

Peningkatan Kemampuan Mikroba Pelarut Fosfat dan Kalium Melalui Teknik Mutasi Iradiasi Gamma

Enhancing the Microbial Ability of Phosphate and Potassium Solubilizing by Using Gamma Irradiation Technique

D. K. T. Sukmadewi^{1*}, I. Anas¹, R. Widyastuti¹, A. Citraresmini²

¹ Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Meranti Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

² Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi - Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta 12440, Indonesia

* E-mail : tristianasukmadewi@yahoo.com

ABSTRAK

Iradiasi gamma merupakan salah satu alternatif untuk memicu mutasi yang dapat menginduksi peningkatan kemampuan mikroba pelarut fosfat dan kalium. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma terhadap mikroba pelarut fosfat dan kalium, mempelajari perubahan kemampuan mutan mikroba dalam melarutkan fosfat dan kalium, serta perubahan pada tingkat molekuler yang terjadi akibat mutasi iradiasi gamma. Metode penelitian terdiri dari iradiasi mikroba menggunakan sinar dengan dosis 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 kGy, uji kemampuan mikroba dalam melarutkan fosfat dan kalium setelah iradiasi serta pengujian pada tingkat molekuler. Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah iradiasi gamma memberikan pengaruh terhadap jumlah populasi dan kemampuan mikroba dalam melarutkan fosfat dan kalium. Hal ini menunjukkan bahwa sinar gamma dengan dosis 1 kGy sampai 15 kGy menurunkan populasi bakteri dan fungi. Semakin tinggi dosis iradiasi gamma jumlah sel yang mati meningkat. Umumnya iradiasi dengan sinar gamma menghasilkan mutan dengan kemampuan melarutkan P dan K yang menurun. Akan tetapi beberapa dosis mampu meningkatkan kemampuan mutan dalam melarutkan fosfat dan kalium. Mutan BPK5 pada dosis 7,5 kGy mampu melarutkan fosfat (165,67 ppm) dan kalium (18,89 ppm) yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Mutan FPF 4 pada dosis 2,5 kGy mampu melarutkan fosfat (418,15 ppm) lebih tinggi dibandingkan kontrol, sedangkan mutan FPF 4 mampu melarutkan kalium (13,90 ppm) lebih tinggi dibandingkan kontrol pada dosis 15 kGy. Perubahan pada tingkat molekuler diindikasikan dengan terjadinya perubahan basa pada sekuen DNA antara isolat induk (tanpa iradiasi) dengan sekuen mutan. Pada bakteri mutasi tertinggi terjadi pada transisi adenin menjadi guanin dan transversi timin menjadi sitosin dengan persentase masing-masing terhadap total perubahan sebesar 23,91%. Perubahan basa pada sekuen DNA isolat mutan fungi ditunjukkan dengan terjadinya insersi adenin dan timin dengan persentase masing-masing terhadap perubahan total sebesar 50%.

Kata kunci : mikroba pelarut fosfat, mikroba pelarut kalium, mutasi, iradiasi gamma

ABSTRACT

Gamma irradiation is one of the alternative for mutation induction that can improve the ability of phosphate and potassium solubilizing microbes. The aimed of this research were to study the effect of gamma ray irradiation and enhance the mutant of microbes ability in solubilizing phosphate and potassium. The method consisted of irradiation of microbes using gamma rays with dose 0; 2.5; 5; 7.5; 10; 15 kGy, ability test of irradiated solubilizing phosphate and potassium microbes and its study in molecular level. The result shows that the irradiation of gamma rays affected the number of microbes population and their ability in solubilizing phosphate and potassium. It can be shown that the irradiation dose of gamma rays at the dose of 1 kGy-15 kGy decreased the number of bacteria and fungi. The higher the irradiation dose, the higher the rate of cell mortality. In general gamma irradiation produces mutants whose phosphate and potassium solubility decreases. However, several doses can increase the ability of mutants to dissolve phosphate and potassium. The BPK5 mutants at a dose of 7.5 kGy were able to dissolve phosphate (165.67 ppm) and potassium (18.89 ppm) which were higher than controls. The FPF 4 mutants at 2.5 kGy dose were able to dissolve phosphate (418.15 ppm) higher than controls, whereas FPF 4 mutants were able to dissolve potassium (13.90 ppm) higher than controls at 15 kGy dose. Changes at the molecular level are indicated by the occurrence of base changes in the DNA sequence between the

parent isolate with the mutant sequence. In bacteria, the highest mutation occurred in the transition from adenine to guanine and the transversion of thymine to cytosine with a percentage of each total change of 23.91%. Base changes in DNA sequences of fungi mutant isolates are indicated by the occurrence of the insertion of adenine and thymine with a percentage of each to a total change of 50%.

Keywords : phosphate solubilizing microbe, potassium solubilizing microbe, mutation, gamma irradiation

PENDAHULUAN

Fosfat merupakan unsur hara esensial yang berperan penting dalam fotosintesis dan perkembangan akar. Ketersediaan fosfat dalam tanah jarang melebihi 0,01 % dari total fosfat. Fosfat tidak dapat dimanfaatkan secara maksimal oleh tanaman karena berada dalam bentuk fosfat terikat (tidak larut) di dalam tanah. Hal ini menyebabkan petani tetap melakukan pemupukan fosfat walaupun tanah mengandung fosfat total yang tinggi sampai sangat tinggi [1].

