

**PENELITIAN BIOTEKNOLOGI REKAYASA GENETIKA DAN
PENDAYAGUNAAN PLASMA NUTFAH (TU 01.03)**

(STUDI GENETIKA RHIZOBIUM)

**Satya Nugroho, Titik K. Prana, Sukma Nuswantara
dan Eddy Jusuf**

Abstrak

Penelitian untuk melihat keragaman genetika *Rhizobium*, melihat hubungan antara *Rhizobium* dengan pohon inangnya dan meningkatkan daya saing *Rhizobium* dengan transformasi telah dan sedang dilaksanakan. Beberapa galur *Rhizobium* yang telah diisolasi dari bintil akar *Paraserianthes falcataria* dan *Acasia mangium* telah digunakan dalam penelitian ini. Penentuan keragaman genetika *Rhizobium* dilakukan dengan melihat adanya polimorfisme DNA, pada DNA genomik yang telah diamplifikasi oleh dua buah primer acak tunggal dengan menggunakan polymerase chain reaction (PCR). Variasi fragmen DNA yang teramplifikasi ditunjukkan dari pemisahan elektroforesis gel agarose 1,4% dengan ukuran fragmen yang terdeteksi antara 0,5 sampai 6,0 kilobasa. Empat macam flavonoid (naringenin, umbeliferon, hesperitin dan biochanin) telah dicobakan pada *Rhizobium* lokal. Metabolit Nod yang telah diisolasi baik dari media maupun sel bakteri kemudian dicobakan pada kecambah *P. falcataria*. Dari pengamatan perkembangan akar kecambah dapat disimpulkan hubungan antara flavonoid, *Rhizobium* dan pohon inangnya. Transformasi dengan konjugasi dilakukan pada 3 *Rhizobium* strain lokal dengan *Eschericia coli* S17-1 pembawa plasmid pSUP1011, pSUP5011, pSUP2021 dan pSUP10141 yang memiliki transposon Tn5. Dari 148 transconjugant yang diperoleh pada medium seleksi, pada transfer terakhir dalam membran polystyrene diperoleh 6 konjugan yang berasal dari isolat no.5 + pSUP2021 dan 2 konjugan dari isolat no.20+ pSUP5011 yang membawa fenotipe hidrofobisitas.

PENDAHULUAN

Rhizobium merupakan bakteri Gram negatif yang mempunyai kemampuan menambat nitrogen bebas, hidup bersymbiosis dan membentuk bintil pada beberapa akar tumbuhan *Leguminosae* (Agarwal & Keister, 1983). Adanya variasi yang tinggi dalam galur bakteri ini telah lama dipelajari dengan penggolongan berdasarkan karakteristik biokimia, fisiologis dan spesifitas inang. Hal ini dapat ditunjukkan antara lain melalui

pengelompokan berdasarkan resistensiterhadap antibiotika dan komposisi asam lemak (Kuykendall et al, 1988) serta reaksi imunologi terhadap antigen permukaan (surface antigen) untuk menentukan serogroup melalui tehnik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (date & Decker, 1965; Graham, 1969; Sadowsky, et al, 1987). Teknik penandaan menggunakan bakteriofag (*bakteriophage typing*) pada *Rhizobium meliloti* telah dilaporkan oleh Lesley (1982) dengan cara menginfeksi-kan 15 macam bakteriofag spesifik.

Penemuan *polymerase chain reaction* (PCR) (Mullis & Falona, 1987; Saiki et al, 1988) mengarahkan studi karakterisasi tingkat molekuler pada *primer-based technology* yang lebih teliti, sederhana dan cepat. Salah satu teknik sidik jari DNA yang sering digunakan saat ini adalah *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Williams et al, 1991). Kombinasi penggunaan primer-acak dengan PCR ini dinamakan juga *arbitrarily primed PCR* (AP-PCR) (Welsh & McClelland, (1991).

Dalam penelitian ini keragaman genetik dari isolat-isolat *Rhizobium* yang diisolasi dari bintil akar *Paraserianthes falcataria* dianalisa berdasarkan profil pita produk PCR dari reaksi yang menggunakan dua macam primer RAPD.

Bukti-bukti bahwa tumbuhan mengeluarkan semacam molekul-molekul kecil sebagai sinyal untuk mikroba telah diperoleh dengan ditemukannya zat-zat phenolic dan flavonoid yang menginduksi transkripsi gen *vir* di *Agrobacterium* (Stachel et al, 1985) maupun gen *nod* di *Rhizobium* (Peters et al, 1986; Redmond et al, 1986) dan *Bradyrhizobium* (Kosslak et al, 1987) spp. Ditemukannya bintil pada akar pada legum menunjukkan bahwa telah terjadi interaksi antara bakteri tanah (Rhizobia) dengan legum.

Interaksi antara legum dengan Rhizobia (dalam hal ini *Rhizobium*) dapat terjadi hanya apabila legum mengeluarkan zat kimia (flavonoid) yang dapat diterima oleh transcriptional activator protein yang dihasilkan oleh gen *nodD* dari

Rhizobium. Interaksi antara flavonoid dengan protein yang dihasilkan oleh *nodD* gen (NodD protein) menginduksi ekspresi dari sekumpulan *nod* gen (*nod* box) yang akan memproduksi beberapa lipo-oligosakarida yang saling berhubungan yang juga disebut metabolit Nod (Spaink, 1992; Innes et al, 1985; Mulligan et al, 1985; Rossen et al, 1985; Shearman et al, 1986). Metabolit Nod ini selain mempunyai fungsi sebagai sinyal dari Rhizobium kepada tumbuhan (Gottfert, 1992) juga berperan dalam proses infeksi tumbuhan oleh Rhizobium dan dalam pembentukan bintil pada akar (Spaink, 1992).

