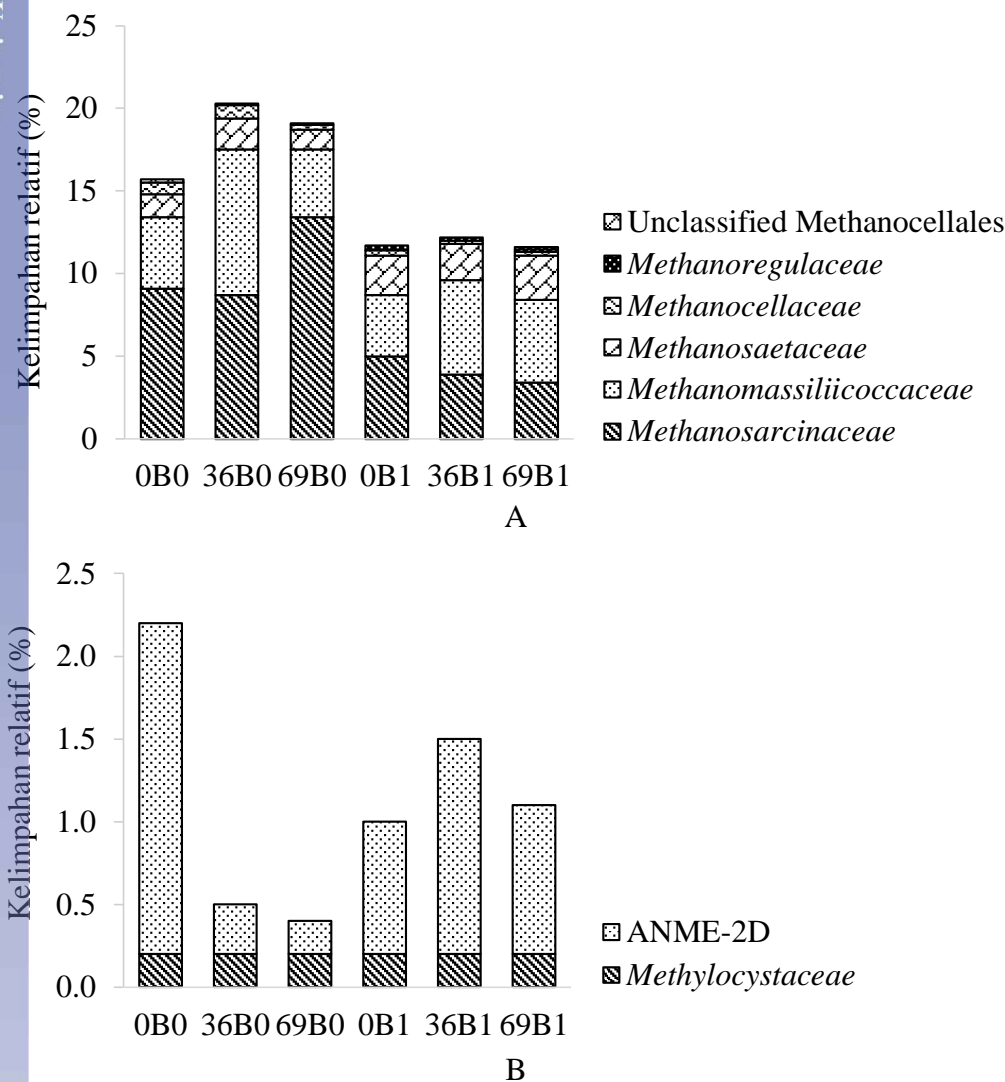
Gambar 16 Analisis pengelompokan komunitas bakteri pada semua sampel berdasarkan metode UPGMA. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

Struktur Komunitas Metanogen dan Metanotrof

Komposisi Komunitas Metanogen dan Metanotrof Berdasarkan Gen 16S rRNA

Komunitas metanogen dan metanotrof beragam pada setiap sampel (Gambar 17). Metanogen merupakan anggota filum Euryarchaeota yang termasuk arkea. Pada penelitian ini, metanogen yang teramati merupakan famili-famili yang termasuk kelas Methanomicrobia dan famili *Methanomassiliicoccaceae* dari kelas Thermoplasmata (Gambar 17A; Lampiran 7). Kelimpahan relatif metanogen pada B0 (15.7-20.3%) lebih tinggi daripada B1 (11.7-12.6%) sejak 0 hingga 69 HST. Hasil menunjukkan terdapat perbedaan pola peningkatan kelimpahan relatif metanogen antara perlakuan B0 dan B1. Kelimpahan relatif metanogen dari 0 hingga 36 HST mengalami peningkatan yang lebih tinggi di perlakuan B0 dibandingkan perlakuan B1. Metanogen paling melimpah pada fase vegetatif padi di semua perlakuan. Pada perlakuan B0, *Methanosarcinaceae* mendominasi metanogen pada 0, 36, dan 69 HST (9.1, 8.7, dan 13.4%). Selain itu, *Methanomassiliicoccaceae* juga mendominasi pada 36 HST (8.8%). Sementara itu, *Methanosarcinaceae* di perlakuan B1 hanya mendominasi pada 0 HST (5%), sedangkan *Methanomassiliicoccaceae* mendominasi pada 36 dan 69 HST (5.7% dan 5%). Unclassified Methanocellales dan *Methanoregulaceae* masing-masing hanya terdeteksi pada perlakuan B0 dan B1 selama umur tanaman yang diamati.

Komunitas metanotrof tersebar pada arkea (famili ANME yang termasuk kelas Methanomicrobia) dan bakteri (filum Proteobacteria, Verrucomicrobia, dan NC10). Metanotrof yang berhasil diidentifikasi pada penelitian ini terdiri atas ANME-2D dan famili Methylocystaceae (filum Proteobacteria) (Gambar 17B; Lampiran 8). Namun, kelompok bakteri metanotrof yang termasuk ke dalam Verrucomicrobia dan NC10 tidak berhasil dideteksi, sehingga tidak dapat diperhitungkan dalam kelimpahan relatif metanotrof. Bakteri *Methylocystaceae* berada pada kelimpahan relatif yang sama di semua sampel (0.2%). Sementara itu, ANME-2D pada perlakuan B0 memiliki kelimpahan relatif yang paling tinggi pada 0 HST (2%) dibandingkan pada 36 dan 69 HST (0.3% dan 0.2%). ANME-2D pada perlakuan B1 memiliki kelimpahan relatif paling tinggi pada 36 HST (1.3%) daripada 0 dan 69 HST (0.8% dan 0.9%).



Gambar 17 Struktur komunitas metanogen (A) dan metanotrof (B) pada setiap sampel berdasarkan gen 16S rRNA. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Rasio Metanogen:Metanotof Berdasarkan Gen 16S rRNA dan Hubungannya dengan Laju Emisi CH₄

Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan rasio metanogen:metanotrof antara perlakuan B0 dan B1 pada 0 hingga 69 HST (Tabel 11). Rasio metanogen:metanotrof lebih tinggi pada B0 daripada B1 selama fase pertumbuhan padi. Hal ini sejalan dengan laju emisi CH₄ pada B0 yang lebih tinggi daripada B1, baik di fase vegetatif maupun generatif padi (Fatma 2019). Selain itu, rasio metanogen:metanotrof lebih tinggi pada fase vegetatif daripada fase generatif padi, baik di B0 maupun B1. Laju emisi CH₄ menunjukkan pola yang sama, dimana laju emisi CH₄ lebih tinggi pada fase vegetatif padi di setiap perlakuan. Berdasarkan hasil tersebut, rasio metanogen:metanotrof berkorelasi positif dengan laju emisi CH₄ ($r = 0.843$; $P = 0.157$).

Tabel 11 Kelimpahan relatif metanogen dan metanotrof, rasio metanogen:metanotrof, serta laju emisi CH₄ dari lahan sawah

Parameter	0B0	0B1	36B0	36B1	69B0	69B1
Metanogen (%)	17.3	11.7	18.8	12.6	17.9	11.8
Metanotrof (%)	2.2	1.0	0.5	1.5	0.4	1.1
Rasio metanogen:metanotrof	7.9	11.7	37.6	8.4	44.8	10.7
Laju emisi CH ₄ (mg CH ₄ m ⁻² hari ⁻¹) ^a	td	td	6.11	-4.11	1.32	-4.19

^a Data diperoleh dari Fatma (2019). td: tidak diukur. 0B0: pupuk urea 100% pada 0 HST, 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 69B0: pupuk urea 100% pada 69 HST, 0B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 0 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST, 69B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 69 HST

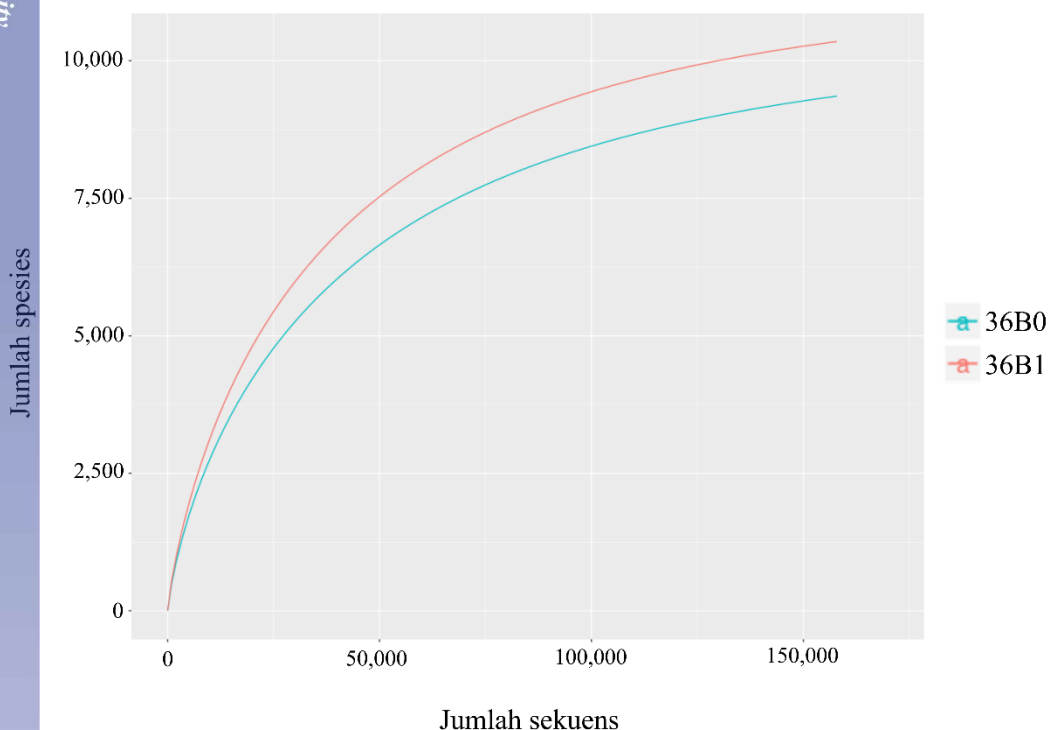
Keragaman Metanogen dan Metanotrof Berdasarkan Gen Fungsional

Komunitas metanogen dan metanotrof masing-masing hanya dideteksi pada fase vegetatif padi (36 HST) dengan menggunakan gen *mcrA* dan *pmoA* (Tabel 12). Berdasarkan hasil sekuensing, sebanyak total 348,056 sekuens gen *mcrA* dan 865,542 sekuens gen *pmoA* berhasil diperoleh. Setelah penyaringan kualitas sekuens, sebanyak 67,738 dan 319,383 *high-quality sequences* masing-masing diperoleh pada sekuens gen *mcrA* dan *pmoA*. Hasil pengelompokan OTU menunjukkan bahwa jumlah OTU dan jumlah spesies metanotrof lebih banyak daripada metanogen, baik pada perlakuan B0 maupun B1. Indeks Shannon dan Simpson menunjukkan bahwa komunitas metanogen dan metanotrof pada setiap sampel memiliki keragaman yang tinggi ($H' \geq 3.5$ dan D mendekati 1). Indeks kemerataan jenis memiliki nilai lebih dari 0.6 yang berarti bahwa setiap OTU tersebar merata pada setiap spesies metanogen ataupun metanotrof. Metanogen lebih beragam pada perlakuan B0 daripada B1. Sebaliknya, metanotrof lebih beragam pada perlakuan B1 dibandingkan dengan B0, yaitu terdapat tambahan sebanyak 991 spesies. Adapun *rarefaction curve* menunjukkan bahwa data yang diperoleh sudah cukup untuk menggambarkan keseluruhan komunitas metanogen (Gambar 18) dan metanotrof (Gambar 19) pada setiap sampel.

