

Pembentukan Populasi Mutan *Azospirillum* dengan Menggunakan Transposon untuk Sifat Superior terhadap Pelarutan P

Toto Hadiarto*, Ma'sumah, dan Eny I. Riyanti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: thadiarto@yahoo.com

Diajukan: 27 April 2012; Diterima: 26 Juli 2012

ABSTRACT

Formation of Mutant Population of *Azospirillum* using Transposon for Superior Characteristic of Phosphate Solubilization. Toto Hadiarto, Ma'sumah and Eny I. Riyanti. *Azospirillum* sp. which has the ability for nitrogen fixation and phosphate solubilization may support modern farming in Indonesia that is mostly dependent on the usage of chemical fertilizer N, P, and K. Genetic quality of *Azospirillum* was improved in this research to obtain superior characters toward phosphate solubilization so that it can become more effective in use for farmers. To achieve this goal, *Azospirillum* was mutated by means of electroporation using transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp. The electrotransformation resulted in 20 out of 22 transformants tested contained the marker gen (*npt*). 10, 6 and 4 mutants have increased, decreased and lost phosphate-solubilizing function, respectively. Mutant with elevated phosphate-solubilizing ability may be selected further to be utilized as biofertilizer while others may be useful for identification of genes responsible for phosphate solubilization.

Keywords: *Azospirillum*, P solubilization, transposon.

ABSTRAK

Pembentukan Populasi Mutan *Azospirillum* dengan Menggunakan Transposon untuk Sifat Superior terhadap Pelarutan P. Toto Hadiarto, Ma'sumah, dan Eny I. Riyanti. Penggunaan *Azospirillum* sp yang berfungsi ganda sebagai penambat N dan pelarut P akan sangat membantu pertanian modern di Indonesia yang bergantung pada penggunaan pupuk kimia N, P, dan K. Peningkatan mutu genetik pada *Azospirillum* dilakukan pada penelitian ini dengan tujuan memperoleh sifat superior terhadap pelarutan P sehingga *Azospirillum* menjadi lebih efektif untuk petani. Untuk itu dilakukan mutasi dengan teknik elektroporasi menggunakan transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp. Hasil dari transformasi dan *direct* PCR menunjukkan bahwa dari 22 koloni yang tumbuh pada media seleksi terdapat 20 koloni yang positif mengandung transposon. Dari 20 mutan ini terdapat 10, 6, dan 4 mutan yang memiliki kenaikan, penurunan dan kehilangan kemampuan pelarutan P, secara berurutan. Mutan dengan kemampuan pelarutan P yang tinggi bisa diseleksi lebih lanjut untuk digunakan sebagai pupuk hayati

sedangkan mutan yang kehilangan kemampuan pelarutan P dapat digunakan untuk identifikasi gen pelarut fosfat.

Kata kunci: *Azospirillum*, pelarut P, transposon.

PENDAHULUAN

Pupuk dan pestisida sintesis saat ini sudah menjadi kebutuhan bagi petani sebagai usaha peningkatan produktivitas hasil pertanian. Dalam jangka panjang, peningkatan produktivitas hanya berbasis aplikasi kedua jenis bahan kimia tersebut akan mengakibatkan efek negatif pada kesuburan tanah dan ekosistem.

Salah satu cara untuk mengurangi dampak negatif penggunaan pupuk dan pestisida sintesis terhadap lingkungan adalah dengan penggunaan pupuk hayati yang terdiri dari bermacam-macam mikroba termasuk mikroba tanah. Ketersediaan mikroba tanah di Indonesia yang beraneka ragam akan dapat membantu penggunaan pupuk yang ramah lingkungan.

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) merupakan kelompok bakteri yang hidup di daerah rizosfer dan memiliki kemampuan meningkatkan pertumbuhan tanaman (Fibach-Paldi *et al.*, 2012). Salah satu anggota dari kelompok PGPR adalah bakteri non simbiosis *Azospirillum* (Rodriguez dan Fraga, 1999). Bakteri ini mampu menghasilkan beberapa jenis fitohormon dan membantu penyerapan beberapa mineral penting untuk pertumbuhan tanaman (Dobbelaere *et al.*, 2001). Studi tentang aplikasi *Azospirillum* sp. pada beberapa jenis tanaman mengindikasikan bahwa bakteri ini dapat meningkatkan pertumbuhan dan hasil (Barassi *et al.*, 2007; Kochar dan Srivastava, 2012; Zawoznik *et al.*, 2011; Fasciglione *et al.*, 2012).