Mikroba pelarut fosfat mampu melarutkan fosfat yang tidak larut menjadi fosfat yang larut sehingga tanaman dapat memperoleh fosfat untuk pertumbuhannya. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa mikroba pelarut fosfat yang terdiri dari isolat fungi dan bakteri mampu melarutkan sumber fosfat berupa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , dan FePO_4 [2].

Selain fosfat unsur kalium juga memegang peranan penting di dalam metabolisme tanaman. Kalium (K) adalah makronutrien penting, utama ketiga untuk pertumbuhan tanaman. Beberapa bakteri dilaporkan mampu melarutkan kalium, seperti bakteri *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus circulans* dan *Paenibacillus* sp [3].

Berdasarkan penelitian terdahulu [4] diketahui bahwa pengujian isolat mikroba pelarut kalium pada tanaman sorgum dapat meningkatkan tinggi tanaman, bobot kering, tajuk dan bobot kering akar. Dua diantara isolat mikroba pelarut kalium yang diidentifikasi adalah *Achromobacter xylosoxidans* dan *Burkholderia cepacia*.

Selama ini formulasi pembuatan pupuk organik yang diperkaya mikroba (*bio-organic fertilizer*-pupuk organik hayati) dilakukan dengan menggunakan beberapa spesies mikroba unggul sebagai konsorsium. Penggunaan konsorsium kurang efisien karena memerlukan berbagai jenis mikroba unggul [5], [6], [7]. Oleh karena itu diperlukan mikroba yang bersifat multifungsional yaitu satu mikroba memiliki dua fungsi atau lebih.

Penelitian yang telah banyak dilakukan lebih fokus pada isolasi serta pengujian kemampuan mikroba pelarut fosfat dan kalium dalam melarutkan kedua unsur tersebut dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman. Penelitian terkait usaha meningkatkan kemampuan mikroba pelarut fosfat dan kalium dengan teknik mutasi sinar gamma masih jarang dilakukan. Teknik mutasi merupakan salah satu cara untuk menginduksi kemampuan mikroba multifungsional [8]. Iradiasi gamma merupakan salah satu alternatif untuk memicu terjadinya mutasi [9]. Beberapa penelitian yang dilakukan sebelumnya antara lain peningkatan kemampuan antagonis fungi *Trichoderma harzianum* terhadap *Rhizoctonia solani* menggunakan dosis iradiasi gamma sampai 450 Gy [10]. Penelitian peningkatan kemampuan antagonis *Bacillus subtilis* terhadap *Aspergillus flavus* menggunakan dosis iradiasi gamma 0,1 - 3 kGy [11]. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma terhadap mikroba pelarut fosfat dan kalium, perubahan kemampuan mikroba dalam melarutkan fosfat dan kalium, dan perubahan yang terjadi pada tingkat molekuler akibat iradiasi gamma.

BAHAN DAN METODE

Materi genetik

Bahan penelitian yang digunakan adalah mikroba tanah pelarut fosfat dan kalium koleksi Laboratorium Bioteknologi Tanah, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Isolat bakteri diremajakan pada media *Nutrient Agar* (NA), sedangkan isolat fungi diremajakan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Uji patogenitas yang telah dilakukan terhadap mikroba meliputi uji hipersensitif dan hemolisis. Uji hipersensitif pada bakteri menggunakan tanaman tembakau varietas Xanthy, sedangkan pada fungi menggunakan benih padi varietas Ciherang. Isolat yang bersifat nonpatogen, telah diuji kemampuannya dalam melarutkan fosfat dan kalium. Dari hasil tersebut dipilih satu isolat bakteri dan fungi paling unggul yaitu isolat BPK 5 dan isolat FPF 4. Bahan lain yang

digunakan adalah media *Pikovskaya* dengan sumber fosfat Ca_3PO_4 , media *Alexandrov* dengan feldspar dari Malang, Jawa Timur sebagai sumber kalium yang tidak larut, media *blood agar*, kloramfenicol.

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal. Faktor yang dibandingkan adalah pengaruh dosis iradiasi gamma (0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 kGy) terhadap kemampuan mikroba dalam melarutkan fosfat pada media *Pikovskaya* dan melarutkan kalium pada media *Alexandrov*. Adapun dua isolat mikroba yang digunakan yaitu isolat bakteri BPK 5 dan isolat fungi FPF 4. Setiap perlakuan pada penelitian ini diulang 3 kali. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Anova atau uji ragam dengan signifikansi 5 %. Perlakuan yang berpengaruh nyata diuji lanjut dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5 %. Data diolah menggunakan *software* SPSS 16.0.