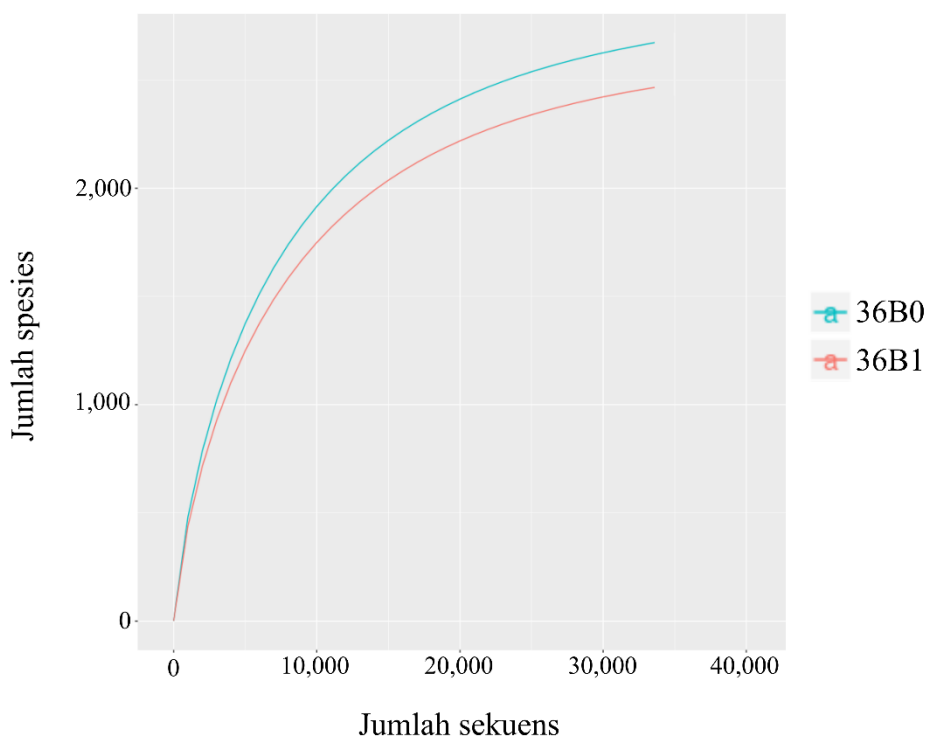
Tabel 12 Jumlah sekuens dan *alpha diversity* kelompok metanogen dan metanotrof pada 36B0 dan 36B1

Sampel	Jumlah Sekuens			<i>Alpha diversity</i>			
	Total sekuens	<i>High-quality Sequences</i>	Jumlah OTU	Jumlah spesies (S)	Shannon diversity (H')	Simpson diversity (D)	Shannon Equitability (E _H)
Gen <i>mcrA</i>							
36B0	169,516	33,681	2,692	2,674	6.309	0.992	0.798
36B1	178,540	34,057	2,962	2,467	5.812	0.973	0.727
Gen <i>pmoA</i>							
36B0	396,644	161,942	11,417	9,359	6.667	0.990	0.713
36B1	468,898	157,896	10,521	10,350	7.028	0.993	0.759

36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST

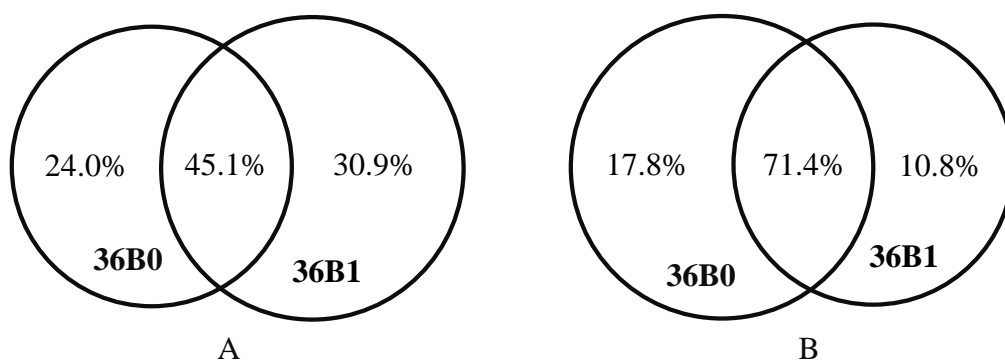


Gambar 18 *Rarefaction curve* sekuens *mcrA* pada sampel 36B0 dan 36B1. 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST



Gambar 19 Rarefaction curve sekuens *pmoA* pada sampel 36B0 dan 36B1. 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST

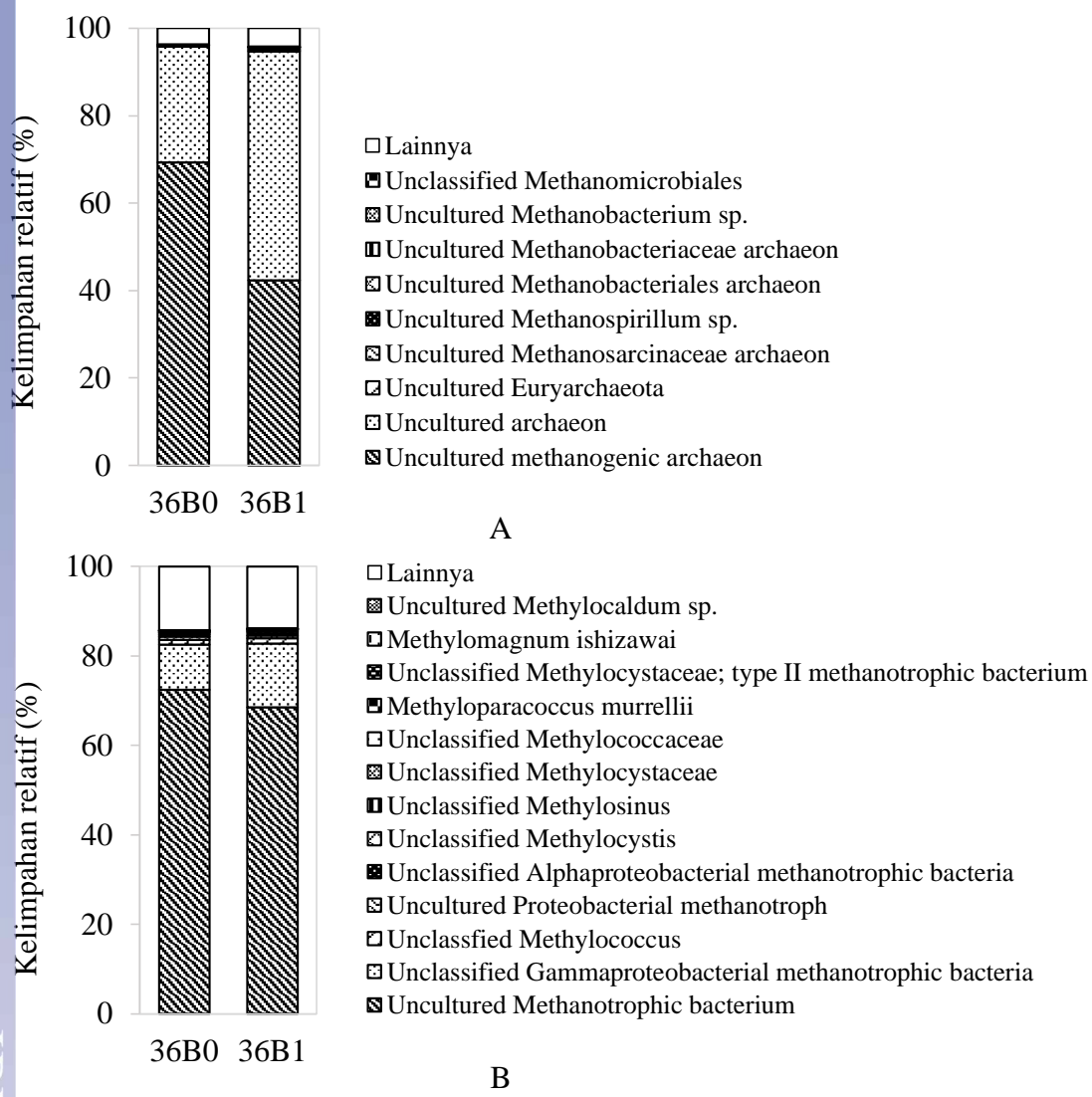
Diagram Venn menunjukkan persentase OTU metanogen dan metanotrof yang spesifik pada perlakuan tertentu dan OTU yang sama antarperlakuan pada fase vegetatif padi (36 HT) (Gambar 20). Hasil menunjukkan bahwa OTU metanogen yang spesifik lebih tinggi pada perlakuan B1 (24.0%) daripada B0 (30.9%) dan sebanyak 45.1% OTU merupakan OTU yang sama pada dua perlakuan (Gambar 20A). Hasil sebaliknya teramati pada komunitas metanotrof. OTU metanotrof yang spesifik lebih tinggi pada B0 (17.8%) dibandingkan B1 (10.8%). Sementara itu, OTU metanotrof yang sama di antara dua perlakuan mencapai 71.4% (Gambar 20B).



Gambar 20 Diagram Venn keragaman metanogen berdasarkan gen *mcrA* (A) dan keragaman metanotrof berdasarkan gen *pmoA* (B) pada 36 HST 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST

Komposisi Komunitas Metanogen dan Metanotrof Berdasarkan Gen Fungsional

Komunitas metanogen dan metanotrof masing-masing diidentifikasi dengan menggunakan gen *mcrA* dan *pmoA* berdasarkan NCBI database (Gambar 21). Komunitas metanogen pada perlakuan B0 didominasi oleh Uncultured methanogenic archaeon (69.3%), sedangkan komunitas metanogen pada B1 didominasi oleh Uncultured archaeaon (52.4%) (Gambar 21A; Lampiran 9). Ordo metanogen yang berhasil dideteksi, antara lain Methanobacteriales, Methanomicrobiales, dan Methanosarcinales. Hasil klasifikasi metanotrof menunjukkan bahwa perlakuan B0 dan B1 didominasi oleh Uncultured Methanotrophic bacterium dengan kelimpahan relatif masing-masing 72.4% dan 68.5% (Gambar 21B; Lampiran 10). Adapun ordo metanotrof yang berhasil dideteksi yaitu ordo Methylococcales, misalnya *Methylococcus*, *Methyloparacoccus*, *Methylomagnum*, dan *Methylocaldum*, serta ordo Rhizobiales, di antaranya *Methylocystis* dan *Methylosinus*.



Gambar 21 Struktur komunitas metanogen (A) dan metanotrof (B) pada sampel 36B0 dan 36B1 berdasarkan gen fungsional. 36B0: pupuk urea 100% pada 36 HST, 36B1: pupuk urea 50% dengan pupuk hayati pada 36 HST

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

PEMBAHASAN

Struktur Komunitas Arkea

Analisis struktur komunitas mikrob selama pertumbuhan padi dilakukan pada tanah sawah bertekstur lempung berdebu dengan kandungan karbon organik sebesar 3.30% dan pH 6.55 (Tabel 8). Komunitas arkea pada perlakuan pupuk urea 100% (B0) dan pupuk urea 50% dengan pupuk hayati (B1) diamati pada 0, 36, dan 69 HST. *Rarefaction curve* menunjukkan bahwa sampel B0 perlu ditambah jumlah sekuensnya agar lebih menggambarkan keseluruhan spesies arkea di tanah sawah tersebut (Gambar 5). Analisis *alpha diversity* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pola keragaman arkea sebelum aplikasi pupuk sampai fase generatif padi (Tabel 9). Pada perlakuan B0, keragaman arkea mengalami penurunan yang diduga karena penurunan eksudat akar. Selain itu, beberapa populasi arkea pada perlakuan B0 diduga tidak beradaptasi dengan baik pada fase generatif padi, dimana mengalami penurunan ketinggian air. Sebaliknya, komunitas arkea pada B1 lebih beragam daripada B0, dan keragamannya mengalami peningkatan secara bertahap selama masa pertumbuhan padi (Tabel 9). Spesies arkea yang lebih beragam pada perlakuan B1 diduga karena terdapat asupan substrat yang beragam dari rizodeposisi tanaman padi. Aulakh *et al.* (2001a) melaporkan bahwa komunitas mikrob di rizosfer dipengaruhi oleh eksudat akar sejak fase pertumbuhan awal hingga mencapai jumlah maksimum pada fase inisiasi malai, kemudian menurun dari fase pembungaan hingga pematangan padi. Eksudat akar pada tingkat yang tinggi diduga mampu mendukung tingginya keragaman mikrob (Aulakh *et al.* 2001b; Jackson dan Illamaguru 2014). Selain itu, komunitas arkea pada B1 diduga memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap perubahan kondisi lingkungan di tanah sawah, seperti penggenangan dan pengeringan.

Suksesi atau perubahan komunitas arkea terjadi selama pertumbuhan padi, baik pada perlakuan B0 maupun B1 (Gambar 6). Hasil analisis diagram Venn menunjukkan bahwa populasi arkea yang selalu ada sejak 0 hingga 69 HST memiliki persentase yang lebih tinggi di perlakuan B1 (45%) dibandingkan B0 (21.1%). Hal tersebut mengindikasikan bahwa komunitas arkea di B1 mampu beradaptasi pada fluktuasi perubahan lingkungan selama periode pertumbuhan padi. Beberapa laporan sebelumnya menyebutkan bahwa komunitas arkea relatif bersifat stabil dan resisten terhadap perubahan lingkungan, seperti pengeringan (Itoh *et al.* 2013; Breidenbach dan Conrad 2015). OTU spesifik menunjukkan persentase yang lebih tinggi pada perlakuan B1 dibandingkan B0, baik pada 0, 36, maupun 69 HST (Gambar 7). Hasil ini mengindikasikan bahwa perlakuan B1 diduga mendukung pertumbuhan OTU tertentu yang tidak ditemukan pada B0. Salah satu hal yang mungkin menjelaskan hal tersebut adalah adanya perbedaan eksudasi akar padi antara B0 dengan B1. Inokulasi bakteri metanotrof sebagai pupuk hayati diduga dapat menstimulasi pertumbuhan akar dan eksudasi akar yang berdampak pada struktur komunitas mikrob tanah. Berdasarkan penelitian sebelumnya, tanaman padi pada perlakuan B1 menunjukkan pertumbuhan yang lebih tinggi secara signifikan daripada B0 ($P < 0.05$). Parameter tinggi tanaman, panjang akar, bobot basah akar, bobot basah tajuk, bobot kering akar, dan bobot kering tajuk pada B1 masing-masing mengalami peningkatan sebesar 3.29, 11.35, 29.12, 16.19,

43.54, dan 31.48 % dibandingkan dengan B0 (Fatma 2019). Pertumbuhan tanaman yang lebih tinggi pada B1 tersebut diduga menyebabkan peningkatan jumlah dan komposisi eksudasi akar yang mendukung pertumbuhan mikroba tertentu. Menurut Trabelsi dan Mhamdi (2013), hal tersebut merupakan dampak tidak langsung dari inokulasi mikroba terhadap struktur komunitas mikroba di daerah perakaran tanaman.