Metabolit Nod ini memicu tanda-tanda pertama mulai terjadinya simbiosis, yaitu pengeritingan pada akar (Gottfert, 1992). Dalam penelitian ini beberapa flavonoid dicobakan pada beberapa strain Rhizobium yang telah diisolasi dari bintil akar *P. falcataria* dan dilihat apakah metabolit yang dihasilkan berperan sebagai pemicu terjadinya bintil pada akar.

Selain faktor kimiawi, keberhasilan suatu strain Rhizobium dalam menginfeksi akar tanaman juga dipengaruhi oleh sifat Rhizobium tersebut untuk berkompetisi dengan strain-strain lain yang telah ada didalam tanah (competitive nodulation ability = CNA). Walaupun suatu strain Rhizobium mempunyai kemampuan mengikat nitrogen tinggi tetapi ber-CNA rendah, strain tersebut tidak akan mampu bersaing dengan strain lain yang memiliki kemampuan fiksasi nitrogen lebih rendah namun ber-CNA tinggi (Ozawa et al, 1992). Baghawat et al (1991) mengemukakan bahwa pada umumnya strain indigen lebih kompetitif dibandingkan dengan strain yang dinokulasikan.

Ozawa et al (1991) mengamati bahwa tingkat hidrofobisitas permukaan sel pada *Bradyrhizobium japonicum* sangat berperan dalam CNA. Hal ini didukung dengan bukti bahwa tingkat hidrofobisitas mempunyai peran yang sangat penting pada adhesi sel bakteri pada permukaan padat (Marshall, 1985). Tingkat hidrofobisitas suatu strain dapat dinaikan

dengan cara menyisipkan serangkaian basa yang dibawa oleh transposon Tn5. Pada *B. japonicum* hal ini telah berhasil dilakukan (Ozawa et al, 1991), namun pada strain *Rhizobium* lain terutama biak lokal yang berasosiasi dengan legum pohon seperti *Paraserianthes falcataria* dan *Acasia mangium* belum pernah dilaporkan.

Pada penelitian ini telah dilakukan transformasi plasmid pSUP2021 dan pSUP5011 yang mengandung transposon Tn5 (Simon et al, 1983) kedalam 3 strain *Rhizobium* lokal dengan cara konjugasi. Sebagai donor digunakan strain *E. coli* S17-1 yang diketahui resisten terhadap antibiotika neomisin sampai kepekatan 140 ug/ml. Sedangkan strain-strain lokal yang digunakan sebagai resipien diketahui resisten terhadap streptomisin sampai dengan 150 ug/ml (strain no.5), tetrasiklin 100 ug/ml (strain no.1) dan tetrasiklin 50 Ug/Ml (strain no.20).

BAHAN DAN CARA KERJA

Isolat bakteri

Semua isolat bakteri *Rhizobium* yang dipergunakan adalah merupakan koleksi yang ada di Puslitbang Bioteknologi-LIPI. Galur-galur tersebut telah diisolasi dari bintil akar tanaman *Paraserianthes falcataria* yang berasal dari daerah Medan, Cibinong, Parungkuda (Sukabumi) dan Bandung Selatan dan *Acasia mangium* yang berasal dari Medan. Juga digunakan biak-biak lain sebagai "helper" antara lain *E. coli* S17-1 yang mengandung plasmid pSUP 2021 dan plasmid pSUP 5011 membawa Tn5. Sebagai pembanding digunakan galur-galur yang telah diidentifikasi. (lihat Tabel 1.)

Tabel 1 Bakteri yang digunakan dalam penelitian keanekaragaman genetik.

Nama bakteri	Asal/referensi
1. Rhizobium ANU845.032	Australia, Djordjevic, 1993; KP
2. Rhizobium AS-1	Bogor, Karsono, 1994; KP
3. Rhizobium AS-2	Bogor, Karsono, 1994; KP
4. R. leguminosarum KL	Hiroshima University Murooka, 1994; KP
5. R. leguminosarum KLL1	Hiroshima University Murooka, 1994; KP
6. R. trifolii	Hiroshima University Murooka, 1994; KP
7. Agrobacterium tumifaciens	Hiroshima University Murooka, 1994; KP
8. Rhizobium PFCB I.1.1	Cibinong, Prana, 1994; KP
9. Rhizobium PFCB I.1.2	Cibinong, Prana, 1994; KP
10. Rhizobium PFCB I.1.5	Cibinong, Prana, 1994; KP
11. Rhizobium PFCB I.3.2	Cibinong, Prana, 1994; KP
12. Rhizobium CB1	Cibinong, Prana, 1994; KP
13. Rhizobium 1.3.2	Bandung Selatan Prana, 1994; KP
14. Rhizobium PK3	Parungkuda, Sukabumi Prana, 1994
15. Eschericia coli S17-1	University of Bielefeld W. Arnold, 1994

Bahan kimia dan medium

Bakteri *Rhizobium* maupun *Bradyrhizobium* ditumbuhkan dalam medium YMA (Yeast Manitol) dan medium TY untuk strain lain.