Iradiasi gamma

Iradiasi gamma dan isolasi mikroba setelah iradiasi dilakukan dengan metode modifikasi [12]. Mikroba yang akan diiradiasi mendapat perlakuan kering beku terlebih dahulu. Proses kering beku (*freeze drying*) dilakukan dengan penambahan bahan pelindung *skim milk* [13]. Mikroba yang sudah mengalami proses kering beku (*freeze drying*) kemudian diiradiasi dengan sinar gamma dari sumber dengan 7 taraf dosis radiasi, yaitu 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 dan 15 kGy. Pada penelitian ini digunakan dosis iradiasi dengan kisaran yang lebih tinggi yaitu mendekati dosis sterilisasi, dengan harapan daya adaptasi dan kemampuan dari mikroba tersebut juga akan semakin meningkat. Bakteri dan fungi yang telah diiradiasi kemudian diencerkan (dilusi) dan diinokulasikan menggunakan metode *spread plate* ke dalam media yang spesifik. Bakteri dikembangkan pada media *Alexandrov* karena kemampuan utamanya melarutkan kalium, sedangkan untuk fungi pada media *Pikovskaya* karena kemampuan utamanya melarutkan fosfat. Hasil isolasi bakteri diinkubasi selama 72 jam, sedangkan untuk fungi diinkubasi selama 120 jam. Bakteri dan fungi yang tumbuh diamati, zona beningnya, bentuk, warna, serta dihitung jumlah koloninya.

Uji kemampuan mikroba pelarut fosfat dan kalium setelah iradiasi

Jumlah populasi mikroba diseragamkan terlebih dahulu, untuk bakteri $\pm 10^8$ SPK/mL dan fungi $\pm 10^6$ SPK/mL. Mikroba pelarut fosfat ditumbuhkan ke dalam media *Pikovskaya* dengan sumber fosfat Ca_3PO_4 sedangkan untuk mikroba pelarut kalium pada media *Alexandrov* dengan sumber kalium yaitu *feldspar* (KAlSi_3O_8) yang berasal dari Malang, Jawa Timur. Isolat bakteri diinkubasi selama 72 jam, sedangkan fungi selama 120 jam [14]. Mikroba yang mampu melarutkan fosfat dan kalium akan membentuk zona bening yang muncul di sekitar koloni [15].

Hasil indeks kelarutan fosfat dan kalium terbaik dari masing-masing dosis iradiasi diuji lebih lanjut kemampuannya dalam melarutkan fosfat dan kalium pada media cair. Pengujian fosfat terlarut dengan menginokulasikan mikroba ke dalam media *Pikovskaya* cair. Kontrol negatif yang digunakan adalah media tanpa diinokulasikan mikroba, sedangkan untuk kontrol positif digunakan media yang diinokulasikan mikroba yang tidak diiradiasi. Perlakuan dalam media *Pikovskaya* cair yang diinokulasi dengan bakteri diinkubasi selama 168 jam dalam kondisi dikocok menggunakan *shaker*, sedangkan pada fungi tanpa dikocok. Sampel yang telah diinkubasi selama 168 jam kemudian disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Supernatan hasil sentrifus disaring menggunakan kertas saring. Hasil dari saringan tersebut kemudian dipipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan larutan pereaksi PB (asam borat 0,5 % ; amonium molibdat 0,38%; HCl 7,5%) kemudian ditambahkan 5 tetes larutan pereduksi Larutan tersebut kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm. Sebelum pengukuran dibuat larutan standar menggunakan KH_2PO_4 [16], [17]. Pengujian kalium terlarut, dilakukan dengan menginokulasikan mikroba ke dalam media *Alexandrov* cair dan diinkubasi selama 168 jam dalam kondisi dikocok menggunakan *shaker*, sedangkan pada fungi tanpa dikocok. Sampel yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 25 menit. Supernatan hasil sentrifus disaring menggunakan kertas saring [3]. Hasil saringan dari supernatan tersebut diukur menggunakan *flame fotometer* untuk mengetahui kandungan kalium yang terlarut serta diukur pula pH akhir

dari supernatan tersebut. Sebelum melakukan pengukuran disiapkan larutan standar K [3].

Analisis molekuler pada DNA bakteri dan fungi

Bakteri dan fungi yang diuji pada tingkat molekuler adalah mutan bakteri dan fungi yang memiliki kemampuan paling unggul serta kontrol dari masing-masing bakteri dan fungi. Isolat mutan bakteri yang digunakan yaitu isolat 1 dosis 7,5 kGy, sedangkan untuk fungi digunakan isolat 1 dosis 2,5 kGy. Tahapan awal uji molekuler adalah ekstraksi DNA, yang selanjutnya diperbanyak dengan reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Larutan reaksi PCR yang digunakan yaitu *master mix* (5 µL), *primer forward* 63F (0,4 µL), *primer reverse* 1387R (0,4 µL), *template* 1 µL (100 mg) dan NFW (3,2 µL). DNA hasil PCR selanjutnya mengalami proses pemurnian (elektroforesis) dan kemudian menjalani tahap sekuensing menggunakan primer 16S rRNA [18], [19], [20].