Kemampuan bakteri penyubur tanah ini dalam melarutkan fosfat belum banyak dikerjakan. Padahal unsur fosfat dalam tanah merupakan salah satu mineral penting dalam pertumbuhan tanaman. Secara umum, mekanisme pelarutan fosfat oleh bakteri pelarutnya berhubungan dengan dilepasnya asam organik dengan berat molekul rendah yang memiliki gugus hidroksil dan karboksil. Gugus-gugus inilah yang me-

nambatkan kation pada fosfat sehingga fosfat berubah menjadi bentuk yang dapat larut sehingga dapat diserap oleh tanaman (Chen *et al.*, 2006).

Penelitian beberapa isolat *Azospirillum* dalam melarutkan fosfat dan menambat N telah diteliti sebelumnya (Riyanti *et al.*, 2012). Dari 89 isolat yang menjadi obyek penelitian, *Azospirillum* Aj Bandung 6.4.1.2 merupakan salah satu isolat yang memiliki kemampuan melarutkan P yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat-isolat lainnya. Studi ini dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mengidentifikasi gen-gen yang terlibat dalam kemampuan pelarutan P serta usaha perbaikan sifat genetika dari strain ini agar menjadi superior dengan harapan dapat membantu peningkatan hasil produksi pertanian.

Salah satu teknik perbaikan sifat genetika bakteri adalah dengan mutasi gen. Mutasi gen dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti iradiasi, kimia, dan manipulasi genetik. Manipulasi genetik dapat dilakukan dengan melakukan *point mutation*, *overexpression* atau *gene knockout*. Dua teknik pertama hanya dapat dilakukan apabila gen-gen terkait sudah teridentifikasi, sedangkan teknik *gene knockout* dapat dilakukan tanpa mengetahui gen terkait (mutasi secara acak). Selain itu, teknik ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi gen-gen terkait dengan sifat yang diharapkan.

Pada penelitian ini dilakukan mutasi genetik dengan menggunakan transposon. Teknik ini merupakan bagian dari *gene knockout*. Dengan menyisipkan transposon ke dalam kromosom bakteri, ekspresi satu atau beberapa gen akan terpengaruhi. Sehingga, bila transposon tersisipkan pada bagian promotor dari sebuah gen, ekspresi gen tersebut dapat meningkat atau menurun, sedangkan bila transposon menyisip di dalam *open reading frame* (ORF) sebuah gen maka gen tersebut akan terganggu fungsinya. Dengan mengetahui urutan yang ada di transposon, fragmen DNA yang disisipi tersebut dapat disekuen untuk mengetahui urutan dan fungsinya. Transposon yang digunakan pada penelitian ini adalah transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp yang terdapat dalam sistem transposome (kompleks yang terbentuk dari Ez-Tn5 transposon dengan EZ-Tn5 transposase), yang dapat digunakan untuk menghasilkan pustaka secara random dari bakteri secara *in vivo* (Goryshin *et al.*, 2000).

Dibandingkan dengan sistem transposon yang berada dalam plasmid yang sering dimanfaatkan pada kegiatan transformasi untuk *gene knockout*, transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp memiliki beberapa kelebihan. Gen resistensi kanamisin (*kanR*) yang terdapat dalam transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp berada pada posisi yang diapit oleh sekuen *mosaic end* yang menjadi ciri

transposon Tn5. Hal ini berarti bahwa primer gen *kanR* dapat dimanfaatkan untuk memastikan bahwa transposon telah menyisip pada DNA genom bakteri. Selain itu, bila DNA genom bakteri dipotong pada situs yang tidak memotong transposon dan dilanjutkan dengan ligasi sendiri (*self ligation*), maka urutan DNA genom yang berada pada posisi kiri dan kanan dari transposon dapat diidentifikasi.