Berdasarkan hasil analisis OTU, OTU dapat terklasifikasi dengan baik pada tingkat filum dan kelas, tetapi jumlah OTU yang terklasifikasi menurun pada tingkat ordo, famili, dan genus (Gambar 8). Hasil tersebut menunjukkan bahwa komunitas arkea di tanah sawah memiliki keragaman yang tinggi dan belum banyak teridentifikasi. Filum *Crenarchaeota* merupakan filum yang paling umum ditemukan pada dua perlakuan selama masa pertumbuhan padi (Gambar 9A; Lampiran 2), sebagaimana pada tanah sawah dengan kedalaman 0-15 cm di Korea Selatan yang dilaporkan oleh Ahn *et al.* (2012). Berbeda dengan hasil penelitian ini, beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Euryarchaeota* adalah filum dominan di tanah sawah, baik pada kondisi tanah yang tergenang maupun kering (Itoh *et al.* 2013; Lee *et al.* 2014; Vaksmaa *et al.* 2017). Hasil analisis pengelompokan menunjukkan bahwa komunitas arkea terbagi atas 2 kelompok sesuai dengan perlakuannya, yaitu B0 dan B1 (Gambar 10). Pada masing-masing perlakuan, komunitas arkea berbeda antara fase vegetatif dengan generatif padi. Hal ini mengindikasikan bahwa meskipun dominansi kelompok arkea antara dua perlakuan tersebut tidak berbeda, tetapi struktur komunitasnya memiliki perbedaan. Perubahan populasi arkea diduga karena adanya perubahan ketersediaan nutrisi dan faktor lingkungan selama pertumbuhan padi.

Struktur komunitas arkea selanjutnya diamati pada tingkat kelas. Hasil yang ditampilkan adalah 10 kelas yang paling melimpah pada setiap sampel (Gambar 9B). Kelas dominan yang termasuk filum *Crenarchaeota*, antara lain MCG, *Thaumarchaeota*, *Thermoprotei*, MBGA, dan MBGB. MCG (*Bathyarchaeota*) ditemukan paling banyak pada tanah sawah di dua perlakuan sejak 0 hingga 69 HST dengan kelimpahan relatif sebesar 47.4% hingga 50.6%. Hal ini sesuai dengan studi sebelumnya yang dilakukan oleh Breidenbach dan Conrad (2015). MCG banyak terdapat di lapisan atas tanah sawah (*topsoil layer*) pada kedalaman 0-5 cm (Vaksmaa *et al.* 2017). Studi lain menyebutkan bahwa kelompok ini ditemukan dengan kelimpahan relatif mencapai ~9% pada lapisan atas (0-5 cm), namun jumlahnya bisa mencapai 42% pada lapisan tanah sawah yang lebih dalam (*subsoil layer*) (5-60 cm) (Bai *et al.* 2017). MCG diduga merupakan arkea heterotrof anaerob yang memiliki aktivitas metabolik berupa dekomposisi senyawa organik kompleks, antara lain protein dan senyawa aromatik (Lloyd *et al.* 2013). Potensi MCG dalam mengoksidasi CH₄ perlu diinvestigasi lanjut (Evans *et al.* 2015). *Thaumarchaeota* memiliki kelimpahan relatif tertinggi kedua pada semua sampel, yaitu sebesar 14.8-28.1%. *Thaumarchaeota* lebih melimpah pada perlakuan B0 (23.2-28.1%) dibandingkan dengan B1 (14.8-19.9%) (Gambar 9B; Lampiran 3). Kelimpahan arkea pengoksidasi amonia (ammonia-oxidizing archaea [AOA]) ditentukan oleh pH tanah, dimana AOA akan mendominasi bakteri pengoksidasi amonia (ammonia-oxidizing bacteria [AOB]) pada tanah asam (Nicol *et al.* 2008). Nicol *et al.* (2003) melaporkan bahwa *Thaumarchaeota* banyak ditemukan pada tanah yang terdrainasi sebagai pengoksidasi amonia dan diduga berkontribusi dalam kehilangan nitrogen melalui emisi N₂O. *Thermoprotei* banyak terdistribusi pada berbagai ekosistem, antara lain ekosistem air laut dan air tawar, serta memiliki

kemampuan dalam mendegradasi hidrokarbon (Gründger *et al.* 2015). Sementara itu, MBGA dan MBGB sebagaimana MCG dan *Thaumarchaeota* telah dilaporkan sebagai kelompok dominan di lingkungan *subsurface*, seperti sedimen di Laut Cina Selatan (Wang *et al.* 2013). MBGB telah diusulkan sebagai mikroba heterotrof yang memanfaatkan senyawa organik pada lingkungan anaerob (Biddle *et al.* 2006).

Hasil analisis juga menunjukkan beberapa kelas dominan yang termasuk filum *Euryarchaeota*, di antaranya kelas *Thermoplasmata*, *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, dan DSEG (Gambar 9B). *Thermoplasmata* dan *Methanomicrobia* juga dilaporkan sebagai kelas yang dominan oleh Ahn *et al.* (2012). *Thermoplasmata* terlibat dalam proses degradasi senyawa organik kompleks, seperti ordo *Thermoplasmatales* (Fan dan Xing 2016), dan berperan dalam emisi CH₄, misalnya ordo *Methanomassiliicoccales* (Borrel *et al.* 2013). Adapun *Methanomicrobia* dan *Methanobacteria* telah diketahui sebagai kelompok metanogen (Liu dan Whitman 2008; Nazaries *et al.* 2013). Peran arkea di lingkungan masih perlu dikaji lebih lanjut, karena sampai saat ini eksplorasi fungsi arkea masih mengandalkan metagenomik dan metatranskriptomik.

Struktur Komunitas Bakteri

Analisis sekuensing dengan NGS mampu menggambarkan keseluruhan spesies bakteri yang ada pada setiap sampel (Gambar 11). Sebelum aplikasi pupuk (0 HST), keragaman bakteri relatif sama di antara perlakuan B0 dan B1, kemudian mengalami sedikit penurunan pada setiap perlakuan selama fase vegetatif dan generatif padi (Tabel 10). Penurunan keragaman bakteri dari fase vegetatif ke generatif padi juga diamati pada penelitian sebelumnya (Pittol *et al.* 2017; Edwards *et al.* 2018). Hal tersebut diduga karena penurunan eksudat akar dan ketersediaan nutrisi. Meskipun dua perlakuan tersebut mengalami penurunan keragaman bakteri seiring umur tanaman, keragaman bakteri lebih tinggi pada perlakuan B1 dibandingkan B0 (Tabel 10). Lebih rendahnya keragaman bakteri pada B0 diduga karena penggunaan pupuk urea dengan dosis yang lebih tinggi dibandingkan pada B1. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa aplikasi pupuk nitrogen berdampak pada penurunan keragaman bakteri tanah (Zhou *et al.* 2017; Yang *et al.* 2019). Aplikasi bakteri metanotrof sebagai pupuk hayati diduga bisa menstimulasi pertumbuhan jenis bakteri tertentu.

Diagram Venn menunjukkan perubahan populasi bakteri selama masa pertumbuhan padi di setiap perlakuan (Gambar 12). Persentase OTU yang selalu ada selama periode tersebut sedikit lebih tinggi pada B1 (37.1%) daripada B0 (35.8%) (Gambar 12). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa aplikasi urea 50% dengan pupuk hayati (B1) menyebabkan perubahan minor pada keragaman bakteri di tanah sawah. Perlakuan tersebut diduga menyediakan lingkungan yang sesuai bagi pertumbuhan OTU tertentu, sehingga mendukung keberadaannya dari 0 hingga 69 HST. Inokulasi bakteri metanotrof diduga menginduksi pertumbuhan bakteri tertentu di tanah sawah, artinya bahwa ada interaksi antara bakteri inokulan dengan mikroba indigenus dan tanaman yang memicu perubahan populasi bakteri tanah. Hal ini juga didukung oleh persentase OTU spesifik pada 36 HST yang lebih tinggi pada perlakuan B1 (9.4%) dibandingkan B0 (8.5%).



Perbedaan persentase OTU antara dua perlakuan juga diamati pada setiap umur tanaman (Gambar 13). Perbedaan OTU antara B0 dan B1 diduga terjadi karena adanya perbedaan aplikasi pupuk. Persentase OTU spesifik pada 0 dan 69 HST ditemukan lebih tinggi di perlakuan B0 dibandingkan B1 (Gambar 13A; C). Hal ini mungkin terjadi karena perlakuan pupuk urea 100% (B0) menstimulasi pertumbuhan OTU pada spesies bakteri tertentu yang pertumbuhannya dipicu oleh asupan nitrogen yang tinggi. Pemberian pupuk urea 50% dan pupuk hayati (B1) diduga memacu pertumbuhan OTU tertentu pada fase vegetatif padi, sehingga persentase OTU yang spesifik pada B1 (26.6%) lebih tinggi dibandingkan dengan B0 (24.9%) (Gambar 13B). Persentase OTU yang sama pada dua perlakuan mengalami penurunan dari 0 HST (52.6%), 36 HST (48.5%), hingga 69 HST (47.7%) (Gambar 13). Hal tersebut diduga karena terjadi perubahan kondisi lingkungan selama masa pertumbuhan padi yang tidak mendukung bagi pertumbuhan sejumlah OTU tertentu.

OTU bakteri diklasifikasikan ke dalam setiap tingkat taksonomi. Jumlah OTU yang tidak terklasifikasi semakin menurun pada tingkat ordo, famili, hingga genus (Gambar 14). Hal ini menunjukkan tingginya keragaman bakteri yang belum teridentifikasi pada tanah sawah. Jumlah spesies bakteri per gram tanah diperkirakan berkisar antara 2,000 sampai 18,000 spesies, namun sebagian besar belum terklasifikasi (Aislabie *et al.* 2013). Hasil analisis klasifikasi OTU pada setiap sampel menunjukkan bahwa Proteobacteria merupakan filum yang paling dominan dengan kelimpahan relatif sebesar 21% hingga 23.3% (Gambar 15A). Dominansi Proteobacteria diduga karena filum ini memiliki anggota yang sangat beragam dengan aktivitas metabolik yang bervariasi tinggi, terutama sebagai kemoorganotrof dan kemolitotrof. Proteobacteria mampu beradaptasi dengan cepat pada tanah sawah dengan berbagai karakteristik fisika dan kimia akibat aktivitas antropogenik (Pittol *et al.* 2017). Pada penelitian ini, Proteobacteria, Acidobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Bacteroidetes, dan Actinobacteria adalah filum dominan yang mencapai sekitar 80% dari keseluruhan bakteri pada setiap sampel (Gambar 15A). Hasil tersebut konsisten dengan laporan sebelumnya (Edwards *et al.* 2014; Lee *et al.* 2014; Pittol *et al.* 2017).

Filum Proteobacteria pada setiap sampel didominasi oleh Betaproteobacteria, yang diikuti oleh Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, dan Gammaproteobacteria (Gambar 15B). Penelitian yang dilakukan oleh Lu *et al.* (2006) juga menunjukkan bahwa Betaproteobacteria dan Alphaproteobacteria merupakan bakteri yang tumbuh dominan di rizosfer dan akar padi, serta paling aktif dalam mengasimilasi karbon yang berasal dari tanaman padi. Betaproteobacteria berkontribusi pada metabolisme karbon dan mampu memanfaatkan senyawa karbon sederhana, seperti asam amino dan gula, maupun senyawa kompleks, seperti senyawa aromatik dan fenolik. Beberapa anggota Betaproteobacteria, antara lain *Burkholderia* dan *Thiobacillus*. *Burkholderia* dikenal sebagai bakteri pemacu tumbuh tanaman, sedangkan *Thiobacillus* sebagai pengoksidasi besi (Aislabie *et al.* 2013). Alphaproteobacteria memiliki aktivitas metabolik yang beragam, di antaranya mampu memfiksasi N₂, seperti *Rhizobium* dan *Bradyrhizobium*; mengoksidasi CH₄, seperti *Methylosinus*; mendegradasi senyawa hidrokarbon poliaromatik, seperti *Sphingomonas*; mengoksidasi ammonium dan nitrit, seperti *Nitrosomonas* dan *Nitrobacter*; reduksi nitrat, seperti *Paracoccus denitrificans*; serta beberapa diantaranya merupakan bakteri fototrof,

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

seperti *Rhodobacter* dan *Rhodospirillum* (Aislabie *et al.* 2013; Hanson dan Hanson 1996). Deltaproteobacteria beranggotakan bakteri pereduksi besi dan sulfat, misalnya *Geobacter* dan *Desulfovibrio*. Sementara itu, Gammaproteobacteria terlibat dalam degradasi senyawa organik, seperti *Pseudomonas*; dan oksidasi CH₄, seperti *Methylobacter* (Aislabie *et al.* 2013; Itoh *et al.* 2013; Hanson dan Hanson 1996).