Tahapan analisis DNA fungi adalah menumbuhkan pada membran selofan dan diinkubasi selama 5 hari. Setelah inkubasi dilakukan penggerusan sampai halus dan ditambahkan dengan 500 µL SDS *buffer lisis*. Suspensi tersebut dikocok bolak balik dan diinkubasi selama 30 menit. Suspensi tersebut kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit. Tahapan selanjutnya suspensi ditambahkan dengan 500 µL *cloram isoprofanol*. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit, kemudian diambil lapisan atasnya. Lapisan atas tersebut ditambahkan dengan 500 µL *phenol cloroform isopropanol* dan dikocok. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit. Lapisan atas ditambahkan 2 µL *sodium acetat* dan diinkubasi selama 12 jam.

Setelah ekstraksi DNA dilanjutkan dengan tahap PCR (*Polymerase chain reaction*). Larutan reaksi PCR yang digunakan yaitu *template* (6 µL), *mix PCR* (30 µL), *primer ITS 4* (1,5 µL), *primer ITS 5* (1,5 µL), *dH₂O* 21 (µL) [21], [22], [23]. Tahapan yang dilakukan setelah PCR adalah elektroforesis dan kemudian disekuensing. Sekuen DNA yang didapatkan dari hasil sekuensing mutan bakteri dan fungi dikoreksi menggunakan *software* Mega 7.0 dan disambung (*consensus*) menggunakan BioEdit. Sekuen kontrol dan sekuen mutan disejajarkan (*aligment*) menggunakan program Mega 7.0 dan dilihat perubahan basa nitrogennya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh iradiasi gamma terhadap mikroba pelarut fosfat dan kalium

Berdasarkan hasil isolasi isolat BPK 5 setelah diiradiasi didapatkan beberapa jenis isolat dengan bentuk warna dan ukuran yang bervariasi bila dibandingkan dengan kontrol. Kecepatan pertumbuhan antar perlakuan pun berbeda dibandingkan dengan kontrol (0 kGy). Perlakuan dengan dosis 2,5 kGy; 5 kGy dan 7,5 kGy menunjukkan pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan dosis yang lain.

Tabel 1. Pengaruh iradiasi gamma terhadap populasi bakteri BPK 5 dan fungi FPF 4

| Dosis iradiasi (kGy) | Populasi ($\times 10^4$ CFU/mL) | |
|----------------------|----------------------------------|--------|
| | BPK 5 | FPF 4 |
| 0,0 | 975,000 | 13,100 |
| 1,0 | 500,000 | 2,030 |
| 2,5 | 5,750 | 0,500 |
| 5,0 | 2,550 | 0,100 |
| 7,5 | 0,825 | 0,500 |
| 10,0 | 0,617 | 0,100 |
| 15,0 | 0,525 | 0,055 |

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa semakin tinggi radiasi yang diberikan semakin menurun populasi bakteri BPK 5. Populasi bakteri tertinggi didapatkan pada dosis 0 kGy (kontrol) (975×10^4 CFU/mL), sedangkan populasi terendah didapatkan pada dosis 15 kGy ($0,525 \times 10^4$ CFU/mL). Berdasarkan Tabel 1 menunjukkan bahwa populasi fungi cenderung turun setelah diiradiasi dibandingkan kontrol. Populasi fungi tertinggi didapatkan pada dosis 0 kGy (kontrol) ($13,1 \times 10^4$ CFU/mL), sedangkan populasi terendah didapatkan pada dosis 15 kGy ($0,055 \times 10^4$ CFU/mL). Iradiasi pada mikroba dapat menyebabkan perubahan dalam bentuk fisik dan metabolisme pada organisme. Perubahan tersebut terjadi secara acak dan stabilitasnya tergantung kepada kerusakan sel setelah mengalami iradiasi pada level molekuler [11].

Iradiasi dengan sinar gamma memiliki sifat yang sangat acak, berbeda dengan iradiasi yang disebabkan oleh *ion beam* yang langsung mengenai target. Studi terbaru mengidentifikasi *ion beam* sebagai agen potensial untuk mutagenesis pada mikroorganisme karena

memiliki frekuensi mutasi yang tinggi, spektrum yang luas, kerusakan lebih rendah [9], [26].

Perubahan kemampuan mikroba dalam melarutkan fosfat dan kalium

Hasil pengukuran P dan K terlarut isolat BPK 5 (Tabel 2) P tersedia tertinggi pada dosis iradiasi 7,5 kGy (165,67 ppm) begitu pula untuk kalium tersedia tertinggi pada dosis 7,5 kGy (18,89 ppm) yang berbeda secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dosis lainnya. Pada hasil pengukuran P terlarut dosis 1; 2,5; 5; 10; 15 kGy menyebabkan penurunan P terlarut, sehingga P yang tersedia menjadi menurun.

Tabel 2. Pengaruh dosis iradiasi terhadap kemampuan isolat BPK 5 dalam melarutkan fosfat dan kalium pada media cair

| Dosis iradiasi (kGy) | P tersedia (ppm) | K tersedia (ppm) |
|----------------------|------------------|------------------|
| 0 | 123,20e | 7,14a |
| 1 | 87,74d | 10,50ab |
| 2,5 | 92,74d | 11,55abc |
| 5 | 65,48c | 15,04abc |
| 7,5 | 165,67f | 18,89c |
| 10 | 22,70b | 16,50bc |
| 15 | 5,48a | 15,99bc |

^a Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf nyata 5%. Hasil di atas sudah dikurangi hasil dari P dan K tersedia pada masing-masing kontrol negatif.