Transposon dapat dimasukkan ke dalam berbagai macam sel bakteri dengan cara mengelektroporasi sistem transposome. Transposase yang masuk ke dalam akan menjadi aktif dengan adanya Mg^{2+} dalam sel bakteri, dan selanjutnya transposase akan menyisipkan transposon ke DNA genom dari bakteri secara acak. Hasil dari transformasi diseleksi dengan menggunakan marker yang dibawa oleh transposon tersebut seperti gen resistensi kanamisin (*kanR*). Transposon tersebut akan menyisip pada suatu tempat tertentu pada genom DNA bakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah membentuk populasi mutan *Azospirillum* dengan menggunakan transposon dengan harapan bahwa beberapa mutan akan memiliki sifat superior dalam kemampuan melarutkan P sehingga dapat bermanfaat dalam peningkatan produksi pertanian.

BAHAN DAN METODE

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah *Azospirillum* Aj Bandung strain 6.4.1.2, transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp, media okon (Okon *et al.*, 1977) yang terdiri dari 6 g K_2HPO_4 , 4 g KH_2PO_4 , 5 g DL-malic acid, 3 g NaOH, 0,5 g *yeast extract*, 5 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2%, 5 ml NaCl 1%, 5 ml $CaCl_2$ 0,2%, 5 ml $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,17%, 5 ml $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,02%, pH 6,8 (dan 20 g bacto agar untuk media padat) dalam 1 l media dan pikovskaya (Rao dan Shina, 1963) yang terdiri dari 10 g glukosa, 5 g $Ca_5(PO_4)_3OH$, 0,2 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,5 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,5 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g *yeast extract*, 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$, pH 6,8 dan 15 g bacto agar dalam 1 l media.

Azospirillum dari sel tunggal diinokulasi pada media okon cair dan dibiakkan pada suhu ruang dengan *shaker* pada kecepatan 125 rpm selama 24 jam. Kultur kemudian diinkubasi pada es selama 30 menit. Sel *Azospirillum* diendapkan dengan cara disentrifugasi pada tabung mikro steril pada kecepatan 10.000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Sel kemudian dicuci dengan air atau air yang mengandung 10% gliserol sebanyak 3 kali, kemudian ditambahkan transposon dan dielektroporasi dengan voltase 1,5; 3; 8; atau 15 V/cm. Sel kemudian langsung diinkubasi pada es selama 15 menit, kemudian ditanam pada media okon padat yang mengandung antibiotik kanamisin 50 µg/ml. Dari sini akan diperoleh pencuci (air atau air yang mengan-

dung gliserol) dan voltase yang optimum. Selanjutnya, elektroporasi diulang dengan menggunakan kondisi yang sudah optimum, dan diikuti dengan *direct* PCR. *Direct* PCR dilakukan untuk konfirmasi bahwa koloni yang tumbuh mengandung transposon, dengan menggunakan primer gen *kanR* yang terdapat dalam transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp.

Untuk mengetahui kemampuan melarutkan P, *Azospirillum* hasil dari transformasi ditumbuhkan pada media Pikovskaya. Bakteri akan menghasilkan zona bening yang menunjukkan kemampuannya melarutkan P. Penentuan kemampuan sel bakteri dalam melarutkan P diukur dengan membandingkan zona bening yang ada di sekeliling koloni dan dibandingkan dengan diameter koloni, atau disebut dengan Indeks Pelarutan (IP) P.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Metode Elektroporasi

Keberhasilan proses elektroporasi tergantung pada beberapa hal, seperti kemurnian DNA yang akan dimasukkan ke dalam sel, kemurnian sel inang dari kandungan garam yang ada dalam larutan, serta besarnya kejutan listrik yang diberikan kepada sel. DNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah transposon yang ada dalam campuran sistem transposome. Sesuai dengan informasi dalam kit yang digunakan, sistem transposome ini disuplai dalam bufer yang mengandung 50% gliserol, Tris-HCl, EDTA, Triton X-100, dan dithiothreitol yang konduktif untuk elektroporasi. Sehingga, yang perlu dipertimbangkan dalam proses elektroporasi ini adalah kemurnian sel inang dari kandungan garam yang ada dalam larutan dan besarnya kejutan listrik.

