



ANALISIS AKTIVITAS NITROGENASE DAN GEN *nifH* ISOLAT BAKTERI RHIZOSFER TANAMAN PADI DARI LAHAN SAWAH PESISIR JAWA BARAT

ANALYSIS OF NITROGENASE ACTIVITY AND BACTERIAL GEN *nifH* OF DERIVED FROM RHIZOSFER OF PADDY PLANT IN WEST JAVA COASTAL WETLAND

Dwi Ningsih Susilowati*, Mamik Setyowati

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar
No. 3A Comanggu Bogor 16111

*Corresponding author: d_nengsusi@yahoo.com

Naskah Diterima: 27 Oktober 2016; Direvisi: 1 November 2016; Disetujui: 18 November 2016

Abstrak

Penambatan nitrogen oleh bakteri rhizosfer dapat dimanfaatkan untuk meniyasati dampak salinitas pada tanah sawah pesisir. Kemampuan tersebut disebabkan oleh aktivitas nitrogenase yang disandikan gen *nifH* pada komponen II. Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas nitrogenase pada kondisi salin dan mengidentifikasi gen *nifH*. Sebanyak 50 isolat bakteri rhizosfer asal tanah sawah pesisir daerah Eretan dan Patimban, Jawa Barat telah dianalisis. Lima isolat yang menunjukkan aktivitas nitrogenase pada kondisi salin adalah Er B1 3, Er B1 4, Er B1 9, Er B2 10, dan Ptb B1 4. Gen *nifH* kelima sampel diidentifikasi menggunakan PCR menghasilkan amplicon berukuran ~360 bp. Aktivitas nitrogenase tertinggi berdasarkan Analisis Reduksi Asetilen (ARA) diperoleh pada isolat Er B2 10 yang memiliki kekerabatan terdekat dengan bakteri *Providencia* sp. Hasil yang diperoleh membuktikan bahwa beberapa bakteri asal sawah pesisir dapat menambat nitrogen pada kondisi salin.

Kata kunci: Aktivitas nitrogenase; ARA; Gen *nifH*; Lahan pesisir; Rhizosfer

Abstract

*The ability of nitrogen fixation by rhizosphere bacteria could be used to decrease salinity impact in coastal paddy field, due to nitrogenase capability, encoded by a *nifH* gene in component II. The objectives of this research are to analyze nitrogenase activity in saline condition and identify the presense of the *nifH* gene. A total of 50 isolates of the rhizosphere bacteria coastal from wetland areas of Eretan and Patimban, West Java, has been isolated and being analyzed. Among them, five isolates i.e. Er B1 3, ER B1 4, Er B1 9, Er B2 10 and Ptb B1 4, showed the nitrogenase activity under saline condition. The polymerase chain reaction (PCR) of the *nifH* gene from those five samples resulted in the amplicon size of ~360 bp. The highest activity of nitrogenase assessed by acetylene reduction assay (ARA) was shown by Er B2 10 which closely related to bacteria of *Providencia* sp. The obtained result showed that several bacteria from coastal paddy field were able to conduct nitrogen fixation under saline stress.*

Keywords: ARA; Coastal soil; *nifH* gene; Nitrogenase activity; Rhizosphere bacteria

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v9i2.4036>

PENDAHULUAN

Peningkatan permukaan air laut sebagai efek dari pemanasan global merupakan masalah serius yang harus dihadapi sektor pertanian daerah pesisir Indonesia. Berdasarkan hasil kajian the *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC, 2007) menunjukkan bahwa sejak tahun 1850, tercatat terdapat 12 tahun terpanas berdasarkan data suhu permukaan global. Sebelas dari 12 tahun terpanas tersebut terjadi dalam waktu 12 tahun terakhir. Kenaikan suhu total dari tahun 1850–1899 sampai dengan 2001–2005 tercatat mencapai 0,76°C. Permukaan air laut global juga meningkat dengan laju rata-rata 1,80 mm/tahun dalam kurun waktu tahun 1961–2003. Kenaikan total permukaan air laut yang berhasil dicatat pada abad ke-20 diperkirakan mencapai 0,17 m. Dampak paling nyata dari peningkatan permukaan air laut adalah penciptaan lahan pertanian di pesisir pantai (Jawa, Bali, Sumatera Utara, Lampung, Nusa Tenggara Barat, dan Kalimantan), kerusakan infrastruktur pertanian, dan peningkatan salinitas yang merusak tanaman (Las, 2007). Hal ini dapat terjadi karena adanya akumulasi garam-garam berupa NaCl yang dapat menurunkan produktivitas pertanian di daerah pesisir pantai. Dampak peningkatan permukaan air laut yang demikian besar terhadap sektor pertanian di daerah pesisir memerlukan upaya aktif untuk mengantisipasi melalui strategi mitigasi dan adaptasi lahan salin tersebut.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengatasi permasalahan tersebut, di antaranya penelitian mengenai teknologi identifikasi dan rehabilitasi tanah salin, pengembangan varietas tanaman tanah kondisi salin serta telah dilakukan pemetaan salinitas tanah daerah pesisir (Sanggakara, 2001). Namun demikian, upaya untuk menyiasati adanya dampak salinitas pada lahan sawah daerah pesisir dari aspek mikrobiologis belum banyak dilakukan. Salah satu peran mikrobiologis yang dapat dimanfaatkan untuk menyiasati permasalahan tanah salin daerah pesisir adalah dengan memanfaatkan keberadaan bakteri yang mampu menyediakan unsur hara utama bagi tanaman, seperti unsur nitrogen.