^b Populasi bakteri yang digunakan 10^8 CFU/ml

Pada hasil pengukuran kalium terlarut semua dosis 1 kGy - 15 kGy menunjukkan peningkatan kalium tersedia yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, walaupun tidak semuanya berbeda secara nyata.

Sinar gamma termasuk mutagen yang menghasilkan ion dan radikal bebas dalam bentuk hidroksil (OH⁻) [28], [29]. Interaksi sinar gamma dengan suatu sel akan menghasilkan radikal bebas, hal ini akan memicu stress oksidatif. Sel mengembangkan mekanisme proteksi dan perbaikan sel yang terinduksi dengan menghasilkan berbagai jenis enzim yang spesifik [30]. Perbaikan sel ini diduga menyebabkan daya adaptasi mikroba termasuk kemampuannya dalam melarutkan fosfat dan kalium menjadi meningkat.

Penelitian iradiasi pada bakteri lebih banyak dilakukan dalam bidang agen biokontrol pada berbagai studi bidang pertanian. Penelitian terdahulu diantaranya adalah mutagenesis yang terjadi secara acak pada *Bacillus subtilis* UTB1 yang dilakukan dengan menggunakan berbagai dosis iradiasi gamma yang berbeda dapat meningkatkan aktivitas antagonisnya dalam melawan *Aspergillus flavus*. Kisaran dosis untuk meningkatkan kemampuan antagonisnya berkisar antara 2 - 3 kGy [11].

Dari hasil pengukuran P dan K terlarut isolat FPF 4 didapatkan hasil (Tabel 3) P tersedia tertinggi pada dosis iradiasi 2,5 kGy (418,15 ppm) yang berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan lainnya, sedangkan kalium tersedia tertinggi pada dosis 15 kGy (13,90 ppm) namun tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan yang lainnya. Pada pengukuran P terlarut menunjukkan untuk kisaran dosis 1-2,5 kGy mampu meningkatkan jumlah P tersedia, sedangkan dosis 5; 7,5; 10; 15 kGy menurunkan jumlah P tersedia. Pada pengukuran kalium terlarut dosis 0-10 kGy, terjadi penurunan jumlah kalium tersedia. Penelitian lain yang terkait peningkatan kemampuan fungsi dengan iradiasi gamma diantaranya adalah peningkatan kemampuan produksi *carboxymethyl cellulase* dan *filter paper cellulase* pada dosis iradiasi 2 kGy [31]. Penelitian pada cendawan *Trichoderma reesei* yang diiradiasi dengan sinar gamma dosis 250 Gy dapat menghasilkan selulosa dengan jumlah maksimum dibandingkan dengan mutan yang diiradiasi sinar UV dan kontrol [32]. Iradiasi memicu terjadinya mutasi, hasil mutasi umumnya perubahan dalam produk akhir yang ditentukan oleh gen. Gen ini dapat memiliki pengaruh yang baik atau buruk pada sifat atau karakteristik suatu organisme [8], [33]. Dosis iradiasi yang optimum sulit ditentukan, dosis yang tinggi umumnya mengakibatkan kematian, sedangkan pada dosis yang rendah umumnya hanya menyebabkan perubahan abnormal pada fenotipe dan bersifat dapat balik [34], [11].

Tabel 3. Pengaruh dosis radiasi terhadap kemampuan isolat FPF 4 dalam melarutkan fosfat dan kalium pada media cair

| Dosis iradiasi (kGy) | P tersedia (ppm) | K tersedia (ppm) |
|----------------------|------------------|------------------|
| 0 | 317,44d | 12,93b |
| 1 | 379,57de | 11,54b |
| 2,5 | 418,15e | 1,28a |
| 5 | 20,49b | 11,34b |
| 7,5 | 13,41b | 1,86a |
| 10 | 4,47a | 1,38a |
| 15 | 120,29c | 13,90b |

^a Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf nyata 5%. Hasil di atas sudah dikurangi hasil dari P dan K tersedia pada masing-masing kontrol negatif.

^b Populasi fungi yang digunakan 10^6 CFU/mL

Identifikasi molekuler isolat mutan bakteri dan jamur

Berdasarkan hasil uji pada tingkat molekuler menunjukkan bahwa terjadi mutasi pada sekuen DNA isolat mutan bakteri dan fungi. Hal ini diindikasikan dengan terjadinya perubahan antara isolat induk dengan sekuen mutan. Perubahan ini disebabkan oleh substitusi basa, yang dapat dibagi menjadi dua jenis yaitu transisi dan transversi. Transisi merupakan perubahan nukleotida menjadi nukleotida lain yang jenis dasarnya sama, seperti purin menjadi purin dan pirimidin menjadi pirimidin. Transversi merupakan perubahan nukleotida menjadi nukleotida lain yang jenis dasarnya berbeda, seperti purin menjadi pirimidin atau sebaliknya [35]. Selain terjadi substitusi basa juga terjadi insersi dan delesi. Insersi merupakan penyisipan atau penambahan satu atau lebih nukleotida ke dalam rantai polinukleotida, sedangkan delesi merupakan pengurangan satu atau lebih pasangan nukleotida pada satu gen saat replikasi DNA [35].