Gambar 1 menunjukkan pengaruh dari pencucian dengan menggunakan air atau air yang mengandung 10% gliserol, dan besarnya kejutan listrik untuk elektroporasi.

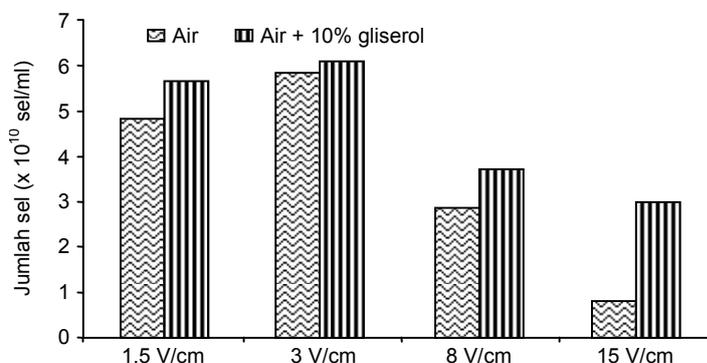
Pada tiap-tiap voltase yang diberikan kepada sel, pencucian dengan air yang mengandung 10% gliserol memberikan viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan pencucian dengan menggunakan air saja. Selain itu, koloni yang tumbuh setelah perlakuan elektroporasi dengan voltase 3 V/cm lebih tinggi dibandingkan dengan voltase lainnya (1, 5, 8, dan 15 V/cm). Sehingga, pencucian dengan air yang mengandung 10% gliserol dan voltase 3 V/cm merupakan kondisi yang optimum untuk elektroporasi sel *Azospirillum* Aj 6.4.1.2. Dalam studi yang dilakukan oleh Sharma dan Schimke (1996), gliserol dapat meningkatkan viabilitas sel setelah transformasi dengan teknik elektroporasi.

Pembentukan Populasi Mutan *Azospirillum*

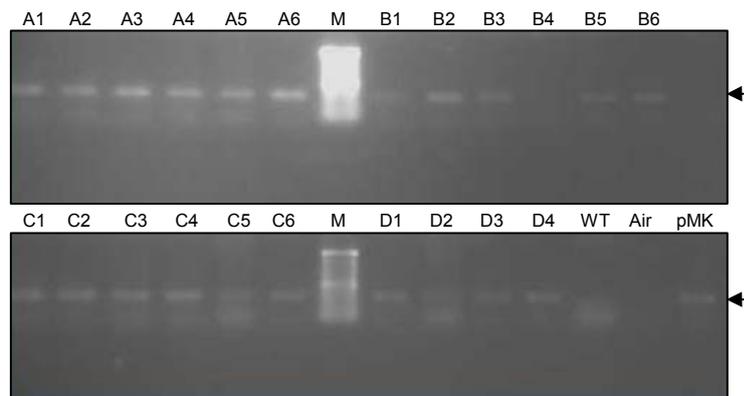
Direct PCR yang dilakukan pada 22 koloni yang tumbuh pada media okon hasil dari elektroporasi dimaksudkan untuk melihat keberadaan fragmen DNA yang ditransformasi ke dalam *Azospirillum*. *Direct* PCR dilakukan dengan menggunakan primer resisten kanamisin karena fragmen DNA yang ditransformasi mengandung gen resisten kanamisin yang digunakan dalam seleksi koloni. Hasil dari *direct* PCR pada 22 sampel dan 3 kontrol dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil dari PCR menunjukkan bahwa kontrol pada PCR ini bekerja dengan baik karena kontrol negatif, yaitu *Azospirillum* strain 6.4.1.2 yang tidak ditransformasi dan air tidak menghasilkan fragmen, sedangkan kontrol positif, yaitu plasmid yang mengandung kanamisin menghasilkan fragmen DNA. Hasil PCR menunjukkan bahwa 20 sampel positif mengandung fragmen kanamisin dari transposon, kecuali sampel B4 dan D2 (tidak menghasilkan fragmen, yang artinya kedua sampel tersebut tidak termutasi).