Nitrogen menyusun sekitar 78% dari keseluruhan gas yang ada di atmosfer. Meskipun keberadaannya sangat melimpah di atmosfer, nitrogen tidak dapat digunakan langsung oleh tanaman. Pengolahan kimia atau fiksasi alami nitrogen diperlukan untuk mengkonversi gas nitrogen menjadi bentuk yang dapat digunakan tanaman. Fiksasi alami nitrogen dari atmosfer dapat dilakukan bakteri tanah agar ketersediaan unsur nitrogen tanaman tetap tercukupi meskipun tumbuh di wilayah marginal dengan kandungan unsur hara yang sangat rendah seperti pesisir pantai. Salah satu bakteri yang dapat melakukannya adalah rhizobakteria (Handayanto & Hairiah, 2007). Rhizobakteria merupakan bakteri yang hidup di daerah perakaran (rhizosfer) tanaman yang memiliki kemampuan mengikat nitrogen bebas di udara dan mereduksinya menjadi senyawa amonia (Dwijoseputro, 1998). Kemampuan bakteri tersebut untuk melakukan penambatan nitrogen disebabkan oleh aktivitas nitrogenase.

Nitrogenase merupakan enzim kompleks yang terlibat dalam proses fiksasi nitrogen. Nitrogenase berperan dalam perubahan bentuk nitrogen bebas di udara menjadi amonia (NH₃). Nitrogenase terdiri atas dua komponen yaitu komponen I (dinitrogenase atau protein Fe-Mo) dan komponen II (dinitrogenase reduktase atau protein Fe). Nitrogenase dikode oleh sekitar 20 gen *nif* (Lee *et al.*, 2000), diantara 20 gen *nif* tersebut, gen *nifH* merupakan gen terpenting yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan nitrogenase karena menyandi subunit pembentuk kompleks nitrogenase (Choo *et al.*, 2003). Gen *nifH* mengkode komponen II pada nitrogenase yang merupakan homodimer dengan berat molekul 70 kilo Dalton (kDa) (Caton, 2007).

Sebanyak 50 isolat bakteri rhizosfer telah berhasil diisolasi dari tanah sawah pesisir daerah Eretan dan Patimban, Jawa Barat. Isolat-isolat bakteri tersebut belum dilakukan analisis aktivitas nitrogenasenya dan diidentifikasi keberadaan gen *nifH* sehingga penelitian tersebut perlu dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menyeleksi sejumlah bakteri rhizosfer yang menunjukkan aktivitas nitrogenase pada kondisi salin serta mengidentifikasi subunit pembentuk kompleks nitro-

genase, yaitu gen *nifH*. Informasi yang akan diperoleh nantinya diharapkan dapat membantu pemanfaatan bakteri rhizosfer sebagai agen pupuk hayati (*biofertilizer*) untuk lahan salin.

MATERIAL DAN METODE

Analisis Kualitatif Aktivitas Nitrogenase

Sebanyak 1 ose koloni bakteri yang tumbuh pada media *Nitrogen Free Bromtimol Blue* (NFB) padat ditumbuhkan pada media NFB semipadat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari. Media NFB padat dan semi padat dibuat dari bahan-bahan yang sama. Sebanyak 5 g DL-*malic acid*, KOH 4 g, K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄.7H₂O 0,1 g, MnSO₄.H₂O 0,05 g, NaCl 0,02 g, CaCl₂ 0,01 g, FeSO₄.7H₂O 0,05 g, Na₂MoO₄.2H₂O 0,002 g dan bacto agar 30 g untuk media NFB padat sedangkan untuk media NFB semipadat bacto agar sebanyak 1,75 g serta ditambahkan bromtimol blue (BTB) 0,5% sebanyak 2 mL (Ding *et al.*, 2005).

Uji Salinitas

Sebanyak 1 ose bakteri diambil dari media NFB padat kemudian ditumbuhkan pada media salinitas. Media salinitas memiliki komposisi bahan yang sama dengan media NFB semi padat, yang ditambahkan NaCl sebanyak 10 g (konsentrasi 10%) dan 20 g (konsentrasi 20%) untuk volume 100 mL. Selanjutnya, bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 14 hari (Ding *et al.*, 2005).

Identifikasi Gen *nifH*

Isolasi DNA

Isolasi DNA genom bakteri dilakukan menggunakan kit (*Wizard DNA Genomic extraction kit*, (Promega, 2010)). Kultur bakteri yang telah ditumbuhkan pada media LB dipindahkan ke tabung mikro sebanyak 1,5 mL dan dihomogenkan menggunakan sentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Pelet yang terbentuk diambil dan supernatan dibuang. Pelet bakteri gram negatif langsung dilakukan proses lisis sel sedangkan pelet bakteri gram positif diresuspensikan terlebih dahulu dengan EDTA 50 mM

sebanyak 480 µL, ditambahkan 120 µL lisozim, diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit dan disentrifus pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Pelet yang terbentuk diambil dan supernatan dibuang. Tahap selanjutnya dilakukan proses lisis sel. Sebanyak 600 µL *nuclei lysis solution* ditambahkan ke dalam sampel dan diinkubasi pada suhu 80°C selama 5 menit. RNase ditambahkan sebanyak 3 µL ke dalam sampel dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Sebanyak 200 µL *protein precipitation solution* ditambahkan, dikocok dengan vorteks kemudian diinkubasi pada suhu es selama 5 menit. Setelah diinkubasi, sampel dihomogenkan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambahkan 600 µL isopropanol pada suhu ruang kemudian dikocok dengan vorteks. Sampel dihomogenkan menggunakan sentrifus kembali pada kecepatan 14000 rpm selama 2 menit, supernatan dibuang sedangkan pelet yang terbentuk ditambahkan etanol 70% sebanyak 600 µL. Sampel disentrifus kembali pada kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Buang supernatan, pelet dikering-udarkan selama 10-15 menit. Tahap terakhir sampel ditambahkan 100 µL *rehydration solution* dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam (Promega, 2010). Selanjutnya kualitas dan kuantitas DNA dicek dengan nanodrop (Thermo Fisher Scientific, 2009) dan dielektroforesis pada gel agarosa 1%.