Mutasi tertinggi terjadi pada substitusi basa yaitu transisi adenin menjadi guanin dan transversi timin menjadi sitosin dengan persentase masing-masing terhadap total perubahan sebesar 23,91% (Tabel 4). Mutasi terendah terjadi pada delesi timin dan adenin, insersi adenin dan timin serta transversi sitosin menjadi guanin dan adenin menjadi sitosin dengan persentase masing-masing terhadap perubahan total 1,09% (Tabel 4)

Tabel 4. Perubahan basa pada sekuen DNA isolat mutan bakteri (Isolat 1 dosis 7,5 kGy)

| Tipe Mutasi | Perubahan | | Jumlah perubahan basa | % Total perubahan |
|-------------|-----------|-------|-----------------------|-------------------|
| | Induk | Mutan | | |
| Transisi | A | G | 22 | 23,91 |
| Transisi | C | T | 10 | 10,87 |
| Transisi | G | A | 9 | 9,78 |
| Transversi | T | C | 22 | 23,91 |
| Transversi | A | T | 4 | 4,35 |
| Transversi | T | A | 4 | 4,35 |
| Transversi | G | T | 4 | 4,35 |
| Transversi | T | G | 5 | 5,43 |
| Transversi | C | A | 3 | 3,26 |
| Transversi | C | G | 1 | 1,09 |
| Transversi | A | C | 1 | 1,09 |
| Delesi | T | - | 1 | 1,09 |
| Delesi | A | - | 1 | 1,09 |
| Insersi | - | G | 3 | 3,26 |
| Insersi | - | A | 1 | 1,09 |
| Insersi | - | T | 1 | 1,09 |
| Jumlah | | | 92 | |

^a Panjang sekuen DNA bakteri 1253 bp

^b A: Adenin, C: Sitosin, G: Guanin, T: Timin
 Isolat yang diuji adalah mutan bakteri BPK 5 (Isolat 1, dosis 7,5 kGy) dan mutan fungi FPF 4 (Isolat 1, dosis 2,5 kGy)

Tabel 5. Perubahan basa pada sekuen DNA isolat mutan fungi (Isolat 2 dosis 2,5 kGy)

| Tipe Mutasi | Perubahan | | Jumlah perubahan basa | % perubahan |
|-------------|-----------|-------|-----------------------|-------------|
| | Induk | Mutan | | |
| Insersi | - | A | 1 | 50 |
| Insersi | - | C | 1 | 50 |
| Jumlah | | | 2 | |

^a Panjang sekuen DNA fungi 594 bp

^b A: Adenin, C: Sitosin, G: Guanin, T: Timin

Perubahan basa pada sekuen DNA isolat mutan fungi ditunjukkan dengan terjadinya insersi adenin dan timin dengan persentase masing-masing terhadap perubahan total sebesar 50% (Tabel 5). Berdasarkan literatur menyebutkan bahwa delesi sangat signifikan terjadi berkisar 12% dari mutasi spontan. Oleh karena itu, diasumsikan bahwa proses delesi ini memiliki peran yang sangat penting dalam membuat variasi genetik pada populasi mikroba di alam [35].

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa, iradiasi dengan sinar gamma dapat menyebabkan mutasi pada gen, seperti terjadi delesi, insersi

ataupun transversi pasangan basa. Hasil penelitiannya menunjukkan adanya transversi AT menjadi CG [36]. Secara molekuler mutasi dapat dibagi menjadi dua kelas yang luas, yaitu *microlesions* dan *macrolesions*. *Microlesions* terjadi perubahan pasangan basa tunggal, sedangkan *macrolesions* terjadi perubahan yang lebih ekstensif. *Macrolesions* meliputi delesi, duplikasi, inversi, translokasi dan insersi, sedangkan *microlesions* meliputi transisi, transversi dan *frameshifts* [35].

Mutasi merupakan *raw material* dari evolusi, mutasi yang terjadi secara besar, merupakan peluang yang baik untuk terjadinya evolusi. Hal ini menyebabkan bakteri yang merupakan prokariot dan memiliki ukuran sel yang kecil dan secara genetik haploid memungkinkan terjadinya mutasi dengan sangat cepat. Secara umum prokariot memiliki kapasitas untuk tumbuh dengan cepat dan mengalami mutasi lebih cepat dibandingkan dengan yang memiliki sel diploid. Hal ini merupakan perbedaan secara fundamental pada ukuran dan genetik prokariot. Hal ini pula yang merupakan alasan utama prokariot dapat beradaptasi dengan cepat terhadap perubahan lingkungan dan lebih mudah mudah mengeksploitasi suatu habitat dibandingkan dengan eukariot [37].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa iradiasi gamma pada semua dosis yang digunakan (1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 kGy) menurunkan populasi mikroba pelarut fosfat dan kalium. Iradiasi gamma memperlambat kecepatan tumbuh mikroba serta mempengaruhi morfologi dari mutan yang dihasilkan. Mikroba yang diiradiasi gamma mengalami peningkatan dalam melarutkan fosfat dan kalium yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Identifikasi pada level molekuler menunjukkan terjadinya perubahan basa pada sekuen DNA antara isolat induk mikroba dengan mikroba mutan. Pada bakteri mutan terjadi substitusi basa transisi, transversi, insersi dan delesi, sedangkan pada fungi mutan terjadi insersi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi (Kemenristek-DIKTI) melalui program beasiswa Pendidikan Magister Doktor Menuju Sarjana