Persentase keberhasilan transformasi yang cukup tinggi ini menunjukkan bahwa metode transformasi yang digunakan sudah optimum. Kondisi optimum yang digunakan adalah elektroporasi pada tegangan 3



Gambar 1. Pengaruh larutan pencuci dan voltase terhadap viabilitas sel *Azospirillum* Aj 6.4.1.2.



Gambar 2. *Direct* PCR dengan primer gen *kanR* pada koloni hasil transformasi dengan transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp. M = marker DNA, A1-D4 = transforman, WT = *Azospirillum* Aj Bandung 6.4.1.2 (tetua), air = tanpa sampel, pMK = plasmid pMK 18 yang mengandung gen *kanR*. Anak panah menunjukkan posisi pita DNA hasil amplifikasi PCR dengan ukuran sekitar 400 bp.

V/cm dan pencucian dengan menggunakan air yang mengandung 10% gliserol.

Dua sampel yang tidak mengandung transposon adalah sampel B4 dan D2. Artinya, sampel tersebut tidak memiliki gen *kanR* yang ada pada transposon, sehingga secara teori, sampel tersebut tidak dapat tumbuh pada media seleksi yang mengandung kanamisin. Sampel B4 dan D2 dapat tumbuh pada media seleksi karena beberapa kemungkinan. Yang pertama adalah adanya gen resistensi kanamisin yang berbeda dari gen *kanR* yang terdapat dalam transposon. Tenover dan Elvrum (1988) mendeteksi adanya dua gen resistensi kanamisin yang berbeda secara alami pada isolat *Campylobacter jejuni* dan *Campylobacter coli*. Kemungkinan ini sebenarnya dapat menyebabkan proses seleksi yang lebih rumit, karena sel bakteri yang tumbuh pada media seleksi belum tentu transforman. Namun, kondisi yang sudah optimum pada elektroporasi ini dapat meminimalisir kemungkinan tersebut. Kemungkinan yang kedua adalah adanya *escape* atau *false positive* yang kadang terjadi pada sebuah eksperimen. Namun, kemungkinan ini jarang terjadi.

Hasil dari *direct* PCR merupakan hasil molekuler yang menunjukkan keberadaan fragmen DNA yang ditransformasi. Namun, secara morfologi, kemampuan sel bakteri *Azospirillum* dalam melarutkan P dapat diamati dengan melihat zona bening di sekitar koloni yang ditumbuhkan pada media Pikovskaya. Pertumbuhan dan zona bening sekeliling koloni mutan yang ditumbuhkan pada media Pikovskaya disajikan pada Tabel 1 sedangkan gambarnya dapat dilihat pada Gambar 3. Penentuan kemampuan sel bakteri dalam melarutkan P diukur dengan perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni (IP) menunjukkan kemampuan sel bakteri dalam melarutkan P. Semakin tinggi nilai IP berarti semakin efisien

sel bakteri melarutkan P. Dari pengamatan ini dapat diketahui bahwa IP dari sel bakteri tetua (strain 6.4.1.2 atau sampel D5) adalah 2. Tabel 1 menunjukkan bahwa ada beberapa mutan hasil transformasi *Azospirillum* (A3, B1, B2, C1-C5, D3, dan D4) yang memiliki nilai IP lebih besar dari tetuanya. Hal ini berarti bahwa mutan-mutan ini memiliki kemampuan melarutkan P lebih baik daripada tetuanya. Sebaliknya, ada juga beberapa mutan yang memiliki kemampuan melarutkan P di bawah kemampuan tetuanya. Hal ini menunjukkan bahwa transformasi yang terjadi telah menurunkan kemampuan mutan tersebut dalam hal pelarutan P.