Identifikasi Gen *nifH* dengan *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

Sebanyak 2 µL DNA ditambahkan ke dalam *coktail* PCR terdiri dari 12,5 µL GoTaq *master mix*, masing-masing 1 µL primer *nifHr* (5'CCATCGTGATCGGGTTCGGGATG'3), *nifHf* (5'GGCAAGGGCGGTATCGGCAAGTC'3), dan 8,5 µL *nuclease free water*. Proses amplifikasi dilakukan pada kondisi suhu denaturasi awal 94 selama 3 menit dengan 1 siklus, denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 55°C selama 30 detik, dan ekstensi 72°C sela-

ma 30 detik dengan 29 siklus, ekstensi akhir 72°C selama 5 menit dengan 1 siklus (Poly *et al.*, 2010 a,b).

Purifikasi Hasil PCR dan Visualisasi Amplikon

Hasil PCR selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan kit (*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, Promega, 2010). Produk PCR ditambahkan *membrane binding solution* dengan volume yang sama kemudian disaring melalui *SV minicolumn* yang telah dimasukkan ke tabung mikro baru, inkubasi selama 1 menit. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan sentrifus pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, supernatan dibuang. Sebanyak 700 µL *membrane wash solution* ditambahkan melalui saringan *SV minicolumn*, dihomogenkan kembali pada kecepatan dan waktu yang sama, supernatan dibuang. Sebanyak 500 µL *membrane wash solution* ditambahkan kembali melalui *SV minicolumn*, dihomogenkan kembali pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, dihomogenkan kembali pada kecepatan yang sama selama 1 menit. Pindahkan *SV minicolumn* ke dalam tabung mikro baru. Sebanyak 20 µL *Free water* ditambahkan melalui *SV minicolumn*, kemudian dihomogenkan pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, DNA hasil amplifikasi yang telah dimurnikan divisualisasi melalui elektroforesis dengan gel agarosa 1% (Promega, 2010).

Aktivitas Nitrogenase secara Kuantitatif dengan Metode ARA

Penyiapan Kultur

Sebanyak satu ose isolat dari media NFB padat ditumbuhkan kembali pada media NFB semi padat kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari. Kultur selanjutnya digunakan untuk pengujian aktivitas

$$\text{Aktivitas nitrogenase} = \frac{[\text{gas etilen pada sampel } (\mu\text{g/mL})]}{\text{berat molekul etilen}} \times \text{volume headspace (mL)} \\ \frac{\text{waktu inkubasi (jam)} \times \text{volume gas sampel yang diinjeksi (mL)}}{\text{berat molekul etilen}}$$

Sekuensing Isolat Bakteri dan Pembuatan Pohon Filogenetik

Pengurutan DNA isolat bakteri dilakukan dengan memanfaatkan jasa perusahaan sekuensing 1st Base di Malaysia. Urutan basa

nitrogenase (Ding *et al.*, 2005).

Pengkondisian Alat Kromatografi Gas

Alat kromatografi gas dikondisikan terlebih dahulu selama ±3 jam sebelum dilakukan penyuntikan sampel. Kromatografi gas diatur suhu inisial sebesar 100°C, suhu injektor sebesar 150°C, suhu detektor sebesar 200°C dan suhu akhir sebesar 100°C. Gas pembawa dan aliran gas yang digunakan adalah nitrogen (40 psi), hidrogen (1,5 kgf/cm²), dan udara (0,5 kgf/cm²) (Hawkes, 2001).

Pembuatan Kurva Standar Etilen

Kurva standar etilen dibuat dalam konsentrasi 0 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 175 µg/mL, 200 µg/mL dan 225 µg/mL. Kromatogram yang dihasilkan selanjutnya dibaca dan hasil yang diperoleh kemudian diplotkan menjadi kurva standar etilen yaitu hubungan antara konsentrasi dengan luas area standar untuk mengetahui konsentrasi masing-masing sampel yang diujikan.

Pengukuran Aktivitas Nitrogenase

Isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media NFB semipadat diganti tutup kapasnya dengan tutup karet. Gas yang ada di dalam tabung diambil sebanyak 1 mL dengan *microsyringe* kemudian ke dalamnya diinjeksikan gas asetilen (C₂H₂) dengan volume yang sama, diinkubasi selama 1 jam. Setelah diinkubasi, gas pada bagian *headspace* diambil kembali sebanyak 1 mL untuk diukur konsentrasi etilen (C₂H₄) yang terbentuk dengan menggunakan teknik kromatografi gas (Hawkes, 2001). Analisis kuantitatif aktivitas nitrogenase kelima sampel dilakukan dengan menggunakan metode Acetylene Reduction Assay (ARA). Aktivitas nitrogenase sampel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Hawkes, 2001):

nukleotida yang diperoleh selanjutnya disejajarkan dengan data pada *GeneBank* menggunakan *blast N* dari situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui situs di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> untuk