Filum dominan lain memiliki berbagai fungsi di ekosistem sawah. Planctomycetes dilaporkan sebagai bakteri pengoksidasi ammonium secara anaerob (*anaerobic ammonium oxidation* [annamox]) (Ahn *et al.* 2012). Anggota filum Planctomycetes yang terdeteksi secara dominan pada penelitian ini, antara lain Planctomycetia dan Psycisphaerae (Gambar 15B). Acidobacteria, Bacteroidetes, dan Chlorobi berperan penting dalam dekomposisi senyawa organik kompleks di tanah sawah (Rui *et al.* 2009). Acidobacteria memiliki enzim xylan esterase yang berperan dalam degradasi xilan (Zhang *et al.* 2011) dan berkontribusi dalam reduksi nitrat dan nitrit (Aislabie *et al.* 2013). Bacteroidetes mendegradasi senyawa organik kompleks secara aerob, seperti pati, protein, selulosa, dan kitin (Aislabie *et al.* 2013). Chloroflexi telah dilaporkan sebagai pendegradasi polisakarida pada kondisi anaerob (Ahn *et al.* 2012). Filum Nitrospirae memiliki kemampuan oksidasi ammonium dan nitrit (Daims *et al.* 2015). Actinobacteria mampu mendegradasi polimer kompleks karena memiliki berbagai jenis enzim selulolitik, seperti cellulase, xylosidase, cutinase, lignin peroxidase, dan glycoside hydrolase (Zhang *et al.* 2011). Beberapa anggota Actinobacteria, misalnya *Streptomyces*, dapat menghasilkan senyawa antimikrob (Aislabie *et al.* 2013). Firmicutes, seperti *Clostridium* dan *Bacillus*, berperan penting dalam degradasi senyawa organik kompleks, baik secara aerob maupun anaerob (Zhang *et al.* 2011; Aislabie *et al.* 2013). Salah satu anggota Verrucomicrobia, *Optiutus terrae*, dilaporkan sebagai bakteri fermentatif anaerob yang mengubah polisakarida menjadi propionat (van Passel *et al.* 2011). Verrucomicrobia juga diketahui sebagai pengoksidasi CH₄ (Islam *et al.* 2008; Nazaries *et al.* 2013).

Perlakuan pemupukan menunjukkan sedikit perbedaan pada struktur komunitas bakteri di tanah sawah (Gambar 15). Aplikasi pupuk urea 50% dan pupuk hayati (B1) menunjukkan perbedaan keragaman dan komunitas bakteri dibandingkan aplikasi pupuk urea 100% (B0), antara lain dilihat dari indeks keragaman dan kelimpahan relatif filum tertentu (Tabel 10; Gambar 15). Konsisten dengan penelitian ini, perubahan minor ditemukan pada komunitas bakteri yang berasosiasi dengan padi akibat inokulasi bibit padi oleh *Azospirillum* sp. B510 (Bao *et al.* 2013). Namun sebaliknya, tidak ada perubahan pada struktur komunitas bakteri rizosfer padi yang diinokulasi dengan formulasi bakteri komersial berisi *Pseudomonas fluorescens* dan *Azospirillum brasilense* (Salamone *et al.* 2012). Aplikasi bakteri menimbulkan efek yang berbeda-beda pada komposisi mikrob indigenus di tanah maupun di tanaman (Trabelsi dan Mhamdi 2013). Hal tersebut diduga terjadi karena tingginya variasi berbagai faktor di antara penelitian-penelitian yang dilakukan sebelumnya.

Perlakuan pemupukan yang berbeda diduga berpengaruh pada karakteristik tanah dan komunitas mikrob. Penambahan pupuk nitrogen dapat merubah karakteristik tanah melalui penurunan pH tanah dan peningkatan ketersediaan nitrogen anorganik yang menyebabkan perubahan keragaman dan komunitas bakteri (Zhang *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2017). Zeng *et al.* (2016) melaporkan bahwa



penggunaan pupuk nitrogen secara langsung menurunkan keragaman bakteri melalui peningkatan ketersediaan ammonium dan secara tidak langsung berdampak pada komposisi komunitas bakteri melalui asidifikasi tanah. Penurunan pH tanah menyediakan kondisi yang tidak sesuai bagi sebagian besar bakteri tanah. Bakteri tanah beradaptasi dengan baik pada pH netral dengan kisaran pH yang sempit. Keragaman bakteri secara filogenetik ditemukan paling tinggi pada tanah dengan pH yang netral (Fierer dan Jackson 2006; Lauber *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2014). Pada penelitian ini, penurunan keragaman bakteri pada perlakuan B0 lebih tinggi dibandingkan B1 (Tabel 9). Hal tersebut diduga karena dosis urea yang lebih tinggi pada B0 daripada B1. Penurunan keragaman bakteri akibat akumulasi pupuk nitrogen disebabkan karena dominansi pertumbuhan kelompok mikrob yang menyukai nitrogen (*nitrophilic species*), sehingga mengalahkan bakteri lain dalam memanfaatkan sumber daya (Bobbink *et al.* 2010). Penambahan nitrogen juga memengaruhi komposisi komunitas bakteri tanah (Ikeda *et al.* 2014; Zeng *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2017).

Selain perubahan pH dan ketersediaan nitrogen di tanah, penelitian sebelumnya melaporkan terdapat perubahan karakteristik tanah yang lain akibat penggunaan urea. Pemakaian urea menurunkan kandungan karbon organik tanah dan kapasitas tukar kation (KTK) (Ikeda *et al.* 2014). Penambahan pupuk nitrogen tampaknya menyebabkan tanah lebih reduktif (Ikeda *et al.* 2014). Liu *et al.* (2019) juga melaporkan bahwa penggunaan urea menurunkan potensial redoks (Eh) di daerah sekitar perakaran tanaman padi dan menurunkan konsentrasi oksigen terlarut (*dissolved oxygen* [DO]) di daerah pertemuan antara tanah dan air.

Analisis pengelompokan menunjukkan bahwa komunitas bakteri terbagi menjadi 2 klaster oleh perlakuan pemupukan (Gambar 16). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan struktur komunitas bakteri di tanah sawah antara perlakuan B0 dan B1, walaupun bakteri yang dominan pada dua perlakuan tersebut merupakan kelompok bakteri yang sama. Pemberian pupuk urea dan pupuk hayati lebih berdampak pada komunitas bakteri tanah dibandingkan fase pertumbuhan padi. Namun demikian, terdapat perbedaan struktur komunitas bakteri antara fase pertumbuhan padi, yaitu pada 36 dan 69 HST (Gambar 16).

Perubahan komunitas bakteri tanah selama masa pertumbuhan padi terjadi secara kompleks. Suatu takson yang termasuk kelompok filum atau kelas yang sama tidak selalu merespon penambahan nitrogen di lingkungan dengan cara yang sama. Respon tersebut ditentukan oleh kelimpahan takson pada tingkat taksonomi yang lebih rendah (Zeng *et al.* 2016). Interaksi antarmikrob maupun antara mikrob, tanah, dan tanaman akan merespon perubahan lingkungan yang terjadi, sehingga ada perubahan komunitas mikrob di lingkungan tersebut.

Komunitas Metanogen dan Metanotrof

Komunitas metanogen dan metanotrof dianalisis menggunakan data komunitas arkea dan bakteri berdasarkan gen 16S rRNA. Kelimpahan relatif metanogen di tanah sawah pada penelitian ini berkisar antara 11.6% hingga 20.3% (Gambar 17A). Persentase tersebut lebih rendah dibandingkan dengan laporan sebelumnya yang mencapai 68.3% sampai 86.6% pada tanah sawah di Korea Selatan (Lee *et al.* 2014). Metanogen ditemukan lebih tinggi pada perlakuan B0

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Journal of Applied Microbiology

IPB University

(12.2-15.9%) dibandingkan B1 (8.9-10%) (Gambar 17A). Hal ini diduga berdampak terhadap laju emisi CH₄ yang lebih tinggi pada B0 daripada B1, baik di fase vegetatif maupun generatif padi (Tabel 11). Metanogen tersebut paling banyak terdapat pada fase vegetatif padi, baik di perlakuan B0 maupun B1. Selama fase tersebut, pertumbuhan anakan padi terjadi secara aktif namun beberapa anakan mengalami kematian. Eksudat akar yang banyak dikeluarkan pada fase vegetatif dan jaringan tanaman yang mati dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan dan kolonisasi metanogen. Selanjutnya, dinamika komunitas dan aktivitas metabolik metanogen memengaruhi emisi CH₄ (Watanabe *et al.* 2010).

Methanosarcinaceae dan *Methanomassiliicoccaceae* terdeteksi sebagai famili yang paling dominan pada dua perlakuan (Gambar 17A). Dua kelompok tersebut diduga berperan penting dalam produksi CH₄ pada B0 dan B1. Hal ini berbeda dengan laporan sebelumnya yang menyebutkan bahwa *Methanocella* (Rice Cluster I) dapat mencapai 20-50% dari total metanogen, serta memainkan peran kunci dalam metanogenesis di tanah sawah (Erkel *et al.* 2006; Conrad *et al.* 2006). *Methanosarcinaceae* yang umum ditemukan pada B0 dan B1 juga telah dilaporkan sebagai kelompok metanogen yang umum di tanah sawah (Lueders dan Friedrich 2000; Wang *et al.* 2010; Watanabe *et al.* 2010; Singh *et al.* 2012; Fazli *et al.* 2013; Yuan *et al.* 2018). Famili *Methanosarcinaceae* mendominasi metanogen pada perlakuan B0 dari 0 hingga 69 HST. Hal yang menarik pada penelitian ini, *Methanomassiliicoccaceae* yang jarang terdeteksi di tanah sawah menjadi kelompok yang paling dominan pada perlakuan B1 di fase vegetatif dan generatif padi (Gambar 17A). Reim *et al.* (2017) melaporkan bahwa *Methanosarcina* dan *Methanomassiliicoccus* mengalami peningkatan pada tanah sawah yang dikeringkan. Metanogen yang lain, seperti *Methanocella* dan *Methanosaeta*, juga umum ditemukan pada rizosfer padi (Edwards *et al.* 2014; Breidenbach *et al.* 2016; Yuan *et al.* 2018). Pada penelitian ini, Unclassified Methanocellales hanya ditemukan pada perlakuan B0, sedangkan *Methanoregulaceae* hanya terdeteksi pada B1 (Gambar 17A). Menurut Yuan *et al.* (2018), *Methanocella* lebih menyukai lingkungan yang diberi pupuk nitrogen sintetis, sebagaimana yang diamati pada penelitian ini (Gambar 17A; Lampiran 8). *Methanosarcinaceae* diketahui mampu menggunakan H₂, MeNH₂, metanol, dan asetat. *Methanosaetaceae* merupakan *aceticlastic methanogens*, sedangkan *Methanomassiliicoccaceae*, *Methanocellaceae*, dan *Methanoregulaceae* merupakan *hydrogenotrophic methanogens* (Liu dan Whitman 2008).

Kelompok metanotrof yang teramati pada penelitian ini terdiri atas ANME-2 dan *Methylocystaceae* (Gambar 17B). Kelompok ANME-2 yang merupakan arkea metanotrof berhasil terdeteksi pada penelitian ini walaupun dengan kelimpahan relatif yang rendah (Gambar 17B). ANME-2D diduga berperan penting dalam metabolisme CH₄ di sawah (Vaksmas *et al.* 2017). Sebaliknya, Lee *et al.* (2014) menduga bahwa proses oksidasi CH₄ secara anaerob di sawah dapat diabaikan karena ANME ditemukan dalam kelimpahan relatif yang rendah. Kelompok bakteri metanotrof dari famili *Methylocystaceae* terdeteksi dengan kelimpahan relatif yang rendah, yaitu 0.2% pada setiap sampel (Gambar 17B). Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan beberapa penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa bakteri metanotrof mencapai 0.79–1.75% dan sekitar 1.1% dari total bakteri yang ada di tanah sawah (Lee *et al.* 2014; Vaksmas *et al.* 2017). Meskipun demikian, *Methylocystaceae* diduga berperan aktif dalam mengoksidasi CH₄ di lahan sawah



pada penelitian ini. Anggota famili *Methylocystaceae* yang berhasil teridentifikasi yaitu genus *Methylosinus* (data tidak ditunjukkan). Bao *et al.* (2014) melaporkan bahwa *Methylosinus* (bakteri metanotrof tipe II) berkontribusi besar pada oksidasi CH₄ dan fiksasi N₂ di perakaran tanaman padi.

Komunitas metanogen dan metanotrof menunjukkan karakteristik yang berbeda antara perlakuan B0 dan B1 selama pertumbuhan padi (Gambar 17; Tabel 11). Hasil penelitian menunjukkan bahwa komunitas metanogen lebih melimpah pada perlakuan B0 (Gambar 17A; Tabel 11), sedangkan komunitas metanotrof secara umum lebih melimpah pada perlakuan B1 selama masa pertumbuhan padi (Gambar 17B; Tabel 11). Dosis pupuk nitrogen diduga berdampak pada komunitas mikrob yang berkaitan dengan emisi CH₄. Kelimpahan metanogen meningkat pada tanah sawah yang diberi pupuk nitrogen dengan dosis standar dibandingkan dosis rendah, sehingga memicu peningkatan emisi CH₄. Hal yang berbeda terjadi pada tanah yang diberi pupuk nitrogen dosis rendah, yaitu terjadi peningkatan populasi metanotrof dan aktivitas oksidasi CH₄ secara signifikan (Ikeda *et al.* 2014). Sementara menurut Liu *et al.* (2019), penambahan urea meningkatkan kelimpahan metanogen dan metanotrof yang juga meningkatkan emisi CH₄ di ekosistem sawah. Fan *et al.* (2016) juga melaporkan bahwa aplikasi urea meningkatkan emisi CH₄ di lahan sawah.