Pengaruh terhadap pelarutan P melalui transformasi transposon ini kemungkinan disebabkan oleh perubahan genetik pada strain yang ditransformasi. Genom dari strain tersebut mengalami perubahan pada gen-gen yang berhubungan dengan pelarutan P. Gen-gen yang berpengaruh dalam pelarutan P belum banyak teridentifikasi. Beberapa gen yang telah diidentifikasi berpengaruh dalam pelarutan P antara lain gen *gabY* yang mengkode protein membran dan memiliki daerah periplasmik dan sitoplasmik (Babu-Khan *et al.*, 1995) dan gen *ipdC* yang mengkode protein indole-3-pyruvate decarboxylase (Barassi *et al.*, 2007). Kemungkinan terjadi kenaikan atau penurunan ekspresi dari gen-gen tersebut. Bila ekspresi gen meningkat, maka kemampuan melarutkan P juga lebih baik dan sebaliknya. Peningkatan ekspresi gen-gen pelarut P ini terjadi paling tinggi pada sampel D3 yang memiliki nilai IP yang paling tinggi. Peningkatan ekspresi biasanya terjadi karena penyisipan fragmen DNA terjadi pada daerah di sekitar promotor dan bukan pada gennya. Penyisipan fragmen DNA pada daerah promotor dapat meningkatkan ikatan antara faktor transkripsi dan promotor (Gong *et al.*, 2010; Nijhawan *et al.*, 2008). Namun tidak tertutup kemungkinan terjadinya mutasi

pada gen-gen yang berperan dalam penekanan fungsi pelarutan P.

Sebaliknya, mutan seperti A1, A2, dan A4 mengalami penurunan kemampuan melarutkan P. Sedangkan mutan A6, B3, B5, dan B6 kehilangan kemampuan

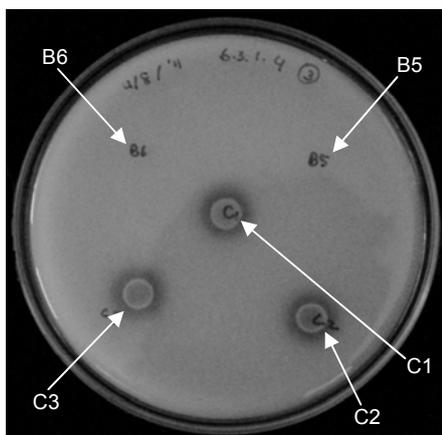
pelarutan P (IP tidak terdeteksi). Hal ini bisa terjadi karena beberapa hal. Yang pertama adalah kemungkinan menyisipnya transposon di dalam gen yang mempengaruhi pelarutan P (gen fungsional yang mengendalikan pelarutan P). Sehingga protein yang dikode

Tabel 1. Hasil pengamatan zona bening dan koloni bakteri hasil transformasi dengan transposon EZ-Tn5<kan-2>Tnp.

| Sampel | Zona bening | Diameter koloni | IP |
|--------|-------------|-----------------|-----|
| A1 | 3 | 2 | 1,5 |
| A2 | 3 | 2 | 1,5 |
| A3 | 17 | 5 | 3,4 |
| A4 | 3 | 2 | 1,5 |
| A5 | 3 | 2 | 1,5 |
| A6 | - | - | - |
| B1 | 18 | 4 | 4,5 |
| B2 | 21 | 4 | 5,3 |
| B3 | - | - | - |
| B4 | 20 | 10 | 2 |
| B5 | - | - | - |
| B6 | - | - | - |
| C1 | 18 | 6 | 3 |
| C2 | 20 | 5 | 4 |
| C3 | 22 | 5 | 4,4 |
| C4 | 23 | 4 | 5,8 |
| C5 | 23 | 6 | 3,8 |
| C6 | 3 | 2 | 1,5 |
| D1 | 3 | 2 | 1,5 |
| D2 | 20 | 9 | 2,2 |
| D3 | 7 | 1 | 7 |
| D4 | 23 | 6 | 3,8 |
| WT | 2 | 1 | 2 |
| Air | - | - | - |

Tabel 2. Kemampuan sampel hasil transformasi dan tetua *Azospirillum* dalam melarutkan P.