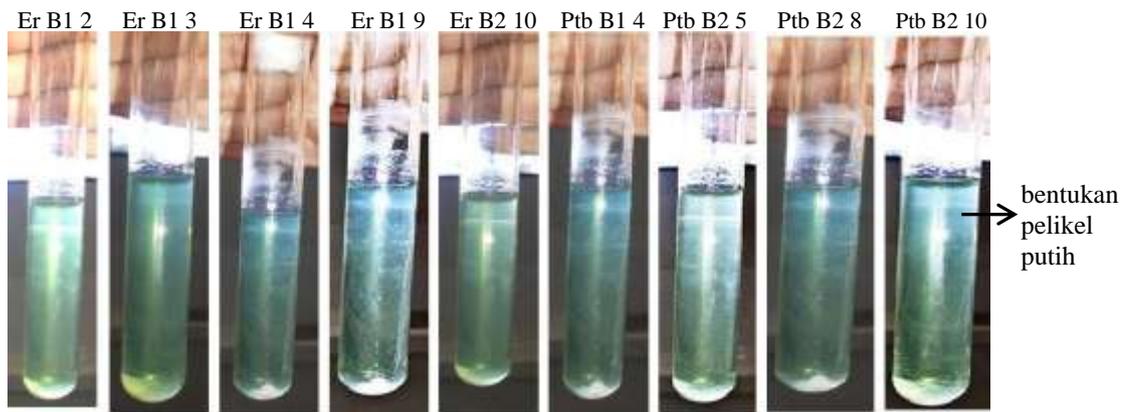
mengetahui tingkat kemiripan urutan nukleotida sampel dengan jenis bakteri terdekat. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan program MEGA 5, metode *Neighbor Joining* (NJ) dengan *bootstrap* 100x (Tamura *et al.*, 2007).

HASIL

Analisis Kualitatif Aktivitas Nitrogenase

Sebanyak 50 sampel awal dimurnikan dan diremajakan kembali pada media NFB padat. Dari 50 sampel awal, 47 sampel dapat

tumbuh pada media NFB padat. Sampel-sampel tersebut selanjutnya dianalisis aktivitas nitrogenasenya secara kualitatif pada media NFB semi padat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, terseleksi 9 sampel yang dapat menunjukkan adanya aktivitas nitrogenase pada media, yaitu sampel dengan kode isolat Er B1 2, Er B1 3, Er B1 4, Er B1 9, Er B2 10, Ptb B1 4, Ptb B2 5, Ptb B2 8, dan Ptb B2 10. Aktivitas nitrogenase pada sampel ditandai dengan terbentuknya pelikel putih pada media (Gambar 1).

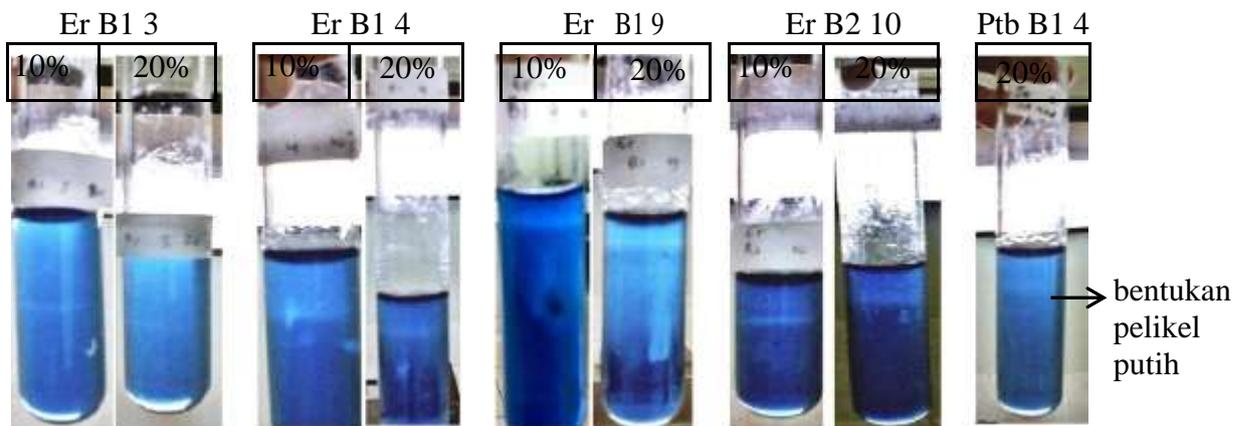


Gambar 1. Hasil uji kualitatif aktivitas nitrogenase sampel pada media NFB semi padat

Uji Salinitas

Selanjutnya dari 9 sampel yang terseleksi, diuji kembali aktivitas nitrogenase pada media salinitas 10% dan 20%. Hasil yang didapatkan, hanya 5 sampel yang terseleksi tetap dapat menunjukkan aktivitas nitrogenase pada kondisi kadar garam tinggi. Pada media

salinitas 10%, yaitu sampel Er B1 3, Er B1 4, Er B1 9, dan Er B2 10; sedangkan pada media salinitas 20%, yaitu sampel dengan kode isolat Er B1 3, Er B1 4, Er B1 9, Er B2 10, dan Ptb B1 4. Aktivitas nitrogenase pada sampel ditandai dengan terbentuknya pelikel berwarna putih pada media (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil analisis kualitatif aktivitas nitrogenase sampel pada media salinitas 10% dan 20%

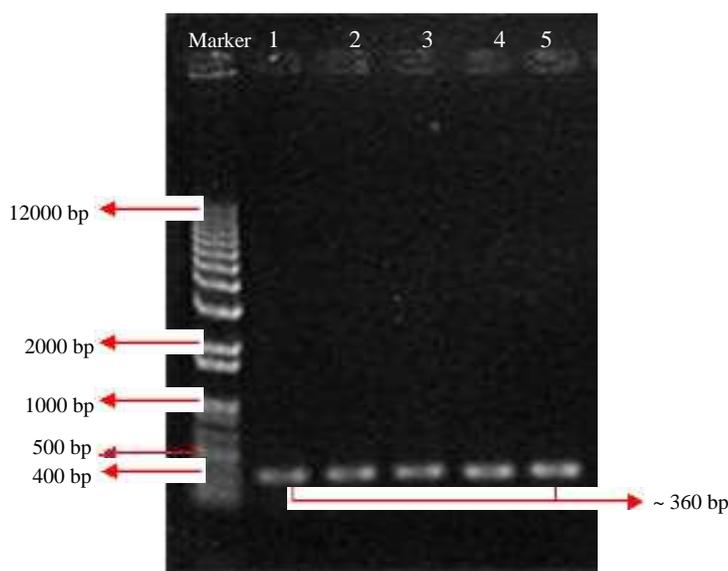
Amplikon Gen *nifH*

Tahap selanjutnya, sampel yang dapat menunjukkan aktivitas nitrogenase pada

kondisi salin diidentifikasi subunit pembentuk kompleks nitrogenase, yaitu gen *nifH*. Identifikasi gen *nifH* dilakukan dengan

menggunakan primer spesifik *nifHr* dan *nifHf*. Gen *nifH* diamplifikasi dengan metode PCR

menghasilkan pita amplicon berukuran ~360 bp (Gambar 3).