Kelimpahan relatif metanogen dari 0 hingga 36 HST menunjukkan pola peningkatan yang berbeda antara perlakuan pupuk urea 50% dengan pupuk hayati (B1) dan perlakuan pupuk urea 100% (B0). Peningkatan kelimpahan relatif metanogen pada perlakuan B0 lebih tinggi dibandingkan perlakuan B1 (Gambar 17A). Rendahnya peningkatan kelimpahan relatif metanogen pada B1 diduga terjadi karena aplikasi pupuk 50% dan pupuk hayati (B1) menimbulkan interaksi antara mikrob dan tanaman, sehingga memengaruhi pertumbuhan metanogen secara tidak langsung. Menurut Trabelsi dan Mhamdi (2013), inokulasi mikrob pada suatu lingkungan bisa menginduksi atau menekan pertumbuhan mikrob tertentu yang secara alami hidup di lingkungan tersebut. Selain itu, dosis pupuk urea yang lebih rendah pada B1 diduga menimbulkan ketersediaan O₂ yang lebih tinggi dibandingkan pada B0. Hal tersebut disebabkan aktivitas mikrob pengoksidasi ammonium pada B1 lebih rendah daripada B0. Dalam hal ini, hasil penelitian menunjukkan bahwa kelimpahan relatif Thaumarchaeota yang diketahui sebagai pengoksidasi ammonium terdeteksi lebih rendah pada B1 (Gambar 9B). Oleh karena itu, ketersediaan O₂ pada perlakuan B1 diduga menekan pertumbuhan metanogen. Namun, dampak inokulasi bakteri metanotrof sebagai pupuk hayati tampaknya tidak berpengaruh langsung pada kelimpahan relatif metanogen.

Gerritse dan Gottscha (1993) mengkaji pertumbuhan kultur campuran metanogen *Methanobacterium formicicum* dan metanotrof *Methylocystis* sp. pada kondisi O₂ yang terbatas. Pertumbuhan metanogen pada kultur tersebut terhambat secara signifikan karena *Methylocystis* sp. memiliki afinitas yang rendah terhadap O₂. Dianou dan Adachi (2001) melaporkan adanya hubungan simbiotik antara metanogen dan metanotrof pada ko-kultur dengan medium yang ditambahkan tanah sawah steril. Metanogen menyediakan CH₄ untuk metanotrof, sedangkan metanotrof melalui penggunaan O₂ menyediakan lingkungan anaerob yang sesuai untuk aktivitas metanogen. Kondisi tersebut melindungi metanogen dari toksisitas O₂. Meskipun demikian, beberapa jenis metanogen telah dilaporkan toleran terhadap oksigen, misalnya *Methanocella* yang memiliki gen penyandi enzim untuk

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

detoksifikasi O_2 , antara lain catalase, superoxide dismutase, dan superoxide reductase (Erkel *et al.* 2006). Bagaimanapun interaksi antarmikrob di alam terjadi secara lebih kompleks. Metanogen hidup pada lingkungan anaerob yang dekat dengan lingkungan aerob di daerah rizosfer padi, sehingga metanogen dan bakteri aerob diduga dapat tumbuh pada habitat yang sama, yaitu di daerah antara anaerob dan aerob (*anaerob and aerob interfaces*). Interaksi antarspesies mungkin terjadi antara metanogen dan bakteri aerob selama degradasi senyawa organik. Aktivitas bakteri aerob menyediakan kondisi yang mendukung pertumbuhan metanogen.

Pemberian pupuk nitrogen pada budidaya padi memengaruhi komunitas metanogen dan metanotrof. Dampak pupuk nitrogen terhadap produksi dan oksidasi CH_4 terjadi secara kompleks (Bodelier dan Laanbroek 2004; Bodelier 2011). Beberapa studi menunjukkan bahwa pupuk nitrogen sintetik menstimulasi metanogen sekaligus menghambat metanotrof di sawah (Conrad dan Rotfus 1991; Hanson dan Hanson 1996).

Penambahan urea diduga bisa meningkatkan pertumbuhan metanogen melalui beberapa cara. Ammonium dari hasil penguraian urea dapat digunakan untuk pertumbuhan metanogen yang kemudian berdampak pada tingginya produksi CH_4 (Banger *et al.* 2012). Pada lingkungan pertanian padi, nitrogen menjadi unsur hara yang terbatas, sehingga terjadi persaingan antara tanaman dan mikrob. Namun, persaingan tersebut dapat dikurangi oleh asupan nitrogen dari pupuk (Wu *et al.* 2009). Penyerapan nitrogen oleh tanaman semakin meningkat seiring pertumbuhan tanaman. Hal ini berdampak pada penurunan pertumbuhan bakteri pereduksi ammonium (nitrifikasi) serta produksi nitrit (NO_2^-) dan nitrat (NO_3^-). Sebagai akibatnya, pertumbuhan bakteri pereduksi nitrat (denitrifikasi) yang merupakan pesaing bakteri fermentatif mengalami penurunan. Kondisi tersebut mendukung bakteri fermentatif dalam mendegradasi senyawa organik dan menyediakan substrat bagi metanogen, sehingga pertumbuhan metanogen dan produksi CH_4 mengalami kenaikan. Dampak lain akibat penurunan pertumbuhan bakteri denitrifikasi adalah penurunan produksi NO_2^- , NO , dan N_2O yang bersifat toksik bagi metanogen serta peningkatan ketersediaan H_2 bagi metanogen (Conrad 2007). Selain itu, aplikasi urea secara tidak langsung menstimulasi pertumbuhan metanogen dan produksi CH_4 melalui peningkatan pertumbuhan tanaman. Penyerapan nitrogen oleh tanaman memicu peningkatan pertumbuhan tanaman yang berakibat pada peningkatan senyawa karbon organik berupa eksudat akar dan biomassa tanaman yang menjadi substrat bagi metanogen (Aulakh *et al.* 2001b; Banger *et al.* 2012).

Banyak studi melaporkan hasil yang kontradiktif terkait efek pupuk nitrogen terhadap metanotrof (Banger *et al.* 2012). Aplikasi pupuk nitrogen anorganik berupa urea atau $(NH_4)_2HPO_4$ dengan dosis 200 atau 400 kg N ha^{-1} dapat menstimulasi kelimpahan metanotrof dan aktivitas oksidasi CH_4 yang berdampak pada penurunan emisi CH_4 (Bodelier *et al.* 2000). Nitrogen dapat dimanfaatkan oleh metanotrof untuk pertumbuhannya, sehingga meningkatkan aktivitas oksidasi CH_4 (Conrad 2007). Pada penelitian ini, penggunaan urea dengan dosis yang lebih rendah (B1) diduga memicu aktivitas oksidasi CH_4 yang menyebabkan penurunan laju emisi CH_4 (Table 11). Namun sebaliknya, pupuk nitrogen dilaporkan dapat menghambat aktivitas enzim methane monooxygenase (MMO) pada bakteri metanotrof, sehingga terjadi penurunan aktivitas oksidasi CH_4 yang berakibat pada kenaikan laju emisi CH_4 (Conrad dan Rotfus 1991; Hanson dan Hanson 1996).



Pupuk urea dengan dosis 120 kg N ha^{-1} meningkatkan emisi CH_4 musiman sebesar 94% (Adhya *et al.* 2000). Penghambatan aktivitas enzim MMO oleh urea terjadi karena ammonium (NH_4^+) merupakan substrat kompetitif bagi enzim tersebut. Metanotrof dapat menggunakan ammonium sebagai substrat ketika jumlah ammonium di tanah lebih tinggi dibandingkan CH_4 (Hanson dan Hanson 1996; Bodelier dan Laanbroek 2004). Meskipun demikian, efek stimulasi dan penghambatan metanotrof oleh nitrogen bergantung pada ketersediaannya di lingkungan dan komposisi komunitas metanotrof (Conrad 2007). Mishra *et al.* (2018) menyimpulkan bahwa ammonium pada konsentrasi yang rendah dapat menstimulasi metanotrof, sedangkan konsentrasi ammonium yang tinggi dapat menekan pertumbuhan metanotrof melalui penghambatan kerja enzim MMO. Di sisi lain, beberapa studi melaporkan bahwa pupuk nitrogen tidak berdampak pada aktivitas metanotrof (Shrestha *et al.* 2010; Adviento-Borbe *et al.* 2015).

Selain berdasarkan gen 16S rRNA, komunitas metanogen dan metanotrof juga diidentifikasi menggunakan gen fungsional. Sekuens gen *mcrA* dan *pmoA* yang diperoleh menggambarkan secara akurat keseluruhan metanogen dan metanotrof pada dua perlakuan (Gambar 18; 19). Keragaman metanogen dan metanotrof berbeda antara perlakuan B0 dan B1 (Tabel 12). Tanah sawah yang diberi pupuk urea dosis tinggi (B0) memiliki keragaman metanogen yang lebih tinggi dan keragaman metanotrof yang lebih rendah. Sebaliknya, perlakuan B1 memiliki keragaman metanogen lebih rendah dan keragaman metanotrof lebih tinggi (Tabel 12). Keragaman metanotrof yang tinggi diduga sejalan dengan kemampuannya yang beragam dalam mengoksidasi CH_4 , sehingga berdampak pada penurunan laju emisi CH_4 . Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sutanto *et al.* (2014) menunjukkan bahwa tanah sawah yang diberi bakteri metanotrof memiliki keragaman metanotrof yang paling tinggi dan emisi CH_4 yang paling rendah. Liu *et al.* (2019) menyebutkan bahwa keragaman metanogen dan metanotrof menurun akibat penggunaan urea.

Diagram Venn menunjukkan perbedaan OTU metanogen dan metanotrof pada dua perlakuan (Gambar 20). OTU metanogen yang spesifik pada B1 (30.9%) lebih tinggi daripada B0 (24.0%) (Gambar 20A). Hal tersebut diduga terjadi karena pertumbuhan OTU tertentu di perlakuan B1, misalnya Uncultured archaeon yang dideteksi lebih melimpah pada B1 (Gambar 21A). Adapun OTU metanotrof yang spesifik ditemukan lebih banyak pada B0 (17.8%) dibandingkan B1 (10.8%) (Gambar 20B) diduga karena pemberian urea 100% (B1) lebih menstimulasi pertumbuhan OTU metanotrof tertentu yang tidak mampu tumbuh baik pada aplikasi pupuk urea 50% dengan pupuk hayati (B1).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa struktur komunitas metanogen berdasarkan gen *mcrA* didominasi oleh kelompok yang berbeda antara dua perlakuan, yaitu Uncultured methanogenic archaeon pada perlakuan B0 (69.3%) dan Uncultured archaeon pada perlakuan B1 (52.4%) (Gambar 21A). Perbedaan tersebut diduga karena adanya perbedaan pemupukan, dimana Uncultured methanogenic archaeon menyukai lingkungan dengan asupan nitrogen yang lebih tinggi (B0). Komunitas metanotrof yang mendominasi pada dua perlakuan merupakan kelompok yang sama, yaitu Uncultured Methanotrophic bacterium (Gambar 21B). Tingginya proporsi OTU yang tidak terklasifikasi menunjukkan bahwa gen *mcrA* dan *pmoA* di tanah sawah pada penelitian ini bervariasi tinggi dan sebagian besar belum terklasifikasi.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Rasio metanogen:metanotrof ditentukan berdasarkan data kelimpahan relatif dari hasil analisis menggunakan gen 16S rRNA (Tabel 11). Komunitas metanogen dan metanotrof diduga berkorelasi dengan emisi CH₄. Lee *et al.* (2014) melaporkan bahwa rasio transkrip:gen *mcrA* terhadap transkrip:gen *pmoA* memainkan peran yang nyata pada siklus CH₄ dan dapat dijadikan sebagai penduga terbaik untuk emisi CH₄ aktual di ekosistem sawah. Hal ini mendukung hipotesis yang menyatakan bahwa emisi CH₄ merupakan hasil dari interaksi antara gen penghasil CH₄ dan gen pengoksidasi CH₄. Berdasarkan hal tersebut, karakteristik metanogen dan metanotrof dapat dijadikan sebagai landasan dalam upaya mitigasi CH₄.

Analisis korelasi menunjukkan bahwa rasio metanogen:metanotrof berdasarkan gen 16S rRNA berkorelasi positif dengan laju emisi CH₄ walaupun tidak signifikan (Tabel 11). Rasio yang lebih tinggi menunjukkan laju emisi CH₄ yang lebih tinggi, sebagaimana ditunjukkan pada fase vegetatif padi di dua perlakuan dibandingkan pada fase generatif padi (Tabel 11). Sebagaimana yang dilaporkan sebelumnya bahwa emisi CH₄ lebih tinggi pada saat pembentukan anakan padi ketika tanah digenangi (Sheng *et al.* 2016). Sementara menurut Yuan *et al.* (2018), fluks CH₄ tertinggi terjadi saat pemanjangan ruas batang (*jointing stage*) pada 36 HST. Kelimpahan dan aktivitas metanogen yang lebih tinggi pada fase vegetatif padi terjadi karena kondisi anaerob akibat penggenangan tanah (Breidenbach dan Conrad 2015; Watanabe *et al.* 2009). Di sisi lain, aktivitas oksidasi CH₄ dipengaruhi oleh ketersediaan O₂ dan CH₄, meskipun demikian oksidasi CH₄ terjadi secara simultan selama pertumbuhan padi (Conrad dan Rotfus 1991; Bosse dan Frenzel 1997). Rasio metanogen:metanotrof dan laju emisi CH₄ yang lebih rendah diamati pada perlakuan B1, baik pada fase vegetatif maupun generatif padi (Tabel 11). Hal ini diduga karena peningkatan aktivitas oksidasi CH₄ dari pupuk hayati yang diaplikasikan. Penambahan pupuk hayati berpotensi menurunkan rasio metanogen:metanotrof di sawah dan mengoptimalkan aktivitas oksidasi CH₄ sehingga dapat menurunkan laju emisi CH₄. Berdasarkan studi sebelumnya yang dilakukan oleh Sutanto *et al.* (2014), emisi CH₄ total pada perlakuan kombinasi bakteri metanotrof dan pupuk sintetis dosis rendah dapat mencapai 2,256 kg C ha⁻¹ tahun⁻¹. Angka tersebut lebih rendah bila dibandingkan dengan total emisi CH₄ pada aplikasi pupuk sintetis 100% yang mencapai 2,527 kg C ha⁻¹ tahun⁻¹. Dengan demikian, aplikasi bakteri metanotrof dapat menurunkan total emisi CH₄ hingga 271 kg C ha⁻¹ tahun⁻¹ atau sebesar 10.72%.