Unggul (PMDSU) batch II tahun 2015 yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] R.C.B Ginting , S. Rasti, E. Husen. 2002. *Mikrobaia Pelarut Fosfat*. (Diunduh 12 Mei 2017). Tersedia pada: /ind/dokumentasi/buku/buku%20pupuk%20h ayatipupuk%20organik/07mikorganisme_gint ing.pdf
- [2] M.D. Puspitawati dan I. Anas, "Pemanfaatan Mikroba Pelarut Fosfat untuk Mengurangi Dosis Pupuk P Anorganik pada Padi Sawah," *J. Agron Indonesia*, vol. 41, no. 3, pp. 188-195, 2013.
- [3] P. Parmar, S.S. Sindhu, "Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions," *J. Microbiol. Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 25-31, 2013.
- [4] D. Pratama, I. Anas, "Ability of Potassium-Solubilising Microbes to Solubilise Feldspar and Their Effects on Sorghum Growth," *MJSS.*, vol. 20, pp. 163–175, 2016.
- [5] I. Berlian, B. Setyawan, H. Hadi, "Mekanisme Antagonisme *Trichoderma* spp. terhadap beberapa Patogen Tular Tanah," *Warta Perkaratan.*, vol. 32, no. 2, pp. 74-82, 2013.
- [6] M.R. Setiawati, U. Padjadjaran, "Perbandingan Efektivitas Pupuk Hayati Konsorsium dan Pupuk Hayati Endofitik Terhadap Produktivitas dan Kesehatan Tanaman Teh Menghasilkan Klon GMB 7," *J. Penelitian Teh Kina.*, vol.17, no. 2, pp. 71-82, 2014.
- [7] Munawar, Elfita, H. Wijajanti, "Viabilitas Konsorsium Bakteri Penambat Nitrogen dan Pelarut Fosfat pada Media Pembawa Tanah Gambut sebagai Agen Pupuk Hayati," *Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal*, pp. 8 - 9 ; Palembang, Palembang-Indonesia (ID), 2015.
- [8] M.B.H. Najafi, P. Pezeshki, "Bacterial Mutation; Types , Mechanisms And Mutant