1. Penelitian keanekaragaman genetika *Rhizobium*

Isolasi DNA genomik

Seluruh strain ditumbuhkan dalam medium TY cair pH 7.0 (Beringer, 1974), dikocok dalam shaker pada suhu 28 C, 200 RPM. Isolasi DNA dilakukan menurut metoda Marmur (1961) yang dimodifikasi oleh Murooka (1994, komunikasi pribadi). DNA yang diperoleh dilarutkan dalam buffer TE (pH 7.56). Konsentrasi DNA dan kemurniannya diukur dengan spektrofotometer (Shimadzu UV-160) pada A260 nm dan A280 nm.

Primer

Dua buah primer tunggal, OPH-04 dan OPH-05 (Operon Technology Inc., Alameda, CA, USA yang disintesis kembali oleh Sawady Technology, Tokyo, Japan) masing-masing terdiri dari 10 oligonukleotida digunakan untuk amplifikasi DNA. Primer disiapkan dalam buffer TE. Setiap reaksi menggunakan sebuah primer. Urutan basa primer tersebut diatas adalah sbb :

OPH-04 : 5' -GGAAGTCGCC- 3'

OPH-05 : 5' -AGTCGTCCCC- 3'

Kondisi PCR

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan FTS-90 Thermal Sequencer (Corbet Research, Sidney, Australia). Volume setiap reaksi adalah 50 uL dengan komposisi sebagai berikut : DNA-template 25 ng, *Taq*-DNA Polymerase (AmplitagTM, Perkin Elmer Cetus, USA) 1 unit, dNTP 1,25 mL, primer 50 pmol, buffer PCR (AmplitagTM, Perkin Elmer Cetus, USA) 1 x konsentrasi. Volume disesuaikan menjadi 50uL dengan menggunakan air bebas-ion (Milli-Q). Sebagai kontrol digunakan campuran yang sama tetapi tanpa DNA-template untuk melihat adanya kontaminasi DNA. Kondisi pertukaran suhu PCR yang digunakan berdasarkan Williams et al (1990) adalah sebagai berikut : denaturasi (94°C, 1 menit), annealing (36°C, 1

menit) dan perpanjangan primer (72°C, 2 menit). Reaksi dilakukan sebanyak 45 siklus. Reaksi diakhiri dengan penambahan satu siklus akhir (4°C) untuk penyimpanan produk PCR.

Analisa produk PCR

Produk PCR dianalisa pada 1,4% gel agarose (Boehringer Mannheim GmbH, Jerman) yang mengandung 0.5ug/mL ethidium bromida, setelah ditambah loading buffer (Bromophenol Blue 0,2%, xylene cyanol FF 0,25%, glycerol 30%). Elektroforesis dilakukan selama 2 jam pada arus sebesar 150 mA. Buffer elektroforesis yang dipergunakan adalah TBE. Panjang fragmen diukur dengan penanda DNA (*Lambda HindIII/EcoRI*).

2. Penelitian induksi flavonoid terhadap produksi metabolit Nod

Isolasi metabolit Nod

Empat galur *Rhizobium* yang terdiri dari 3 strain lokal dan 1 strain dari Australia di gunakan dalam penelitian ini. Strain-strain tersebut diremajakan di 100mL media TY dalam gelas Erlenmeyer, dikocok dalam shaker pada suhu 28°C dengan kecepatan 200 putaran permenit. Strain yang telah diremajakan kemudian ditumbuhkan di dalam 4 buah tabung reaksi yang berisi 2mL media cair BIII yangtelah ditambah dengan 4 macam flavonoid yang berbeda, yaitu : naringenin (Sigma), umbelliferon (Sigma), hesperitin (Sigma) dan biochanin (Sigma), dan 1 buah tabung reaksi yang hanya berisi 2mL media cair BIII tanpa tambahan flavonoid sebagai control negatif. Metabolit Nod diisolasi baik dari media maupun sel *Rhizobium* dengan metoda yang digambarkan oleh Yao et al (1968). Metabolit Nod disimpan dalam 100uL WSNB (water saturated N-Butanol). WSNB diuapkan dalam gelas petri steril kemudian ditambah media cair Fahraeus yang masih panas.

Persiapan kecambah *Paraserianthes falcataria*

Biji *P. falcataria* diperoleh dari koleksi biji di Puslitbang Bioteknologi - LIPI. Sterilisasi biji dilakukan dengan cara merendam biji dalam larutan alkohol 70% selama 5 menit dilanjutkan dengan merendam dalam HgCl 0.2% selama 15 menit, kemudian dicuci 5 kali dengan air steril. Biji yang sudah steril kemudian diletakkan pada media padat BIII dan disimpan pada suhu 4° C semalam, kemudian dikecambahkan pada suhu kamar dengan ditutup kertas aluminium.

Pengamatan pengeritingan pada akar

Kecambah kemudian di pindahkan pada media padat Fahraeus yang telah dipersiapkan sebelumnya (6 kecambah tiap gelas petri) dan pengeritingan pada akar diamati. Satu petri hanya berisi media padat Fahraeus digunakan sebagai control. Pengamatan pertumbuhan akar dilakukan setiap hari selama 3 minggu dengan menggunakan mikroskop.