Rizosfer padi merupakan lingkungan dengan karakteristik yang unik dan dapat dijadikan sebagai target utama dalam memanipulasi struktur komunitas mikrob untuk mempelajari proses biokimia yang berdampak pada siklus biogeokimia secara global. Manipulasi komunitas dan fungsi mikrob utamanya melalui optimasi bakteri metanotrof di akar dan daerah sekitar perakaran padi berpotensi dikembangkan untuk memacu pertumbuhan tanaman padi dan menurunkan laju emisi CH₄. Aplikasi urea 50% dengan pupuk hayati (B1) diduga memengaruhi respon mikrob dan tanaman yang berakibat pada pemacuan pertumbuhan tanaman padi dan penurunan emisi CH₄ (Fatma 2019), serta perbedaan struktur komunitas mikrob tanah. Namun, apakah dampak tersebut disebabkan oleh urea 50% atau pemberian bakteri perlu diverifikasi lebih lanjut. Di sisi lain, penggunaan urea 50% dengan pupuk hayati (B1) menurunkan penggunaan urea pada pertanian padi, sehingga mendukung pengembangan sistem pertanian yang berkelanjutan.



SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Suksesi dan dinamika populasi arkea dan bakteri terjadi pada setiap perlakuan selama masa pertumbuhan padi. Crenarchaeota dan Proteobacteria masing-masing merupakan arkea dan bakteri yang dominan di tanah sawah pada setiap perlakuan. Aplikasi pupuk urea 50% dan pupuk hayati (B1) tidak mengubah dominansi arkea dan bakteri di tanah sawah dibandingkan dengan perlakuan pupuk urea 100% (B0). Meskipun demikian, analisis pengelompokan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan struktur komunitas arkea dan bakteri antara dua perlakuan pemupukan tersebut. Rasio metanogen:metanotrof pada perlakuan B1 lebih rendah daripada B0, baik pada fase vegetatif maupun generatif padi.

Saran

Penelitian lebih lanjut terkait dampak aplikasi pupuk hayati terhadap komunitas mikrob tanah perlu dikaji melalui pendekatan metatranskriptomik sehingga diperoleh informasi tentang struktur komunitas mikrob yang aktif pada waktu tertentu selama pertumbuhan padi, terutama kaitannya dengan siklus CH₄.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhya TK, Bharati K, Mohanty SR, Ramakrishnan B, Rao VR, Sethunathan N, Wassmann R. 2000. Methane emission from rice fields at Cuttack, India. *Nutr Cycl Agroecosyst*. 58: 95–105.
- Adviento-Borbe MA, Padilla GN, Pittelkow CM, Simmonds M, van Kessel C, Linquist B. 2015. Methane and nitrous oxide emissions from flooded rice systems following the end-of-season drain. *J Environ Qual* 44: 1071-1079.
- Ahn JH, Song J, Kim BY, Kim MS, Joa JH, Weon HY. 2012. Characterization of the bacterial and archaeal communities in rice field soils subjected to long-term fertilization practices. *J Microbiol*. 50 (5): 754-765.
- Aislabie J, Deslippe JR. 2013. Soil microbes and their contribution to soil services. Di dalam: Dymond JR, editor. *Ecosystem Services in New Zealand – Conditions and Trends*. Lincoln (NZ): Manaaki Whenua Pr. hlm 143-161.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*. 59 (1): 143-169.
- Armitage D, Gallagher K, Youngblut N, Buckley D, Zinder S. 2012. Millimeter-scale patterns of phylogenetic and trait diversity in a salt marsh microbial mat. *Front Microbiol*. 3 (239): 1-16.

- Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Rennenberg H. 2001a. Impact of root exudates of different cultivars and plant development stages of rice (*Oryza sativa* L.) on methane production in a paddy soil. *Plant Soil*. 230 (1): 77-86.
- Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Rennenberg H. 2001b. Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biol*. 3 (2): 139-148.
- Auman AJ, Speake CC, Lidstrom ME. 2001. *nifH* sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*. 67 (9): 4009–4016.
- Bai R, Wang JT, Deng Y, He JZ, Feng K, Zhang LM. 2017. Microbial community and functional structure significantly varied among distinct types of paddy soils but responded differently along gradients of soil depth layers. *Front Microbiol*. 8 (945): 1-7.
- Bao Z, Sasaki K, Okubo T, Ikeda S, Anda M, Hanzawa E, Kakizaki K, Sato T, Mitsui H, Minamisawa K. 2013. Impact of *Azospirillum* sp. B510 inoculation on rice-associated bacterial communities in a paddy field. *Microbes Environ*. 28 (4): 487–490.
- Bao Z, Okubo T, Kubota K, Kasahara Y, Tsurumaru H, Anda M, Ikeda S, Minamisawa K. 2014. Metaproteomic identification of diazotrophic methanotrophs and their localization in root tissues of field-grown rice plants. *Appl Environ Microbiol*. 80 (16): 5043–5052.
- Banger K, Tian H, Lu C. 2012. Do nitrogen fertilizers stimulate or inhibit methane emissions from rice fields? *Glob Change Biol*. 18 (10): 3259-3267.
- Bender M, Conrad R. 1992. Kinetics of methane oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high methane mixing ratios. *FEMS Microbiol Ecol*. 101: 261–270.
- Bender M, Conrad R. 1995. Effect of CH₄ concentrations and soil conditions on the induction of CH₄ oxidation activity. *Soil Biol Biochem*. 27 (12): 1517–1527.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, *et al*. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 456: 53–59.
- Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sørensen KB, Anderson R, Fredricks HF, Elvert M, Kelly TJ, Schrag DP. 2006. Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103 (10): 3846–3851.
- Bintarti AF, Rusmana I, Wahyudi AT. 2014. Identification of *nifD* and *nifH* genes of methanotrophic bacteria from rice field. *Annales Bogorienses*. 18 (2): 13-25.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, Spranger T, Alkemade R, Ashmore M, Bustamante M, Cinderby S, Davidson E, Dentener F *et al*. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecol Appl*. 20 (1): 30–59.
- Bodelier PLE. 2011. Interactions between nitrogenous fertilizers and methane cycling in wetland and upland soils. *Curr Opin Env Sust*. 3: 379–388.



- Bodelier PLE, Laanbroek HJ. 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol.* 47:265–277.
- Bodelier PLE, Roslev P, Henckel T, Frenzel P. 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature.* 403 (6768): 421-424.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods.* 10 (1): 57–59.
- Borrel G, Je´ze´quel D, Biderre-Petit C, Morel-Desrosiers N, Morel JP, Peyret P, Fonty G, Lehours AC. 2011. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Res Microbiol.* 162: 832-847.
- Borrel G, O’Toole PW, Harris HMB, Peyret P, Brugère JF, Gribaldo S. 2013. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol.* 5 (10): 1769–1780.
- Bosse U, Frenzel P. 1997. Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*). *Appl Environ Microbiol.* 63 (4): 1199-1207.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2013. Proyeksi Penduduk Indonesia 2010-2035. Jakarta (ID): BPS.
- Breidenbach B, Conrad R. 2015. Seasonal dynamics of bacterial and archaeal methanogenic communities in flooded rice fields and effect of drainage. *Front Microbiol.* 5: 1-16.
- Breidenbach B, Pump J, Dumont MG. 2016. Microbial community structure in the rhizosphere of rice plants. *Front Microbiol.* 6: 1-12.
- Bridgham SD, Cadillo-Quiroz H, Keller JK, Zhuang Q. 2013. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Glob Change Biol.* 19: 1325–1346.
- Cai Z, Xing G, Yan X, Xu H, Tsuruta H, Yagi K, Minami K. 1997. Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management. *Plant Soil.* 196: 7-14.
- Caldwell SL, Laidler JR, Brewer EA, Eberly JO, Sandborgh SC, Colwell FS. 2008. Anaerobic oxidation of methane: mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. *Environ Sci Technol.* 42 (18): 6791-6799.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7 (5): 335-336.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108: 4516–4522.
- Chaar G, Fernandes M, Myrold D, Bottomley P. 2009. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microb Ecol.* 58 (2): 414–424.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

- Chin KJ, Lueders T, Friedrich MW, Klose M, Conrad R. 2004. Archaeal community structures and pathway of methane formation on rice roots. *Microb Ecol.* 47:59–67.
- Coolen MJL, Hopmans EC, Rijpstra WIC, Muyzer G, Schouten S, Volkman JK, Damste JSS. 2004. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. *Org Geochem.* 35: 1151–1167.
- Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, Vivanco JM. 2012. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fert Soils.* 48 (5): 489–99.
- Conrad R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol Rev.* 60 (4): 609–640.
- Conrad R. 2007. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Adv Agron.* 96 (7): 1–63.
- Conrad R, Erkel C, LieFsack W. 2006. Rice Cluster I methanogens, an important group of archaea producing greenhouse gas in soil. *Curr Opin Biotechnol.* 17 (3): 262–267.
- Conrad R, Frenzel P. 2002. Flooded soils. Di dalam: Bitton G, editor. *Encyclopedia of Environmental Microbiology.* New York (US): John Wiley & Sons, Inc. hlm 1316–1333.
- Conrad R, Rothfus F. 1991. Methane oxidation in the soil surface layer of a flooded rice field and the effect of ammonium. *Biol Fertil Soil.* 12 (1): 28 – 32.
- Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, Han P, Herbold C, Albertsen M, Jehmlich N, Palatinszky M, Vierheilig J, Bulaev A *et al.* 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature.* 528: 504–523.
- Dedysh SN, Ricke P, Liesack W. 2004. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology.* 150 (5): 1301–1313.
- Dedysh DN, Dunfield PF. 2011. Facultative and obligate methanotrophs: how to identify and differentiate them. *Methods Enzymol.* 495: 31– 44.
- Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, Hirsch PR, Vogel TM. 2011. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Appl Environ Microbiol.* 77 (4): 1315–1324.
- Delong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 5685–5689.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 72 (7): 5069–5072.
- Dianou D, Adachi K. 2001. Co-culture of a methanogenic archaeon and a methanotrophic bacterium on sterilized soil in large test tubes: design for soil-mediated co-culture. *Microbes Environ.* 16 (4): 222–226.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 27 (16): 2194–2200.



- Edgar RC. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 10 (10): 996-998.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundareshan V. 2014. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112 (8): E911-E920.
- Edwards JA, Santos-Medellín CM, Liechty ZS, Nguyen B, Lurie E, Eason S, Phillips G, Sundaresan V. 2018. Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice. *PLoS Biol*. 16 (2): 1-28.
- Erkel C, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. 2006. Genome of Rice Cluster I archaea - the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science*. 313: 370-372.
- Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, De Beer D *et al*. 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*. 464 (7288): 543-548.
- Evans PN, Parks DH, Chadwick GL, Robbins SJ, Orphan VJ, Golding SD, Tyson GW. 2015. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*. 350 (6259): 434-438.
- Fan X, Xing P. 2016. Differences in the composition of archaeal communities in sediments from contrasting zones of Lake Taihu. *Front Microbiol*. 7: 1-11.
- Fan X, Yu H, Wu Q, Ma J, Xu H, Yang J, Zhuang Y. 2016. Effects of fertilization on microbial abundance and emissions of greenhouse gases (CH₄ and N₂O) in rice paddy fields. *Ecol Evol*. 6 (4): 1054-1063.
- Fatma YS. 2019. Pengaruh aplikasi bakteri metanotrof dan pereduksi N₂O terhadap emisi CH₄ dan N₂O, pertumbuhan padi, serta komunitas bakteri di lahan sawah [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Fazli P, Man HC, Shah UKM, Idris A. 2013. Characteristics of methanogens and methanotrophs in rice fields: a review. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*. 21 (1): 3-17.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103 (3): 626-631.
- Friedrich MW. 2005. Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing archaea. *Methods Enzymol*. 26 (397): 428-428.
- Frenzel P. 2000. Plant-associated methane oxidation in rice fields and wetlands. *Adv Microb Ecol*. 16: 85-114.
- Gerritse J, Gottschal JC. 1993. Two-membered mixed cultures of methanogenic and aerobic bacteria in O₂-limited chemostats. *J Gen Microbiol*. 139: 1853-1860.
- Gibbons SM, Gilbert JA. 2015. Microbial diversity-exploration of natural ecosystems and microbiomes. *Curr Opin Genet Dev*. 35: 66-72.
- Gr ndger F, Jiménez N, Thielemann T, Straaten N, L uders T, Richnow HH, Kr ger M. 2015. Microbial methane formation in deep aquifers of a coal-bearing sedimentary basin, Germany. *Front Microbiol*. 6: 1-17.