| Kelompok | Anggota | Kisaran nilai IP | n | Rataan nilai IP | Standar deviasi |
|----------|------------------------------------|------------------|---|-----------------|-----------------|
| I | A6, B3, B5, B6 | <0,4 | 4 | 0,000 | 0,000 |
| II | A1, A2, A4, A5, B4, C6, D1, D2, WT | 0,4-2,55 | 9 | 1,625 | 0,231 |
| III | A3, B1, C1, C2, C3, C5, D4 | 2,55-4,66 | 7 | 3,783 | 0,522 |
| IV | B2, C4 | 4,66-6,77 | 2 | 5,500 | 0,372 |
| V | D3 | >6,77 | 1 | 7,000 | 0,000 |



Gambar 3. Kemampuan pelarutan P pada beberapa transforman *Azospirillum* hasil dari transformasi dengan transposon pada media Pikovskaya. Sampel B5 dan B6 terlihat kehilangan fungsi melarutkan P, sedangkan sampel lainnya memiliki fungsi tersebut.

oleh gen ini menjadi tidak berfungsi dan kemampuan mutan untuk melarutkan P menjadi menurun atau hilang sama sekali. Kedua, transposon menyisip pada daerah di sekitar promotor gen yang terlibat dalam pelarutan P. Hal ini menyebabkan hilangnya atau berkurangnya ikatan antara faktor transkripsi dan promotor. Kemungkinan ketiga adalah menyisipnya transposon pada gen penyandi faktor transkripsi sehingga faktor transkripsi yang seharusnya membantu ekspresi gen menjadi tidak berfungsi (Nuruzzaman *et al.*, 2010).

Peningkatan atau penurunan pelarutan P yang terjadi pada mutan-mutan *Azospirillum* sangat berguna untuk mengidentifikasi gen-gen yang terlibat dalam proses pelarutan P (Hoffman, 2011). Urutan DNA dari transposon yang digunakan untuk membuat mutan dapat dipakai sebagai dasar untuk mengisolasi gen-gen terkait melalui *gen tagging*. Kromosom DNA pada mutan dipotong dengan salah satu enzim restriksi yang tidak memotong transposon. Fragmen-fragmen DNA ini kemudian dibuat melingkar seperti plasmid dengan ligasi sendiri. Setelah transformasi sel kompeten dengan DNA lingkaran, sel transforman yang memiliki DNA lingkaran yang mengandung transposon dan marker antibiotik akan tumbuh di media seleksi. Urutan DNA kemudian dapat diperoleh melalui sekuensing (Hoffman dan Jendrisak, 2002).

Meskipun zona bening sampel B4 dan D2 jauh lebih besar daripada sampel tetua, ketiga sampel tersebut memiliki IP yang hampir sama. Artinya, mereka memiliki kemampuan melarutkan P yang sebanding. Hal ini dikonfirmasi dari hasil *direct PCR* yang menunjukkan bahwa B4 dan D2 tidak mengandung transposon. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa untuk sampel B4 dan D2, transformasi yang dilakukan tidak mengubah genom tetua.

Selanjutnya, uji statistik dilakukan untuk membuat pengelompokan terhadap mutan-mutan yang telah dihasilkan. Penentuan kelompok didasarkan atas:

$$\hat{Y} - t_{0,3;23} \times s_y \leq \mu < \hat{Y} + t_{0,3;23} \times s_y \quad (\text{Steel dan Torrie, 1993})$$

\hat{Y} = nilai rata-rata populasi

s_y = simpangan baku

μ = nilai tengah

$t_{0,3}$ = nilai t (Fisher dan Yates) dengan nilai kepercayaan 70%

Hasil pengelompokan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa mutan yang mengalami penurunan nilai IP berada dalam satu kelompok dengan kontrol tetua (nilai IP = 2), yang berada dalam kelompok II. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan kemampuan pelarutan P pada mutan-mutan tersebut kemungkinan tidak begitu signifikan. Sehingga untuk mengidentifikasi gen-

gen yang terlibat dalam pelarutan P, lebih disarankan pada penggunaan mutan yang kehilangan kemampuan pelarutan P sama sekali. Pada Tabel 2, mutan yang kehilangan kemampuan pelarutan P berada pada kelompok I (A6, B3, B5, B6).