3. Penelitian untuk meningkatkan daya saing *Rhizobium* strain lokal

Studi antibiotika

Strain-strain *Rhizobium* ditumbuhkan di media cair TY yang mengandung antibiotika neomisin, kanamisin, streptomisin, tetrasiklin dan rifampisin dengan konsentrasi yang berbeda-beda antara 0 ug/mL sampai 200 ug/mL. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap ketahanan antibiotik ini dipilih 3 strain yaitu strain no.1, no.5 dan no. 290 sebagai resipien.

Konjugasi

Biak donor dan resipien dalam fase logaritmik ditetaskan pada filter nitroselulosa 0.3 um dalam agar YMA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari. Sel yang tumbuh

pada filter disuspensi dalam H₂O dan dicawakan pada agar YMA yang mengandung antibiotik terpilih diinkubasi 30°C sampai muncul koloni (konjugan yang terjadi). Screening konjugan dilakukan menurut metoda yang dipertelakan Rosenberg (dalam Ozawa 1992) dimana diatas koloni yang terdapat pada medium YMA tersebut ditempatkan polystyrene plate. Koloni yang menempel pada polystyrene plate dicuci dengan air kran. Koloni yang hidrofobik akan tetap berada pada plate, setelah pewarnaan. Untuk memperjelas warna koloni, dilakukan pewarnaan dengan larutan Gentian Violet. Koloni yang diperoleh dipindahkan kedalam medium baru yang mengandung antibiotik yang sesuai.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Keanekaragaman genetik

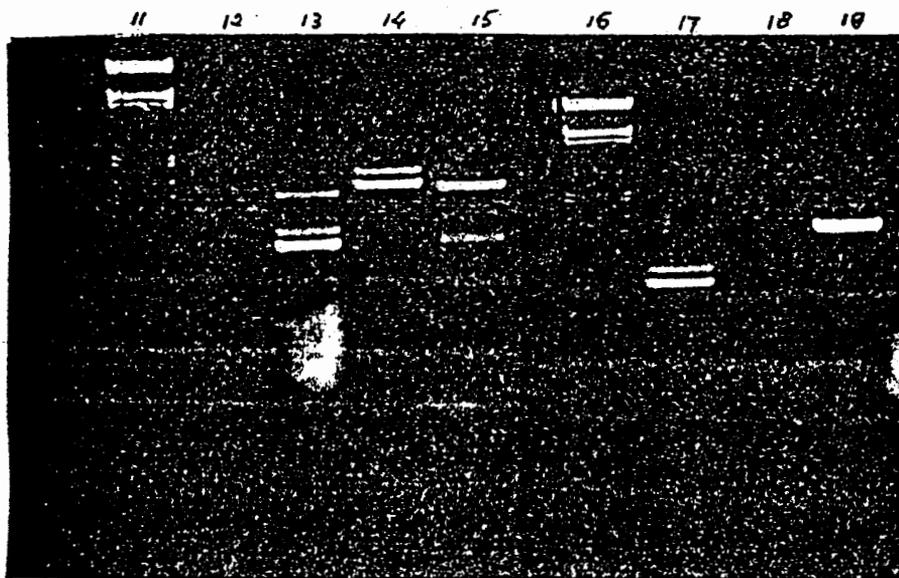
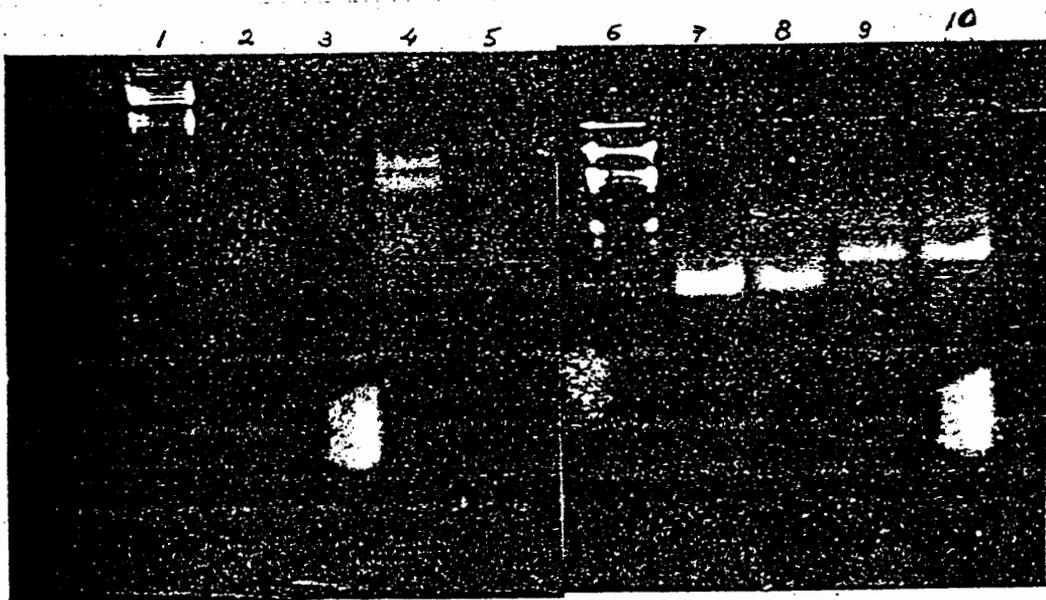
Hasil analisa produk PCR pada gel agarose 1,4% menunjukkan bahwa kedua primer yang dipakai dapat mendeteksi adanya polimorfisme pada DNA kromosom *Rhizobium* asal *P. falcataria*. Terlihat bahwa pola polimorfisme dari masing-masing primer berbeda satu sama lain. Hal ini merupakan indikasi bahwa kedua primer tersebut tidak homolog sehingga produk yang teramplifikasi terletak pada lokus yang berbeda (lihat gambar 1 dan gambar 2).