- Hakemian AS, Rosenzweig AC. 2007. The biochemistry of methane oxidation. *Annu Rev Biochem.* 76: 223-241.
- Hanson RS, Hanson TE. 1996. Methanotrophic bacteria: a review. *Microbiol Rev.* 60 (2): 439-471.
- Haroon MF, Hu S, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, Yuan Z, Tyson GW. 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature.* 500: 567–570.
- Haas BJ, et al. 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21 (3): 494-504.
- Henckel T, Friedrich M, Conrad R. 1999. Molecular analyses of the methane oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* 65 (5): 1980–1990.
- Henckel T, Jäckel U, Conrad R. 2000. Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 34 (3): 279-291.
- Hodkinson BP, Grice EA. 2015. Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research. *Adv Wound Care.* 4 (1): 50–58.
- Holmes AJ, Costello AM, Lidstrom ME, Murrell JC. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol Lett.* 132: 203–208.
- Hong C, Si Y, Xing Y, Li Y. 2015. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environ Sci Pollut Res.* 22 (14): 10788–10799.
- Horz HP, Yimiga MT, Liesack W. 2001. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol.* 67 (9): 4177-4185.
- Hou AX, Chen GX, Wang ZP, van Cleemput O, Patrick Jr WH. 2000. Methane and nitrous oxide emissions from a rice field in relation to soil redox and microbiological processes. *Soil Sci Soc Am J.* 64: 2180-2186.
- Husin YA, Murdiyarso D, Khalil MAK, Rasmussen RA, Shearer M J, Sabiham S, Sunar A, Adjuwana H. 1995. Methane flux from Indonesian wetland rice: the effects of water management and rice variety. *Chemosphere.* 31 (4): 3153-3180.
- Ikeda S, Sasaki K, Okubo T, Yamashita A, Terasawa K, Bao Z, Liu D, Watanabe T, Murase J, Asakawa S *et al.* 2014. Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes Environ.* 29 (1): 50–59.
- Inglett PW, Reddy KR, Corstanje R. 2004. Anaerobic Soil. Di dalam: Hillel D, Rosenzweig C, Powlson D, Scow K, Singer M, Sparks D. editor.



Encyclopedia of Soils in the Environment. Cambridge (US): Academic Pr. hlm 72-78.

[IPCC] Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge (GB): Cambridge Univ Pr.

[IPCC] Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva (CH): IPCC.

Islam T, Jensen S, Reigstad LJ, Larsen O, Birkeland NK. 2008. Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105 (1): 300–304.

Itoh H, Ishii S, Shiratori Y, Oshima K, Otsuka S, Hattori M, Senoo K. 2013. Seasonal transition of active bacterial and archaeal communities in relation to water management in paddy soils. *Microbes Environ*. 28 (3): 370-380.

Jackson KM, Ilamurugu K. 2014. Metabolic profiling of rice root exudates and its impact on rhizosphere microbial dynamics under aerobic conditions. *Res J Agric Sci*. 5 (4): 777-781.

Jones DL, Hodge A. 1999. Biodegradation kinetics and sorption reactions of three differently charged amino acids in soil and their effect on plant organic nitrogen availability. *Soil Biol Biochem*. 31: 1331–1342.

Joulian C, Escoffier S, Le Mer J, Neue HU, Roger PA. 1997. Populations and potential activities of methanogens and methanotrophs in rice fields: relations with soil properties. *Eur J Soil Biol*. 33 (2): 105-116.

Kennedy A, Smith K. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil*. 170 (1): 75–86.

Kennedy AC. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ*. 74: 65–76.

Kimura M, Murase J, Lu Y. 2004. Carbon cycling in rice field ecosystems in the context of input, decomposition and translocation of organic materials and the fates of their end products (CO₂ and CH₄). *Soil Biol Biochem*. 36: 1399-1416.

Krüger M, Frenzel P. 2003. Effect of N-fertilization on CH₄ oxidation and production, and consequences for CH₄ emissions from microcosms and rice fields. *Glob Change Biol*. 9: 773–784.

Krüger M, Frenzel P, Kemnitz D, Conrad R. 2005. Activity, structure and dynamics of the methanogenic archaeal community in a flooded Italian rice field. *FEMS Microbiol Ecol*. 51: 323–331.

Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol*. 75 (15): 5111-5120.

Lee HJ, Kim SY, Kim PJ, Madsen EL, Jeon CO. 2014. Methane emission and dynamics of methanotrophic and methanogenic communities in a flooded rice field ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol*. 88 (1): 195–212.

- Le Mer J, Roger P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soil: a review. *Eur J Soil Biol.* 37: 25 – 50.
- Liesack W, Sylvia S, Revsbech NP. 2000. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol Rev.* 24 (5): 625-645.
- Liu Y, Whitman WB. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann NY Acad Sci.* 1125: 171–189.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2014. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 1–11.
- Liu J, Zang H, Xu H, Zhang K, Jiang Y, Hu Y, Zeng Z. 2019. Methane emission and soil microbial communities in early rice paddy as influenced by urea-N fertilization. *Plant Soil.* 1-16.
- Lloyd KG, Schreiber L, Petersen DG, Kjeldsen KU, Lever MA, Steen MA, Stepanauskas R, Richter M, Kleindienst S, Lenk S, Schramm A *et al.* 2013. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature.* 496 (7444): 215-220.
- Lu Y, Conrad R. 2005. In situ stable isotope probing of methanogenic archaeal in the rice rhizosphere. *Science.* 309: 1088–1090.
- Lu Y, Rosencrantz D, Liesack W, Conrad R. 2006. Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environ Microbiol.* 8 (8): 1351-1360.
- Lueders T, Friedrich M. 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol.* 66 (7): 2732–2742.
- Lueders T, Chin KJ, Conrad R, Friedrich M. 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol.* 3 (3): 194–204.
- Luo X, Fu X, Yang Y, Cai P, Peng S, Chen W, Huang Q. 2015. Microbial communities play important roles in modulating paddy soil fertility. *Sci Rep.* 6 (20326): 1-12.
- Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology.* 148 (11): 3521-3530.
- Magoč T, Salzberg SL. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 27 (21): 2957-2963.
- Maisaroh. 2009. Aktivitas enzim nitrogenase dan oksidasi metan bakteri metanotrof asal sawah [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Malyan SK, Bhatia A, Kumar A, Gupta DK, Singh R, Kumar SS, Tomer R, Kumar O, Jain N. 2016. Methane production, oxidation and mitigation: a mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. *Sci Total Environ.* 572: 874–896.
- McDonald IR, Murrell JC. 1997. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiol Lett.* 156: 205–210.



- Mishra VK, Shukla R, Shukla PN. 2018. Inhibition of soil methane oxidation by fertilizer application: an intriguing but persistent paradigm. *Environ Pollut Prot.* 3 (2): 57-69.
- Muttaqin M. 2012. Kombinasi bakteri metanotrof, pereduksi dinitrogen oksida, dan penambat nitrogen sebagai agen pereduksi gas rumah kaca dengan pupuk hayati pada tanaman padi [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nazaries L, Murrell JC, Millard P, Baggs L, Singh BK. 2013. Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. *Environ Microbiol.* 15 (9): 2395–2417.
- Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23: 375–396.
- Nicol GW, Glover LA, Prosser JI. 2003. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ Microbiol.* 5: 152-162.
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol.* 10 (11): 2966–2978.
- [PEACE] Pelangi Energi Abadi Citra Enviro. 2007. *Indonesia and Climate Change: Current Status and Policies*. Jakarta (ID): PEACE.
- Philippot L, Hallin S, Borjesson D, Baggs EM. 2009. Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant Soil.* 321: 61–81.
- Pingak GMF, Sutanto H, Akhdiya A, Rusmana I. 2014. Effectivity of methanotrophic bacteria and *Ochrobactrum anthropi* as biofertilizer and emission reducer of CH₄ and N₂O in inorganic paddy fields. *JOMB.* 3 (3): 217-221.
- Pittol M, Scully E, Miller D, Durso L, Fiuza LM, Valiati VH. 2017. Bacterial community of the rice floodwater using cultivation-independent approaches. *Int J Microbiol.* 2013: 1-13.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers Michael. *BMC Genomics.* 13 (341): 1-13.
- Reim A, Hernández M, Klose M, Chidthaisong A, Yuttitham M, Conrad R 2017. Response of methanogenic microbial communities to desiccation stress in flooded and rain-fed paddy soil from Thailand. *Front Microbiol.* 8 (785): 1-17.
- Rosencrantz D, Rainey FA, Janssen PH. 1999. Culturable populations of *Sporomusa* spp. and *Desulfovibrio* spp. in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 65 (8): 3526–3533.
- Roy R, Kluber HD, Conrad R. 1997. Early initiation of methane production in anoxic rice soil despite the presence of oxidants. *FEMS Microbiol Ecol.* 24: 311–320.
- Rui J, Peng J, Lu Y. 2009. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil. *Appl Environ Microbiol.* 75 (14): 4879–4886.

- Rusmana I, Akhdiya A. 2009. Isolation and characterization of methanotrophic bacteria from rice fields. *Biotropia*. 16 (2): 71-78.
- Salamone IEG, Funes JM, Salvoa LPD, Escobar-Ortega JS, D'Auria F, Ferrando L, Fernandez-Scavino A. 2012. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Appl Soil Ecol*. 61: 196-204.
- Scheutz C, Kjeldsen P, Bogner JE, De Visscher A, Gebert J, Hilger HA, Huber-Humer M, Spokas K. 2009. Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions. *Waste Manag Res*. 27: 409-455.
- Semrau JD, DiSpirito AA, Yoon S. 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev*. 34: 496-531.
- Seo J, Jang I, Gebauer G, Kang H. 2014. Abundance of methanogens, methanotrophic bacteria, and denitrifiers in rice paddy soils. *Wetlands*. 34 (2): 213-223.
- Setyanto P, Rosenani AB, Boer R, Fauziah CI, Khanif MJ. 2004. The effect of rice cultivars on methane emission from irrigated rice fields. *Indones J Agric Sci*. 5 (1): 20-31.
- Setyanto P, Pramono A, Adriany TA, Susilawati HL, Tokida T, Padre AT, Minamikawa K. 2017. Alternate wetting and drying reduces methane emission from a rice paddy in Central Java, Indonesia without yield loss. *Soil Sci Plant Nut*. 1-8.
- Setyaningsih R, Rusmana I, Setyanto P, Suwanto A. 2010. Physiological characterization and molecular identification of denitrifying bacteria possessing nitrous oxide high reduction activity isolated from rice soils. *Microbiol Indones*. 4 (2): 75-78.
- Sheng R, Chen A, Zhang M, Whiteley AS, Kumaresan D, Wei W. 2016. Transcriptional activities of methanogens and methanotrophs vary with methane emission flux in rice soils under chronic nutrient constraints of phosphorus and potassium. *Biogeosciences*. 13 (23): 6507-6518.
- Shrestha M, Abraham W-R, Shrestha PM, Noll M, Conrad R. 2008. Activity and composition of methanotrophic bacterial communities in planted rice soil studied by flux measurements, analyses of *pmoA* gene and stable isotope probing of phospholipid fatty acids. *Environ Microbiol*. 10 (2): 400-412.
- Shrestha M, Shrestha PM, Frenzel P, Conrad R. 2010. Effect of nitrogen fertilization on methane oxidation, abundance, community structure, and gene expression of methanotrophs in the rice rhizosphere. *ISME J*. 4: 1545-1556.
- Silva NS, Guzman YS, Dendooven L, Guido ML. 2014. Methanogenesis and methanotrophy in soil: a review. *Pedosphere*. 24 (3): 291-307.
- Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Rey DS. 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat Rev Microbiol*. 8 (11): 779-790.



- Singh A, Singh RS, Upadhyay SN, Joshi CG, Tripathi AK, Dubey SK. 2012. Community structure of methanogenic archaea and methane production associated with compost-treated tropical ricefield soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 82 (1): 118–134.
- Sukmawati D, Rusmana I, Mubarik NR. 2015. The effectiveness of methanotrophic bacteria and *Ochrobactrum anthropi* to reduce CH₄ and N₂O emissions and to promote paddy growth in lowland paddy fields. *Mal J Microbiol.* 12 (1): 50-55.
- Sun DL, Jing X, Wu QL, Zhou NY. 2013. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. 79 (19): 5962-5969.
- Sutanto H, Rusmana I, Mubarik NR. 2014. Community succession of methanotrophic bacteria based on *pmoA* gene in rice fields. *Adv Environ Biol.* 8 (14): 50-56.
- Taopan RA, Rusmana I, Santosa DA. 2018. The effect of methanotrophic bacteria application on paddy growth and methane emission in rainfed rice of Kupang regency, East Nusa Tenggara, Indonesia. *Int J Environ Agric Biotech.* 3 (5): 1759-1764.
- Techniques for oral microbiology. 2015. Di dalam: Zhou X, Li Y, editor. *Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease*. Cambridge (US): Academic Press. hlm. 15-40.
- Thauer RK. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson 1998. *Microbiol.* 144: 2377–2406.
- Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 5: 240-245.
- Trabelsi D, Mhamdi R. 2013. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *Biomed Res Int.* 2013: 1-11.
- [USEPA] United States Environmental Protection Agency. 2013. *Global Mitigation of Non-CO₂ Greenhouse Gases: 2010-2030*. Washington DC (US): USEPA.
- Vaksmaa A, van Alen TA, Ettwig KF, Lupotto E, Valè G, Jetten MSM, Lüke M. 2015. Stratification of diversity and activity of methanogenic and methanotrophic microorganisms in a nitrogen-fertilized Italian paddy soil. *Front Microbiol.* 8: 1-15.
- van Bodegom PM, Wassman R, Metra-Corton TM. 2001. A process-based model for methane emission prediction from flooded rice paddies. *Global Biogeochem Cyc.* 15 (1): 247-263.
- van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 30 (9): 418–426.
- van Passel MWJ, Kant R, Palva A, Copeland A, Lucas S, Copeland A, Lapidus A, del Rio TG, Pitluck S, Goltsman E *et al.* 2011. Genome sequence of the Verrucomicrobium *Opitutus terrae* PB90-1, an abundant inhabitant of rice paddy soil ecosystems. *J Bacteriol.* 193 (9): 2367–2368.
- Vasileiadis S, Puglisi E, Arena M, Cappa F, Cocconcelli PS, Trevisan M. 2012. Soil bacterial diversity screening using single 16S rRNA gene V regions coupled

with multi-million read generating sequencing technologies. *PloS One*. 7 (8): 1-15.