Gambar 3. Amplicon hasil PCR gen *nifH* berukuran ~360 bp (Keterangan: Marker: 1 kb, 1= Er B1 3, 2= Er B1 4, 3= Er B1 9, 4= Er B2 10, dan 5= Ptb B1 4)

Analisis Kuantitatif Aktivitas Nitrogenase

Berdasarkan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil nilai regresi linier untuk kurva standar sebesar 0,9961. Dari kurva standar tersebut dapat diketahui nilai konsentrasi gas etilen pada masing-masing sampel, yaitu Er B1 3 sebesar 10.3016 $\mu\text{g/mL}$, Er B1 4 sebesar 14.2719 $\mu\text{g/mL}$, Er B1 9 sebesar 14.6015 $\mu\text{g/mL}$, Er B2 10 sebesar 17.6325 $\mu\text{g/mL}$, dan Ptb B1 4 sebesar 11.2759 $\mu\text{g/mL}$. Besar aktivitas nitrogenase pada sampel dalam waktu 1 jam inkubasi pertama berdasarkan perhi-

tungan mendapatkan hasil sebagai berikut: Er B1 3 sebesar 2,5754 $\mu\text{mol/mL/jam}$, Er B1 4 sebesar 3,5679 $\mu\text{mol/mL/jam}$, Er B1 9 sebesar 3,1288 $\mu\text{mol/mL/jam}$, Er B2 10 sebesar 4,4081 $\mu\text{mol/mL/jam}$, dan Ptb B1 4 sebesar 2,4163 $\mu\text{mol/mL/jam}$. Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa aktivitas nitrogenase tertinggi terdapat pada sampel Er B2 10, sedangkan aktivitas nitrogenase terendah terdapat Ptb B1 4. Hal ini sesuai dengan ketebalan pelikel yang terbentuk pada media NFB saat sampel akan dilakukan uji ARA.

Tabel 1. Hasil analisis kuantitatif aktivitas nitrogenase

No.	Kode Isolat	Luas area sampel	Volume total (Vt) (mL)	Volume media (Vm) (mL)	Volume headpace (Vt-Vm) (mL)	Konsentrasi gas etilen yang terbentuk ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas nitrogenase (($\mu\text{mol/mL}$)/jam)
1.	Er B1 3	448092	15	8	7	10.3016	2,5754
2.	Er B1 4	632375	15	8	7	14.2719	3,5679
3.	Er B1 9	647667	15	9	6	14.6015	3,1288
4.	Er B2 10	788348	15	8	7	17.6325	4,4081
5.	Ptb B1 4	493318	15	9	6	11.2759	2,4163

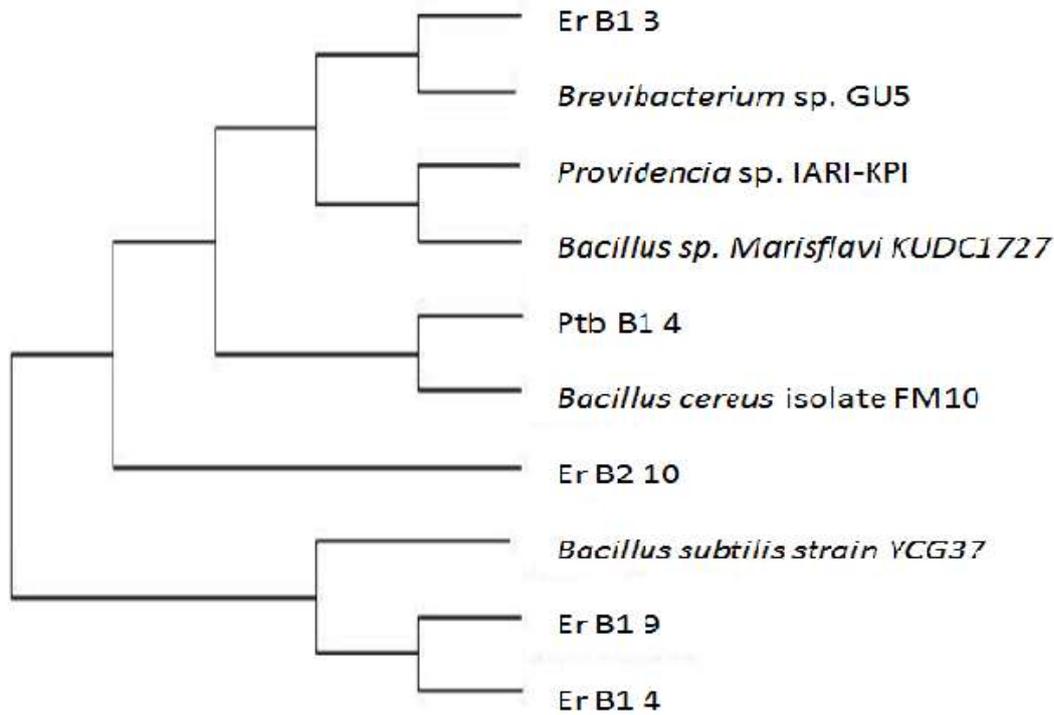
Sekuensing DNA Isolat Bakteri dan Pembuatan Pohon Filogenetik

Hasil *blast* menunjukkan bahwa kekerabatan terdekat dimiliki oleh sampel Er B1 4 dengan *Bacillus marisflavi* KUDC1727

(99%) yang merupakan strain bakteri dari jenis *Bacillus marisflavi*. Selanjutnya, sampel Ptb B1 4 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Bacillus subtilis* strain YCG37 (98%) dari jenis bakteri *Bacillus subtilis*.