Untuk melihat bahwa amplifikasi DNA *Rhizobium* yang diarahkan oleh kedua primer tersebut merupakan reaksi yang dapat diulang (*reproducible*), maka reaksi dilakukan dengan 2 kali ulangan. Hasil menunjukkan bahwa kedua produk ulang PCR tersebut menghasilkan pita-pita dengan panjang fragmen yang identik.

Kelebihan dalam penggunaan RAPD adalah dari kesederha-

ambar 1.

Produk PCR menggunakan OPH-04

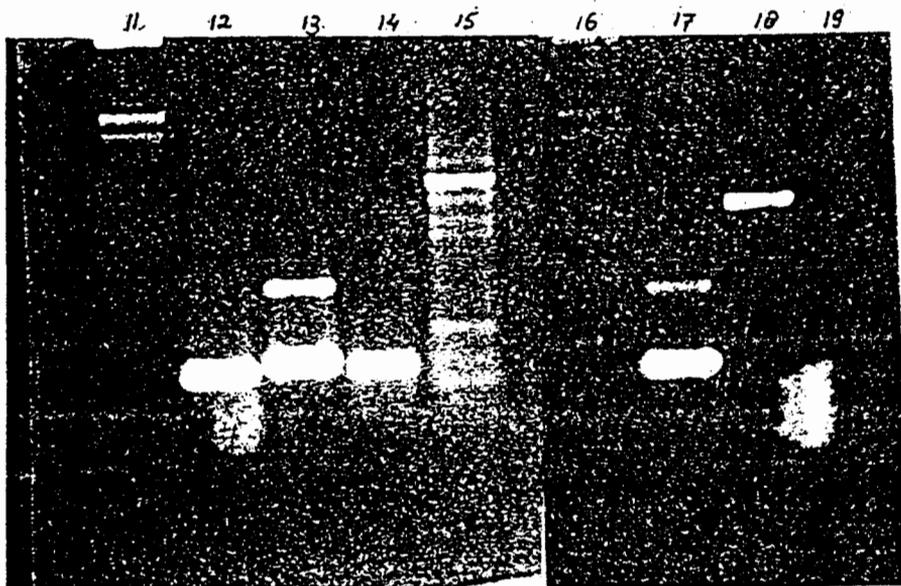
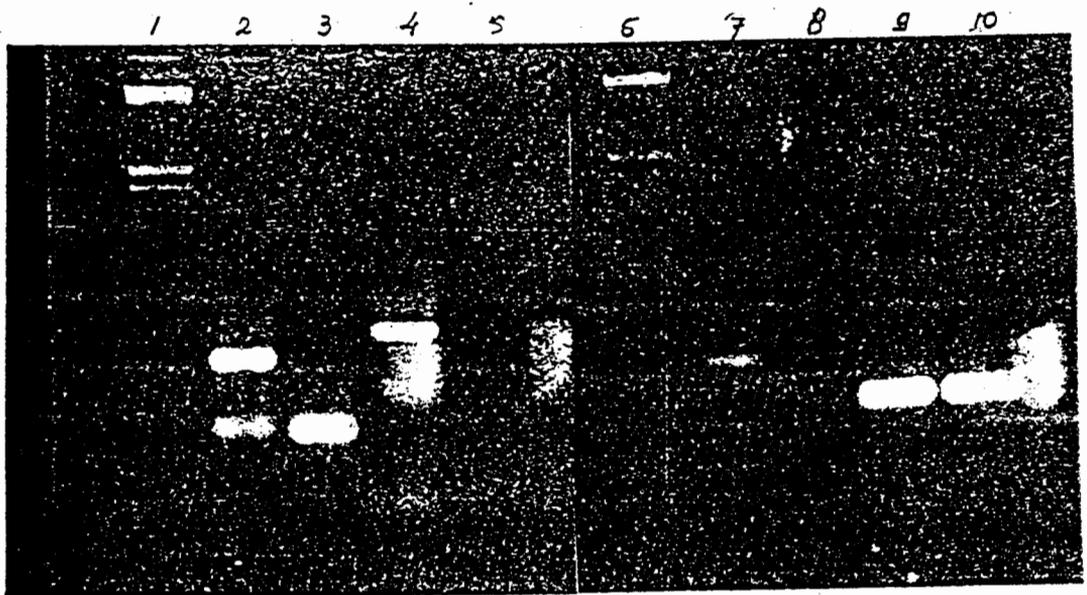


Keterangan :

- | | |
|--|-------------------------------|
| 1. λ DNA | 9. Sample strain AS1 |
| 2. <i>Rhizobium leguminosarum</i> KL | 10. idem AS2 |
| 3. <i>Agrobacterium</i> sp. | 11. λ DNA |
| 4. <i>Rhizobium</i> sp. 845.032 | 12. sample strain PFCB I.1.5. |
| 5. <i>Bradyrhizobium</i> sp. LS07 | 13. idem PFCB I.1.2. |
| 6. λ DNA | 14. idem 1.3.2. |
| 7. <i>Rhizobium leguminosarum</i> KLL1 | 15. idem CB1 |
| 8. <i>Rhizobium trifolii</i> | 16. λ DNA |
| | 17. sample strain PFCB I.1.1. |
| | 18. idem PK3 |
| | 19. idem PFCB I.3.2. |

Gambar 2.