- Detection Methods : A Review,” *ESJ.*, vol. 4, pp. 628-638, 2013.
- [9] Y. Zengliang, “The Progress of Ion Beam Bioengineering in China,” *Solid State Phenom.*, vol. 107, pp. 25-30, 2005.
- [10] T. Naseripour, S. Shahbazi, H. Askari, “The Impact of γ -irradiation on Morphological Characteristic and Antagonist Potential of *Trichoderma Harzianum* Againsts *Rhizoctonia Solani*,” *Intern J Agric Crop Sci.*, vol 7, no. 8, pp. 454-461. 2014.
- [11] P.C.K. Hoe, K.A. Rahim, H.M. Saud, “A Review On Microbial Mutagenesis Through Gamma Irradiation for Agriculture Application,” *JSNM.*, vol. 28, no. 2, pp. 20-29, 2016.
- [12] K. Satoh, K. Tejima, I. Narumi, “Analysis of Mutan Frequencies for Different LET Irradiation in *Deinococcus radiodurans*,” *IAEA-Review*. 2012.
- [13] N.N. Puspawati, L. Nuraida, R. Adawiyah, “Utilization of Various Cryogenic Agents During Freeze Drying to Maintain The Viability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Breast Milk,” *J Teknol Indust Pangan.*, vol. XXI, no. 1, pp.59-65, 2010.
- [14] M. Ines, T. Yousra, B.R. Asma, dkk., “Multi-Traits Of Non-Pathogenic Fluorescent *Pseudomonas* and Evaluation of Their Potentiel as Biocontrol Agents,” *Am J Environ Sci.* vol. 10, no. 2, pp. 199-209, 2014.
- [15] P.M. Edi, A.M. Moawad, P.L.G. Vlek, “Effect of Phosphate Solubilizing '*Pseudomonas putida*' on The Growth of Maize and Its Survival in the Rhizosphere,” *Indones J Crop Sci.*, vol.11, pp. 13-23, 1996.
- [16] R. Grover, “Rock phosphate and phosphate solubilizing microbes as a source of nutrients for crops,” *Dissertation Thapar (IN): Thapar Institute of Engineering and Technology.*, pp. 1-51, 2003.
- [17] F. Ahmad, I. Ahmad, F. Aqil, dkk., “Plant Growth Promoting Potential of Free-Living Diazotrophs and Other Rhizobacteria Isolated from Northern Indian Soil,” *Biothechnol J.*, pp. 1112-1123, 2006.
- [18] D.G. Pitcher, N.A. Sauders, R.J. Owen. “Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocynate,” *Lett in Appl Microbiol.*, pp. 151-156, 1989.
- [19] Suharjono. “Keanekaragaman dan Potensi *Pseudomonas* Strain *Indigenous* Pendegradasi Surfaktan Anionik di Ekosistem Sungai Tercemar Deterjen,” [disertasi] *Yogyakarta (ID): Universitas Gadjah Mada.*, 2008.
- [20] Suharjono, Y. Sembiring, W. E. Subagja, dkk., “Sistematik Filogenetik *Pseudomonas* Strain *Indigenous* Pendegradasi *Linear Alkilbenzen Sulfonat*,” *Biota*, vol. 1, no. 15, pp. 41-50, 2010.
- [21] A.S. Mulyatni, A. Priyatmojo, A. Purwantara, “Sekuen Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA *Ribosomal Oncobasidium Theobromae* dan Jamur Sekerabat Pemanding,” *Menara Perkeb.*, vol. 79, no. 1, pp. 1-5, 2011.
- [22] M.I. Purnamasari, C. Prihatna, A.W. Gunawan, dkk., “Isolasi dan Identifikasi Secara Molekuler *Ganoderma* spp . yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit,” *J Fitopatol Indones.*, vol. 8, pp. 9-15, 2012.
- [23] Y. Toyoshima, dkk., “Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Lethal and Mutagenic Effects of Ion Beams and Gamma Rays in *Aspergillus oryzae*,” *Mutat . Res Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 740, no. 1-2, pp. 43-49, 2012.
- [24] B. Ai-Safadi, P.W. Simon, “Gamma Irradiation-induced Variation in Carrots (*Daucus carota* L.),” *J. Amer Soc. Hort. Sci.*, vol. 121, no. 4, pp. 599-603, 1996.
- [25] T. Huma, M.H. Rashid, M.R. Javed, A. Ashraf. “Gamma ray mediated mutagenesis of *Phialocephala humicola*: Effect on kinetics and thermodynamic of α -amylase production,” *African J Microb Res.*, vol. 6, no. 22, pp. 4639-4646, 2012.

- [26] Y. Fitriana, K. Satoh, I. Narumi, T. Saito, "Biocontrol Science and Technology Ion-beam and gamma-ray Irradiations Induce Thermotolerant Mutants in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliaes*," *Biocontrol Sci Technol.*, vol. 24, no. 9, pp. 37-41, 2014.
- [27] I. Narumi, K. Satoh, K. Tejima, dkk., "Analysis of mutant frequencies for different LET irradiations in *Deinococcus radiodurans*," *JAEA Rev.*, vol. 2, pp.12-46. 2012.
- [28] D.T. Goodhead, "Molecular and cell models of biological effects of heavy ion irradiation," *Radiat Env Biophys.*, vol. 34, pp. 67-72, 1995.
- [29] N. Shikazono, A. Tanaka, H. Watanabe, dkk., "Rearrangement of the DNA in carbon ion induced mutants of *Arabidopsis thaliana*," *Genetics*. pp. 157: 379-387. 2001.
- [30] D. L.T. Retno, N. Mulyana, Nurhasni, dkk., "Pengaruh Iradiasi Gamma Terhadap Kemampuan Degradasi Lignin *Phanerochaete Chrysosporium* dan *Ganoderma Lucidum*," *JSTNI.*, vol. 17, no. 1, pp. 21-36, 2016.
- [31] A.A. Mostafa, "Effect of gamma irradiation on *Aspergillus niger* DNA and production of cellulase enzymes," *J Am Sci.*, vol. 10, no. 5, pp. 152-160, 2014.
- [32] S. Shahbazi, K. Ispareh, M. Karimi, dkk., "Gamma and UV irradiation induced mutagenesis in *Trichoderma reesei* to enhance cellulases enzyme activity," *Int J Fram Allied Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 543-554, 2014.
- [33] J.W. Dale, S. Park, "Molecular Genetics of Bacteria," *Ed ke-5. England (GB): J Wiley.*, 2010.
- [34] B.K. Banerji, S.K. Datta, "Gamma ray Induced Flower Shape Mutation in *Chrysanthemum Cv Java*," *J Nuclear Agric Biol.* vol. 21, no. 2, pp. 73-79. 1992.
- [35] F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, M. Schaechter, "Physiology of The Bacterial Cell," *Boston (USA): Sinauer*, 1990.
- [36] C. Xie, A. Xu, L. Wu, dkk., "Comparison of Base Substitutions in Response to Nitrogen Ion Implantation and Co-gamma ray Irradiation in *Escherichia Coli*," *Genet Mol Biol.*, vol. 27, 284-290, 2004.
- [37] M.T. Madigan, J.M. Martinko, K.S. Bender, dkk., "Biology of Microorganism," *Ed ke-4. USA: Pearson*. 2015.