KESIMPULAN

Telah diperoleh 20 koloni *Azospirillum* yang positif mengandung transposon dengan rincian 10 mutan meningkat, 6 mutan menurun, dan 4 mutan kehilangan kemampuan dalam melarutkan P.

Mutan dengan peningkatan kemampuan melarutkan P dapat diteliti lebih lanjut agar nantinya dapat dimanfaatkan sebagai pupuk hayati. Selain itu, mutan-mutan tersebut perlu juga dievaluasi kemampuan dalam penambatan N, supaya dapat diperoleh mutan yang superior dalam pelarutan P dan penambatan N. Sebagai tambahan, mutan-mutan yang kehilangan kemampuan pelarutan P dapat digunakan untuk studi identifikasi gen-gen pelarut P.

DAFTAR PUSTAKA

- Babu-Khan, S., T.C. Yeo, W.L. Martin, M.R. Duron, R.D. Rogers, and A.H. Goldstein. 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:972-978.
- Barassi, C.A., R.J. Sueldo, C.M. Creus, L.E. Carrozzi, E.M. Casanovas, and M.A. Pereyra. 2007. *Azospirillum* spp., a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. *Dynamic Soil, Dynamic Plant.* p. 68-80.
- Chen, Y.P., P.D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W.A. Lai, and C.C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *App. Soil Ecology* 34:33-41.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborgsh, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanerlyden, P. Dutto, C. Labandera-Gonzalez, J. Caballero-Mellado, J.F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, and Y. Okon. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:871-879.
- Fasciglione, G., E.M. Casanovas, A. Yommi, R.J. Sueldo, and C.A. Barassi. 2012. *Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. *J. Sci. Food Agric.* Doi: 10.1002/jsfa.5661.
- Fibach-Paldi, S., S. Burdman, and Y. Okon. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326:99-108.
- Gong, P., J. Zang, H. Li, C. Yang, C. Zhang, X. Zhang, Z. Khurram, Y. Zhang, T. Wang, Z. Fei, and Z. Ye. 2010. Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and

- biochemical pathways into tomato. *J. Exp. Bot.* 61:3563-3575.
- Goryshin, I.Y., J. Jendrisak, L.M. Hoffman, R. Meis, and W.S. Reznikoff. 2000. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat Biotechnol.* 18:97-100.
- Hoffman, L.M. 2011. Random chromosomal gene disruption *in vivo* using transposomes. *Methods Mol. Biol.* 765:55-70.
- Hoffman, L.M. and J.J. Jendrisak. 2002. Transposomes: a system for identifying genes involved in bacterial pathogenesis. *Methods Enzymol.* 358:128-140.
- Kochar, M. and S. Srivastava. 2012. Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3 acetic acid dependent growth improvement of shorgum. *J. Basic Microbiol.* 52:123-131.
- Nijhawan, A., M. Jain, A.K. Tyagi, and J.P. Khurana. 2008. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiol.* 146:333-350.
- Nuruzzaman, M., R. Manimekalai, A.M. Sharoni, K. Satoh, H. Kondoh, H. Ooka, and S. Kikuchi. 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465:30-44.
- Okon, Y., S.L. Albrecht, and R.H. Burris. 1977. Methods for growing spirillum lipoferum and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:85-88.
- Rao, S., W.V.B. and M.K. Sinha. 1963. Phosphate dissolving organisms in soil and rhizosphere. *Indian J. Agric. Sci.* 33:272-278.
- Riyanti, E.I., D.N. Susilowati, dan B.A. Husain. 2012. Monitoring pelarutan P oleh isolat baru *Azospirillum*. *IJAS.* (submitted).
- Rodriguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339.
- Sharma, R.C. and R.T. Schimke. 1996. Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20:42-44.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik. PT. Gramedia Pustaka Utama. hlm. 76-82.
- Tenover, F.C. and P.M. Elvrum. 1988. Detection of two different kanamycin resistance genes in naturally occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy* 32:1170-1173.
- Zawoznik, M.S., M. Ameneiros, M.P. Benavides, S. Vazquez, and M.D. Groppa. 2011. Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1389-1397.
-