Produk PCR menggunakan OPH-05



Keterangan : s.d.a.

Tabel a Metabolit diisolasi dari media

kecambah yang mengalami pengeritingan akar pada media yang mengandung substrat dari

flavonoid	PFCB I 1.2.	PK6	MG323	ANU845.032
Biochanin	-	5	-	-
Hesperitin	4	-	1	3
Umbeliferon	1	-	-	-
Naringenin	-	-	-	-

Tabel b Metabolit diisolasi dari sel bakteri

kecambah yang mengalami pengeritingan akar pada media yang mengandung substrat dari strain

Flavonoid	PFCB I 1.2.	PK6	MG323	ANU845.032
Biochanin	-	3	-	-
Hesperitin	4	-	1	1
Umbeliferon	-	-	-	-
Naringenin	-	-	-	-

Produksi metabolit Nod dapat dilihat dari adanya reaksi pengeritingan pada akar. Dari hasil tersebut juga dapat ditarik kesimpulan mengenai flavonoid yang mampu berinteraksi dengan protein NodD. Kemungkinan flavonoid yang dipakai dalam penelitian ini atau derivatifnya atau flavonoid lain yang mempunyai struktur kimia mirip dengan flavonoid yang dipakai dalam percobaan ini adalah molekul-molekul kecil yang dikeluarkan oleh akar sebagai sinyal kepada *Rhizobium*. Bukti-bukti yang lebih kuat akan diperoleh apabila kita

dapat mengisolasi flavonoid langsung dari akar atau tanah disekitar akar (*rizosphere*) dan membandingkan strukturnya dengan flavonoid yang telah ada.

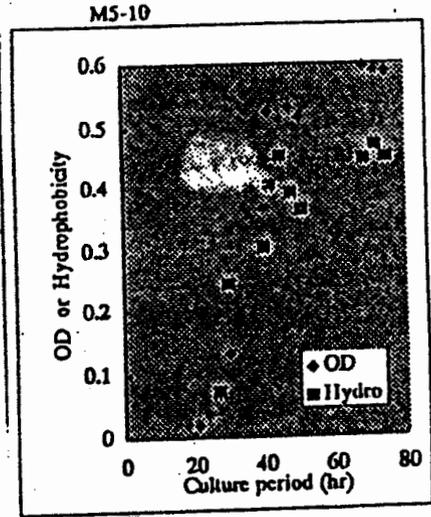
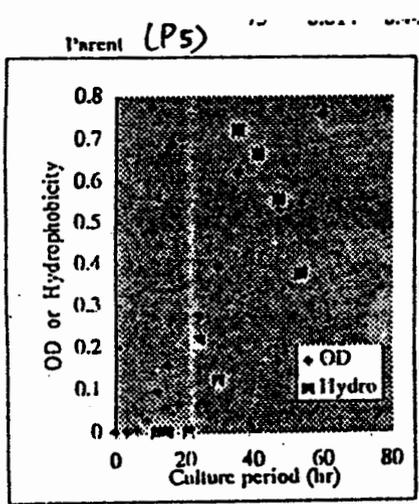
Metabolit Nod yang dihasilkan oleh *Rhizobium* dan menyebabkan pengeritingan pada akar adalah produk dari gen *nodABC* (Sobral et al). Dan mengingat bahwa *nodABC* mempunyai urutan basa yang hampir sama pada setiap *Rhizobium* (*highly conserved*), *nodABC* dari satu strain dapat digunakan oleh strain lain (*interchangeable*) (Djordjevic et al, 1985; Fisher et al, 1985). Ini dapat menerangkan mengapa metabolit Nod yang dihasilkan oleh strain ANU845.032 yang diisolasi dari bintil kedelai menghasilkan reaksi positif (Tabel a dan Tabel b) pada kecambah *P. falcataria*.

Dari Tabel a dan Tabel b dapat dilihat pula bahwa metabolit Nod terdapat baik di dalam maupun di luar sel (pada media). *NodA* dan *NodB* adalah produk dari *nodA* dan *nodB* gen yang berlokasi di sitosol dan *NodC* adalah transmembran protein (Schmidt et al, 1986). Tetapi *NodA* dan *NodB* yang berasosiasi dengan membrane sudah dilaporkan, dan *NodA* dan *NodB* dapat pula ditemukan di bintil akar yang sudah dewasa pada beberapa tumbuhan (Schmidt et al, 1986).

Tidak teramatinya pengeritingan akar pada beberapa kasus (Tabel a dan Tabel b) dapat terjadi karena satu atau beberapa alasan, antara lain : Flavonoid tidak dapat menginduksi/bereaksi dengan *NodD* sehingga tidak dapat menginduksi *nod box* untuk memproduksi metabolit Nod, dalam beberapa kasus flavonoid tidak berfungsi sebagai agen penginduksi (*inducing agent*) akan tetapi sebagai inhibitor untuk ekspresi gen (Firmin, J.L., 1986)

3. Transformasi plasmid terhadap strain lokal

Dari 148 "tranconjugant" yang diperoleh pada medium selektif terdapat 11 koloni yang menempel pada polystyrene, namun beberapa biak koloni kehilangan daya tumbuhnya pada