- Větrovský T, Baldrian P. 2013. The variability of the 16s rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. 8 (2): 1-10.
- Vissers EW, Bodelier PLE, Muyzer G, Laanbroek HJ. 2009. Anested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S rRNA gene fragments from freshwater samples. *FEMS Microbiol Lett*. 298: 193–198.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 73 (16): 5261-5267.
- Wang G, Watanabe T, Jin J, Liu X, Kimura M, Asakawa S. 2010. Methanogenic archaeal communities in paddy field soils in north-east China as evaluated by PCR-DGGE, sequencing and real-time PCR analyses. *Soil Sci Plant Nutr*. 56: 831-838.
- Wang P, Wei Y, Li T, Li F, Meng J, Zhang CL. 2013. Archaeal diversity and spatial distribution in the surface sediment of the South China Sea. *Geomicrobiol J*. 31 (1): 1-11.
- Wassmann R, Aulakh MS. 2000. The role of rice plants in regulating mechanisms of methane emissions. *Biol Fertil Soils*. 31 (1): 20–29.
- Watanabe A, Takeda T, Kimura M. 1999. Evaluation of origins of CH₄ carbon emitted rice paddies. *J Geo Res*. 104 (D19): 23623–23629.
- Watanabe T, Hosen Y, Agbisit R, Llorca L, Fujita D, Asakawa S, Kimura M. 2010. Changes in community structure and transcriptional activity of methanogenic archaea in a paddy field soil brought about by a water-saving management practice- estimation by PCR-DGGE and qPCR of 16S rDNA and 16Sr RNA. *19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*; 2010 Agustus 1-6; Brisbane, Australia.
- Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. 2006. Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biol Biochem*. 38 (6): 1264-1274.
- Watanabe T, Kimura M, Asakawa S. 2009. Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biol Biochem*. 41 (2): 276–285.
- Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot*. 52: 487–511.
- Wilkins D, Lu XY, Shen Z, Chen J, Lee PKH. 2015. Pyrosequencing of *mcrA* and archaeal 16S rRNA genes reveals diversity and substrate preferences of methanogen communities in anaerobic digesters. *Appl Environ Microbiol*. 81 (2): 604-613.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. 51 (2): 221-271.
- Wu L, Ma K, Li Q, Ke X, Lu Y. 2009. Composition of archaeal community in a paddy field as affected by rice cultivar and N fertilizer. *Microb Ecol*. 58: 819-826.



- Wu Z, Liu Q, Li Z, Cheng W, Sun J, Guo Z, Li Y, Zhou J, Meng D, Li H, Lei P, Yin H. 2018. Environmental factors shaping the diversity of bacterial communities that promote rice production. *BMC Microbiol.* 18 (51): 1-11.
- Yang Y, Wang P, Zeng Z. 2019. Dynamics of bacterial communities in a 30-year fertilized paddy field under different organic–inorganic fertilization strategies. *Agron.* 9 (14): 1-13.
- Yuan J, Yuan Y, Zhua Y, Cao L. 2018. Effects of different fertilizers on methane emissions and methanogenic community structures in paddy rhizosphere soil. *Sci Total Environ.* 627: 770–781.
- Zhang J, Siika-Aho M, Tenkanen M, Viikari L. 2011. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. *Biotechnol Biofuels.* 4 (60): 1-9.
- Zhang X, Wei H, Chen Q, Han X. 2014. The counteractive effects of nitrogen addition and watering on soil bacterial communities in a steppe ecosystem. *Soil Biol Biochem.* 72: 26-34.
- Zhou J, Jiang X, Wei D, Zhao B, Ma M, Chen S, Cao F, Shen D, Guan D, Li J. 2017. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in black soils for two crop seasons in China. *Nat Sci Rep.* 7 (3267): 1-10.
- Zeng J, Liu X, Song L, Lin X, Zhang H, Shen C, Chu H. 2016. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Biol Biochem.* 92: 41-49.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Persentase OTU arkea yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi

Tingkat taksonomi	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
Filum	98.5	98.2	98.3	97.9	97.2	97.0
Kelas	98.5	98.2	98.3	97.9	97.2	97.0
Ordo	74.2	78.2	76.6	71.9	71.0	68.5
Famili	45.3	49.0	46.0	44.6	43.1	39.9
Genus	31.2	38.0	33.6	22.1	18.9	19.3
Spesies	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Lampiran 2 Kelimpahan relatif filum arkea yang dominan pada setiap sampel

Filum	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
Crenarchaeota	76.2	76.9	77.2	72.8	73.0	71.6
Euryarchaeota	22.5	21.7	21.2	24.9	24.3	25.6
Lainnya	1.3	1.4	1.6	2.3	2.7	2.8

Lampiran 3 Kelimpahan relatif kelas arkea yang dominan pada setiap sampel

Kelas	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
MCG	50.4	48.0	50.6	47.4	48.8	50.6
Thaumarchaeota	23.2	28.1	25.6	19.9	19.5	14.8
Thermoplasmata	7.4	9.4	5.2	14.7	15.1	16.5
Methanomicrobia	13.5	11.9	15.4	8.7	7.8	7.5
MBGA	2.2	0.5	0.7	2.9	2.9	3.4
Thermoprotei	0.2	0.1	0.2	2.2	1.6	2.4
Methanobacteria	1.6	0.3	0.5	1.3	1.1	1.4
MBGB	0.1	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3
DSEG	0.0	0.2	0.1	0.3	0.3	0.3
Lainnya	1.4	1.2	1.5	2.2	2.6	2.8

Lampiran 4 Persentase OTU bakteri yang terklasifikasi pada setiap tingkat taksonomi

Tingkat taksonomi	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
Filum	94.1	94.1	94.4	94.6	94.2	94.1
Kelas	93.4	93.0	94.0	93.5	93.5	93.3
Ordo	87.4	84.7	87.7	85.9	86.9	84.9
Famili	47.7	43.9	46.6	45.8	49.2	44.4
Genus	15.7	14.0	14.6	16.5	14.1	16.5
Spesies	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Lampiran 5 Kelimpahan relatif filum bakteri yang dominan pada setiap sampel

Filum	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
Proteobacteria	21.9	23.0	21.5	21.0	23.3	23.1
Acidobacteria	16.4	15.3	14.4	16.4	16.2	15.9
Planctomycetes	17.5	15.8	14.0	13.9	15.9	14.2
Chloroflexi	10.8	10.3	10.2	11.5	9.7	10.7
Bacteroidetes	5.7	10.0	12.7	7.2	6.1	5.0
Nitrospirae	6.3	4.2	6.2	7.0	9.5	10.5
Actinobacteria	7.2	6.1	5.9	6.0	4.0	4.6
Chlorobi	1.8	2.8	2.0	2.8	2.7	2.8
Firmicutes	2.9	1.7	2.0	1.8	1.5	1.9
Verrucomicrobia	1.5	2.2	2.5	1.6	1.2	1.2
Lainnya	8.0	8.7	8.6	10.8	9.9	10.1

Lampiran 6 Kelimpahan relatif kelas bakteri yang dominan pada setiap sampel

Kelas	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
Planctomycetia	13.3	11.6	10.0	9.4	10.9	9.8
Betaproteobacteria	9.2	11.1	9.7	9.2	9.8	9.8
Acidobacteria-6	9.0	8.6	8.2	9.1	8.4	8.6
Nitrospira	6.3	4.2	6.2	7.0	9.5	10.5
Anaerolineae	5.8	6.4	6.5	7.2	6.5	7.5
Deltaproteobacteria	6.1	5.4	5.0	5.8	7.3	7.1
Phycisphaerae	3.6	3.7	3.2	3.5	4.2	3.6
Alphaproteobacteria	4.0	3.7	3.0	3.3	3.3	3.3
Bacteroidia	3.2	3.9	2.6	3.5	2.8	2.0
Gammaproteobacteria	2.6	2.8	3.6	2.7	2.8	2.9
Lainnya	36.9	38.6	42.0	39.3	34.5	34.9

Lampiran 7 Kelimpahan relatif metanogen berdasarkan gen 16S rRNA pada setiap sampel

Takson	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
<i>Methanosarcinaceae</i>	9.1	8.7	13.4	5.0	3.9	3.4
<i>Methanomassiliicoccaceae</i>	4.3	8.8	4.1	3.7	5.7	5.0
<i>Methanosaetaceae</i>	1.4	1.9	1.2	2.4	2.2	2.7
<i>Methanocellaceae</i>	0.7	0.8	0.3	0.3	0.2	0.2
<i>Methanoregulaceae</i>	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	0.3
Unclassified	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
Methanocellales	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0

Lampiran 8 Kelimpahan relatif metanotrof berdasarkan gen 16S rRNA pada setiap sampel

Takson	Kelimpahan relatif (%)					
	0B0	36B0	69B0	0B1	36B1	69B1
<i>Methylocystaceae</i>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
ANME-2D	2.0	0.3	0.2	0.8	1.3	0.9

Lampiran 9 Kelimpahan relatif metanogen berdasarkan gen *mcrA* pada sampel 36B0 dan 36B1

Takson	Kelimpahan relatif (%)	
	36B0	36B1
Uncultured methanogenic archaeon	69.29	42.29
Uncultured archaeon	26.47	52.4
Uncultured Euryarchaeota	0.27	0.41
Uncultured <i>Methanosarcinaceae</i> archaeon	0.00	0.46
Uncultured <i>Methanospirillum</i> sp.	0.05	0.06
Uncultured Methanobacteriales archaeon	0.04	0.05
Uncultured <i>Methanobacteriaceae</i> archaeon	0.04	0.01
Uncultured <i>Methanobacterium</i> sp.	0.02	0.00
Unclassified Methanomicrobiales	0.00	0.04
Lainnya	3.82	4.32

Lampiran 10 Kelimpahan relatif metanotrof berdasarkan gen *pmoA* pada sampel 36B0 dan 36B1

Takson	Kelimpahan relatif (%)	
	36B0	36B1
Uncultured Methanotrophic bacterium	72.370	68.519
Unclassified Gammaproteobacterial methanotrophic bacteria	10.189	14.273
Unclassified <i>Methylococcus</i>	1.018	1.189
Uncultured Proteobacterial methanotroph	0.774	0.565
Unclassified Alphaproteobacterial methanotrophic bacteria	0.448	0.814
Unclassified <i>Methylocystis</i>	0.306	0.373
Unclassified <i>Methylosinus</i>	0.178	0.120
Unclassified <i>Methylocystaceae</i>	0.109	0.064
Unclassified <i>Methylococcaceae</i>	0.093	0.073
<i>Methyloparacoccus murrellii</i>	0.065	0.005
Unclassified <i>Methylocystaceae</i> ; type II methanotrophic bacterium	0.029	0.022
<i>Methylomagnum ishizawai</i>	0.009	0.001
Uncultured <i>Methylocaldum</i> sp.	0.002	0.002
Lainnya	14.419	13.981



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Cianjur, 26 Juli 1992 dari bapak M. Komarudin dan ibu Ai Hayati sebagai anak pertama dari 5 bersaudara. Penulis lulus dari SMA Negeri 1 Sukaresmi, Cianjur pada tahun 2010 dan pada tahun yang sama penulis diterima di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB. Selama masa studi S1, penulis menerima beasiswa Bidikmisi dari Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI), Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia. Penulis menyelesaikan pendidikan S1 pada tahun 2014 sebagai Sarjana Sains (SSi) dengan skripsi berjudul “Kemampuan Bakteri Endofit *Micrococcus endophyticus* G053 dalam Memproduksi IAA-like Compound dan Meningkatkan Pertumbuhan Tanaman”.

Pada tahun 2015, penulis diterima sebagai mahasiswa di Program Studi Mikrobiologi, Sekolah Pascasarjana IPB dengan beasiswa Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) *batch* II dari Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui promotor Dr Ir Iman Rusmana, MSi. Selama masa studi, penulis aktif sebagai asisten praktikum Bioteknologi Mikrob pada tahun 2018 dan 2019. Sebagai salah satu syarat menyelesaikan pendidikan S2, penulis melakukan penelitian tesis dengan judul “Pengaruh Aplikasi Bakteri Metanotrof dan Pereduksi N₂O terhadap Emisi CH₄ dan N₂O, Pertumbuhan Padi, serta Komunitas Bakteri di Lahan Sawah”. Sebagian hasil penelitian tersebut dipresentasikan pada Seminar Nasional Biologi Wallacea 2017 di Universitas Mataram, NTB. Artikel ilmiah penelitian ini dalam status *under review* di HAYATI Journal of Biosciences (terindeks SCOPUS) dengan judul “*Impact of methanotrophic and N₂O-reducing bacteria inoculation on CH₄ and N₂O emissions, paddy growth and bacterial community structure in paddy field*”. Penulis melakukan penelitian Doktor dengan judul “Struktur Komunitas Arkea, Bakteri, Metanogen, dan Metanotrof di Tanah Sawah serta Hubungannya dengan Emisi CH₄”. Penulis telah mempublikasikan sebagian hasil penelitian di Japan-Indonesia Internasional Scientific Conference 2018 di Osaka University, Jepang dengan artikel berjudul “*Bacterial community structure in the paddy soil inoculated with methanotrophic and N₂O-reducing bacteria in Tegal, Indonesia*”. Sebagian hasil penelitian tersebut telah diterbitkan di Biodiversitas Journal of Biological Diversity (terindeks SCOPUS) pada Volume 20 Nomor 12 Tahun 2019 dengan artikel berjudul “*Archaeal and methanogenic communities in the rice field under different fertilizer applications*”. Hasil penelitian dengan artikel berjudul “*Bacterial communities and microbial composition involved in CH₄ emission in the rice fields treated by urea and biofertilizer for CH₄ mitigation*” telah di-*submit* ke Emirates Journal of Food and Agriculture (terindeks SCOPUS).

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang 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 IPBUniversity.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.