Tabel 2. Hasil analisis sekuens DNA sampel unggul dengan menggunakan program *blast N* sequence

Isolat	Sekuens bakteri yang homolog	Jenis bakteri terdekat	% identitas	No. Akses
Er B1 3	<i>Brevibacterium</i> sp. GU5 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Brevibacterium</i> sp.	97%	AB755413.1
Er B1 4	<i>Bacillus marisflavi</i> strain KUDC1727 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus marisflavi</i>	99%	KC414706
Er B1 9	<i>Bacillus cereus</i> isolate FM10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus cereus</i>	77 %	DQ289077.1
Er B2 10	<i>Providencia</i> sp. IARI-KPI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Providencia</i> sp.	92%	KF712889.1
Ptb B1 4	<i>Bacillus subtilis</i> strain YCG37 16S ribosomal RNA gene, partial	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	JF775416.1

**Gambar 4.** Pohon filogenetik sampel unggul dan data dari *GeneBank* dengan metode *Neighbour Joining* dengan e 100x

Berdasarkan pohon filogenetik yang terbentuk, dapat diketahui bahwa kekerabatan terdekat antar sampel terdapat pada sampel Er B1 4 dengan dengan Er B1 9. Hal ini sesuai dengan hasil analisis menggunakan *blast*.

PEMBAHASAN

Aktivitas nitrogenase pertama kali dianalisis secara kualitatif dengan cara menguji kemampuan sampel dalam melakukan penambatan nitrogen pada media spesifik. Bakteri rhizosfer melakukan penambatan

nitrogen dengan tujuan memenuhi kebutuhannya untuk pembentukan asam nukleat bakteri. Saat kebutuhan nitrogen bakteri rhizosfer telah terpenuhi, kelebihan nitrogen dikeluarkan ke dalam tanah sehingga dapat digunakan oleh tanaman melalui akar (Caton, 2007). Nitrogen memiliki berbagai peran penting bagi tanaman, yaitu sebagai penyusun asam amino, protein komponen pigmen klorofil, dan komponen inti sel (Dwijoseputro, 1998), namun di dalam tanah ketersediaan nitrogen terbatas sehingga proses fiksasi nitrogen dari atmosfer mutlak diperlukan.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 50 isolat bakteri rhizosfer koleksi BB Biogen CC dan Ina CC yang telah berhasil diisolasi sebelumnya dari sawah pesisir daerah Eretan dan Patimban, Jawa Barat. Media spesifik yang digunakan untuk menguji aktivitas nitrogenase pada penelitian ini adalah media NFB yang digunakan untuk menganalisis aktivitas nitrogenase. Penambatan nitrogen dilakukan karena komposisi media yang tidak mengandung unsur nitrogen sama sekali dan mampu menyediakan nutrisi lain yang dibutuhkan oleh bakteri (Nurosid *et al.*, 2008). Pada tahap awal, media dibuat dengan pH 6,5, selanjutnya dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoklaf. Proses ini dapat meningkatkan pH media sebesar $\pm 0,3$ sehingga pH akhir untuk media NFB yang digunakan adalah sebesar 6,8. Bakteri rhizosfer sangat sensitif terhadap pH rendah sehingga pada $\text{pH} < 6$ bakteri rhizosfer akan sulit tumbuh. Suhu optimum pertumbuhan bakteri rhizosfer berada pada suhu ruang, yaitu kisaran suhu 25-28°C (Rasti *et al.*, 2007).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dari 50 sampel awal, hanya 9 sampel yang menunjukkan aktivitas nitrogenase pada media selektif NFB semipadat, yaitu sampel dengan kode isolat Er B1 2, Er B1 3, Er B1 4, Er B1 9, Er B2 10, Ptb B1 4, Ptb B2 5, Ptb B2 8, dan Ptb B2 10. Aktivitas nitrogenase pada uji ini ditandai dengan terbentuknya pelikel berwarna putih pada media. Bakteri membentuk pelikel dekat dari permukaan media. Saat jumlah nitrogen di dalam media telah terakumulasi maka pelikel akan berpindah ke permukaan media. Bakteri rhizosfer melakukan pergerakan (bersifat motil) di dalam media karena

memiliki kemampuan aerotaktik dengan tujuan mencari keseimbangan difusi oksigen. Saat laju difusi oksigen sama dengan laju respirasi bakteri maka kondisi tersebut merupakan kondisi yang baik untuk aktivitas nitrogenase (Susilowati *et al.*, 2007). Keberadaan oksigen di dalam media dapat menghambat aktivitas nitrogenase (Rasti *et al.*, 2007).