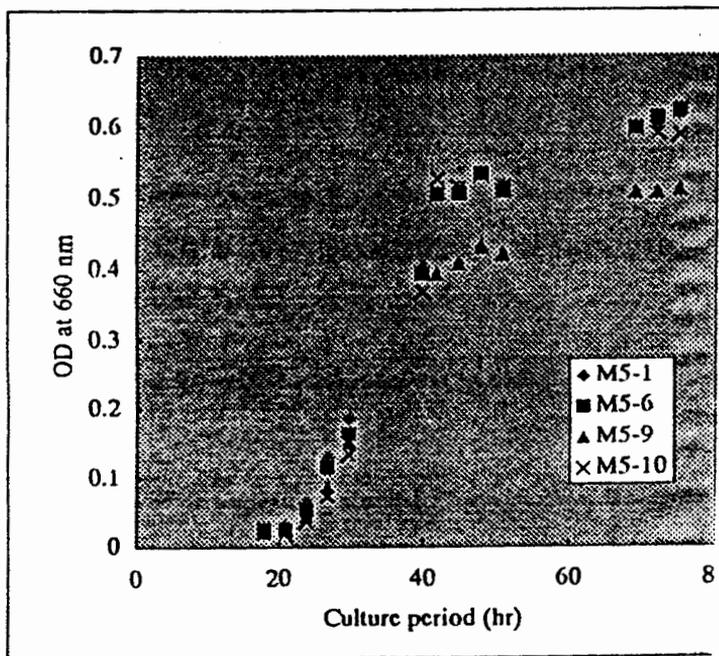
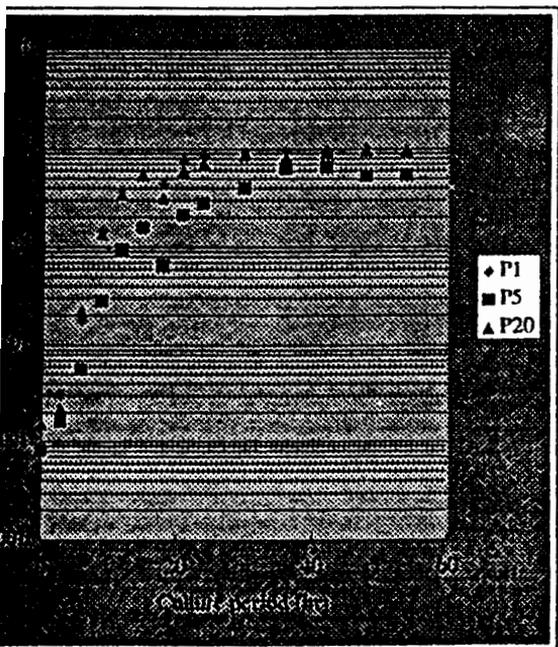
Gambar 4. Perbedaan pola hidrofobisitas antara strain induk (P5) dengan transkonjugan M5-10.

induk (parent strain) dengan transkonjugan secara kuantitatif. Namun dari kurva yang dipertelakan pada gambar 4 dapat dilihat adanya perbedaan pola hidrofobisitas dari strain induk dengan transkonjugan terutama antara P-5 (strain induk) dengan transkonjugan M5-10.

Hidrofobisitas P-5 terlihat menurun drastis setelah sel memasuki fase stationer sedang hidrofobisitas M5-10 masih stabil setelah melewati masa inkunasi 60 jam. Namun untuk melihat sampai dimana perubahan pola tersebut berpengaruh terhadap tanaman inang, perlu dilakukan uji lapangan. Hal ini belum dapat dilakukan karena untuk melihat pengaruh

media baru ketika dilakukan transfer kembali. Pada transfer terakhir diperoleh 6 isolat berasal dari strain no.5 + pSUP2021 dan 2 isolat berasal dari strain no.20 + pSUP5011. Sedangkan dari strain no.1 tidak diperoleh transconjugant baik yang dikonjugasikan dengan pSUP2021 maupun pSUP5011. Dari 8 transconjugant tersebut 4 diantaranya yaitu M5-1, M5-6, M5-9 dan M5-10 dibandingkan pola pertumbuhan dan hidrofobisitasnya dengan strain induk (parent strain) P-5. Hasil menunjukkan bahwa pola pertumbuhan P-5 dan transconjugan tidak berbeda hanya sedikit hambatan pertumbuhan terjadi pada transconjugant. Pertumbuhan P-5 mencapai fase stationer setelah 20 jam inkubasi sedang transconjugan mengalami fase stationer setelah 40 jam inkubasi (gambar 3).

Mengingat bahwa pemeriksaan hidrofobisitas yang dilakukan lebih bersifat kualitatif, maka dalam penelitian ini belum dapat diukur perbedaan hidrofobisitas strain



Gambar 3. Perbandingan kurva pertumbuhan strain induk (P5) dengan kurva pertumbuhan transkonjugant.

inokulasi terhadap tanaman legum pohon diperlukan waktu yang relatif lebih panjang. Karena hidrofobisitas permukaan sel sangat berperan dalam penempelan sel pada akar tanaman, maka penurunan hidrofobisitas suatu sel dapat mengurangi efektivitas sel tersebut dalam membentuk bintil. Terjadinya perubahan pola seperti terlihat pada biak M5-10 diharapkan dapat mempengaruhi efektivitas biak tersebut.