Aktivitas nitrogenase dalam penambatan nitrogen dimulai ketika nitrogen bebas di atmosfer berikatan dengan kompleks nitrogenase, yaitu pada komponen dinitrogenase reduktase. Tahap pertama, protein Fe akan mengalami reduksi oleh elektron yang memiliki potensial rendah berupa ferredoxin atau flavodoxin. Ferredoxin atau flavodoxin dibentuk dari proses fotosintesis, respirasi, atau fermentasi yang dilakukan oleh tanaman. Kemudian protein Fe yang tereduksi akan berikatan dengan ATP untuk membentuk kompleks yang akan mereduksi protein Fe-Mo. Selanjutnya, protein Fe-Mo yang tereduksi akan menyumbangkan sepasang elektron kepada substrat berupa N_2 sehingga ikatan rangkap tiga pada molekul N_2 akan putus dan membentuk $\text{HN}=\text{NH}$ karena adanya penambahan sepasang proton berupa ion H^+ . Proses selanjutnya, $\text{HN}=\text{NH}$ yang terbentuk akan mengalami pemutusan ikatan rangkapnya kembali menjadi $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$ dan pada akhirnya akan tereduksi menjadi 2NH_3 . Setiap pemutusan satu ikatan molekul N_2 memerlukan sepasang elektron dan sepasang proton berupa ion H^+ (Kristian, 2010).

Uji salinitas dilakukan untuk menyeleksi sejumlah sampel yang dapat hidup dan menunjukkan aktivitas nitrogenase pada kondisi salin. Bordeleau & Prevost (2001) menyatakan bahwa tanah yang bersifat sangat basa (memiliki pH lebih besar dari 8,0) mengandung natrium klorida, bikarbonat dan borat dengan kadar yang sangat tinggi. Keadaan ini dapat menyebabkan meningkatnya kadar salinitas pada tanah. Peningkatan kadar salinitas pada tanah dapat berdampak pada menurunnya kemampuan aktivitas nitrogenase karena terhambatnya pertumbuhan bakteri.

Media salinitas yang digunakan pada

penelitian ini memiliki konsentrasi salinitas sebesar 10% dan 20% (b/v). Pemilihan konsentrasi salinitas yang digunakan pada penelitian didasarkan pada sifat bakteri rhizosfer, yaitu bakteri halofilik moderat. Bakteri halofilik moderat merupakan kelompok bakteri yang membutuhkan garam dengan konsentrasi berkisar 5–20% untuk pertumbuhannya (Rasti *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Annie & John (2003), *Leucaena leucocephala* dari akar tanaman buncis dan kedelai, pada penambahan NaCl dengan konsentrasi lebih besar dari 0,025 mol/L dapat mengurangi pertumbuhan tanaman, mengurangi kemampuan penambatan N₂ dari udara, dan mengurangi presentasi keberadaan jaringan nitrogen pada tanaman yang berumur di bawah 1 tahun. Selain itu, dari penelitian yang dilakukan oleh Shovitri *et al.*, (2011) juga dapat diketahui bahwa kadar salinitas mempengaruhi jumlah keberadaan rhizobakteria di suatu lingkungan. Berdasarkan penelitian yang dilakukannya di Pantai Wonorejo, Pantai Timur Surabaya, pada kadar salinitas 7,00‰ ditemukan 24 jenis bakteri rhizosfer sedangkan pada kadar salinitas 15,33‰ hanya 6 jenis bakteri rhizosfer yang berhasil ditemukan.

Berdasarkan penelitian ini dari 9 sampel yang memiliki aktivitas nitrogenase pada media NFB semipadat, hanya 5 sampel yang terseleksi dapat hidup dan tetap menunjukkan aktivitas nitrogenase pada kondisi salin (pada media salinitas 10%) yaitu sampel dengan kode isolat Er B1 3, Er B1 4, Er B1, dan Er B2 10, sedangkan pada media salinitas 20% adalah sampel dengan kode isolat Er B1 3, Er B1 4, Er B1 9, Er B2 10 dan Ptb B1 4. Aktivitas nitrogenase pada sampel ditandai dengan terbentuknya pelikel berwarna putih pada media. Sampel dengan kode isolat PtbB14 hanya dapat tumbuh pada media salinitas 20% dan tidak dapat tumbuh pada media salinitas 10%. Hal ini diduga karena pada media salinitas 10% kebutuhan garam sampel Ptb B1 4 tidak dapat terpenuhi sehingga sampel tidak dapat tumbuh.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelima sampel tersebut memiliki kemampuan untuk beradaptasi terhadap perubahan tekanan

osmotik yang disebabkan oleh faktor salinitas. Menurut Robbert (2005), untuk dapat bertahan terhadap tekanan osmotik dari luar sel, bakteri dapat menggunakan molekul organik, seperti *polyols* dan turunannya, gula dan turunannya, asam amino dan turunannya, betain dan ektoin, serta molekul anorganik yang disintesis oleh bakteri tersebut atau diambil dari luar sel bakteri untuk memelihara keadaan osmotik konstan dalam sel. Selain itu, peningkatan konsentrasi larutan dalam sel bakteri juga dapat dilakukan melalui pemompaan ion dari lingkungan ke dalam sel (Blomberg & Adler, 2003; Ramos, 2005), ekspresi suatu protein seperti osmotin (Zhu *et al.*, 2005), enzim (Gong *et al.*, 2001) dan larutan organik cocok (Csonka & Hanson, 2001; Galinski, 2005) agar tidak terjadi osmosis sel. Sebaliknya, empat sampel yang tidak dapat tumbuh pada media salinitas disebabkan karena antara media dan sel bakteri terjadi perbedaan tekanan osmotik yang hipertonik sehingga sel bakteri mengalami plasmolisis (Ramos, 2005).