KESIMPULAN

Primer OPH-04 dengan komposisi 5'-GGAAGTCGCC-3' dan OPH-05 dengan komposisi 5'-AGTCGTCCCC-3' ternyata dapat dipakai untuk mendeteksi polimorfisme pada DNA kromosom strain-strain *Rhizobium* sp. asal *P. falcataria*. Dari pengujian induksi flavonoid menunjukkan bahwa biochanin mampu menginduksi produksi metabolit Nod pada strain PK-6, heperitin pada strain PFCB I.1.2, MG232 dan ANU845.032 sedang umbiliferon pada strain PFCB I.1.2. Untuk memperoleh biak *Rhizobium* dengan hidrofobisitas tinggi dilakukan konjugasi dengan *E. coli* S17-1 pembawa plasmid pSUP5011 dan pSUP2021 yang membawa transposon Tn5. Seleksi awal diperoleh 148 transkonjugan, namun setelah transfer terakhir diperoleh total 8 transkonjugan. Dari ini 4 diantaranya (M5-1, M5-6, M5-9 dan M5-10) telah diuji perbandingan dengan strain induk P-5 kemampuan pertumbuhannya dan hidrofobisitasnya. Fase stationer P5 dicapai dalam waktu 20 jam sedang transkonjugan 40 jam, hidrofobisitas strain induk menurun drastis setelah memasuki fase stationer sedang transkonjugan M5-10 tetap stabil meskipun telah melewati inkubasi 60 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A. K. dan D. L. Keister. 1983. Physiology of ex planta Nitrogenase activity in *Rhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 45(5): 1592-1601.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84:188-198.
- Baghwat, A.A.; R.E. Tully and D.L. Keister 1991 Isolation and Characterization
- Date, R. A. dan A. M. Decker. 1965. Minimal antigenic constitution of 28 strains of *Rhizobium japonicum*. *Canadian Journal of Microbiology* 11:1-8.
- Firmin, J.L., K.E. Wilson, W.L. Rossen dan A.W.B. Johnston. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds in plants. *Nature* 324:90-92
- Graham, P. H. 1969. Analytical serology of the Rhizobiaceae. p.353-378. dalam KWAPINSKI, J.R.G. (ed.) *Analytical serology of microorganisms*. Vol. 2. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Innes, R. W., P.L. Kuempel, J. Plazinski, H. Cantercramer, B.G. Rolfe da M.A. Djordjevic. 1985. Plant factors induce expression of nodulation and host range gene in *Rhizobium trifolii*. *Mol. Gen. Genet.* 201:426-432.

- Luoykendall, L. D., M. A. Roy, J.J. O'Neill dan T.E. Devine. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. International journal of Systematic Bacteriology 38:358-361.
- Lesley, S.M. 1982. A bacteriophage typing system for *Rhizobium meliloti*. Canadian Journal of Microbiology 28:180-189.
- Larmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology 3:208-218.
- Marshall, K.C. 1985. Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interface. Bacterial Adhesion, Ed. D.C. Savage and M. Fletcher, p.133-161, Plenum Press, New York.
- Mayashita, K. 1987. Deoxyribonucleic acid homology amongst strains of soy-bean nodulating bacteria. Soil Sci. Plant Nutr. 33(4):639-643.
- McAlligan, J.T. dan S.R. Long. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6609-6613.
- Nazawa, T. S. Tokuda dan Y. Komai. 1991. Correlation between competitive nodulation ability and cell surface hydrophobicity of *Bradyrhizobium japonicum*. Bull. Jpn. Soc. Microbial Ecol. 6:19-23.

- Ozawa, T., H. Ogata, R. Doi dan Y. Komai. 1992. Isolation of transposon Tn5-induced hydrophobic mutants of a *Bradyrhizobium japonicum* strain with improved competitive nodulation abilities. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38(3):545-552.
- Rossen, L., C.A Shearman, A.W.B Johnston dan J.A. Downie. 1985. The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the *nodA*, B, C genes. *EMBO J.* 4:3369-3373.
- Shearman, C.A., L. Rossen, A.W.B. Johnston dan J.A. Downie. 1986. The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene *nodF* encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by *nodD* plus a factor in pea root exudate. *EMBO J.* 5:647-652.
- Saiki, R.A., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis dan H.A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sadowsky, M.J., B.B. Bohlool dan H>H> Keyser. 1987. Serological relatedness of *Rhizobium fredii* to other rhizobia and to the bradyrhizobia. *Applied & Environmental Microbiology* 53:1785-1789.
- Simon, R.; U. Priefer and A. Puhler 1983 A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negatif bacteria. *Biotechnology Letters*
- Somasegaran, P. dan H.J. Hoben. 1985. *Methods in legume-Rhizobium technology*. University of Hawaii.

Schmidt, J., M. John, U. Wieneke, H.D. Krussman dan J. Schell. 1986. Expression of the nodulation gene *nodA* in *R. meliloyi* and the localization of the gene product in cytosol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:99581-9585.

Spaink, H.P. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. Plant Molecular Biology 20:977-986.

Triplett, E.W. 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. Mol. Plant-Microbe Int. 3:199-206.

Welsh, J. dan M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18:7213-7218.

Welsh, J. dan M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Research 19:5275-5279.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski dan S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 28(22):6531-6535.

Yao, P.Y. dan Vincent J.M. 1969. Host specificity in the root hair curling factors of *Rhizonium* spp. Aust. J. Biol. Sci. 22:413-423.