Keberadaan nitrogenase pada suatu bakteri dapat diketahui dengan mengidentifikasi gen-gen pembentuk subunit kompleks nitrogenase. Nitrogenase terdiri dari dua komponen, yaitu komponen I dinitrogenase (protein Fe-Mo) dan komponen II dinitrogenase reduktase (protein Fe). Dinitrogenase dikodekan oleh gen *nifD* dan gen *nifK* yang memiliki berat masing-masing molekul antara 220–250 kDa. Subunit ini berbentuk tetramer dengan dua metallo-komplek heterodimer yang disebut kluster fosfat (P) dan kofaktor besi molibdenum (FeMo-co). Satu subunit dinitrogenase memiliki sepasang rantai α - β dan sepasang kluster P serta molekul FeMo-co. Komponen dinitrogenase mengandung situs enzim katalitik yang akan berikatan dengan substrat untuk menghasilkan produk. Komponen II nitrogenase, yaitu dinitrogenase reduktase berukuran lebih kecil dengan berat molekul sekitar 60–70kDa. Dinitrogenase reduktase disusun oleh dua subunit identik rantai α yang mempunyai gugus 4Fe-4S di bagian tengah. Komponen dinitrogenase reduktase memiliki dua situs pengikatan Mg-ATP yang terletak di setiap subunit. Bagian ini berperan sebagai donor elektron obligat ke

komplek Fe-Mo yang kerjanya dipengaruhi oleh jumlah ATP yang tersedia di lingkungan. Komponen dinitrogenase reduktase disandi oleh gen *nifH* (Chai, 2007).

Pada penelitian ini, gen pembentuk subunit kompleks nitrogenase yang identifikasi adalah gen *nifH*. Ueda *et al.*, (1995) menyatakan bahwa gen *nifH* memiliki kelebihan dibandingkan dengan gen *nifDK* yang juga menyandi pembentukan kompleks nitrogenase. Menurutnya, gen *nifH* merupakan alat molekuler yang ideal untuk mempelajari fiksasi nitrogen secara biologis di lingkungan karena sifatnya yang tidak mengalami perubahan selama melewati proses evolusi. Selain itu, gen *nifH* juga memiliki sekuen basis data non-ribosomal terbesar dari berbagai mikroorganisme penambat nitrogen serta primer universal untuk gen ini sudah banyak diketahui sehingga proses identifikasinya lebih mudah dan data yang didapatkan memiliki tingkat keakuratan yang tinggi.

Amplifikasi gen *nifH* dengan primer spesifik *nifHf* dan *nifHr* menghasilkan ampikon berukuran ~360 bp. Primer *nifHf* memiliki panjang sekuen 23 nukleotida dan *nifHr* sebanyak 22 nukleotida. Primer ini digunakan untuk mengamplifikasi gen yang mengandung molekul protein besi dari nitrogenase. Zehr & McReynold (1989) menyatakan bahwa primer *nifH* membutuhkan kurang dari 200 lipatan DNA sekuen yang dapat mengkode gen (situs *coding*). Primer *nifH* ini disintesis dari setiap kemungkinan urutan sekuen yang dapat terjadi. Primer spesifik *nifH* ini telah banyak digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya, seperti yang dilakukan oleh Chowdhury *et al.*, (2009) untuk mengidentifikasi gen *nifH* bakteri rhizosfer dari tanaman *Lasiurus indicus*. Selain itu, Shilajit *et al.*, (2011) juga menggunakan primer spesifik ini untuk mengkaraktisasi bakteri diazotrof dari tanah salin. Penelitian yang dilakukan Poly *et al.*, (2001b) untuk mengkaraktisasi gen *nifH* dari bakteri tanah yang menjadi permulaan primer spesifik *nifH* ini digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gen *nifH* pada nitrogenase. Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa primer ini bersifat spesifik karena hanya

mengamplifikasi urutan gen *nifH* saat proses PCR berlangsung.

Analisis kuantitatif aktivitas nitrogenase menggunakan metode ARA didasarkan pada kemampuan nitrogenase untuk mereduksi beberapa komponen dengan ikatan rangkap tiga selain dinitrogen, yaitu asetilen. Prinsip dasar metode ini adalah menghitung banyaknya gas etilen yang terbentuk dari hasil reduksi asetilen menggunakan kromatografi gas dalam μmol per satuan waktu. Semakin tinggi jumlah gas etilen yang terukur maka semakin tinggi aktivitas nitrogenase pada sampel. Proses perhitungan aktivitas nitrogenase menggunakan kromatografi gas bersifat sangat sensitif karena kepekaannya bisa mencapai pada tingkat yang paling rendah (Rao *et al.*, 1997). Menurut Hardy *et al.*, (1996) uji ARA dengan menggunakan kromatografi gas dapat mendeteksi sampel hingga konsentrasi 0,001 μmol sehingga keakuratannya tinggi.

Pengolahan data penelitian menggunakan metode analisis kalibrasi mutlak dengan pembuatan kurva kalibrasi gas etilen murni. Syarat metode analisis kalibrasi mutlak adalah cuplikan murni (gas etilen) yang disuntikkan dengan kuantitas yang berbeda-beda. Selain itu, kepekaan detektor harus tidak berubah pada setiap pengukuran dari hari ke hari agar dapat membandingkan hasil dengan kurva kalibrasi (McNair & Boneli, 1988).

Sampel Er B2 10 membentuk pelikel yang lebih tebal dibandingkan dengan sampel lainnya pada media NFB semipadat. Semakin tebal pelikel yang terbentuk menunjukkan aktivitas nitrogenase yang dilakukan oleh bakteri semakin tinggi. Semakin tinggi aktivitas nitrogenase maka jumlah nitrogen yang bisa ditambat oleh sampel saat berada di lingkungan akan semakin tinggi pula (Rasti *et al.*, 2007).

Perbedaan besar aktivitas nitrogenase antar sampel disebabkan oleh perbedaan waktu inkubasi optimum sampel. Hardy *et al.*, (1996) menyatakan pembentukan etilen mencapai nilai tertinggi pada waktu inkubasi optimum untuk tiap jenis yang diujikan. Tiap jenis memiliki waktu inkubasi optimum yang berbeda. Berdasarkan hal tersebut, inkubasi selama 1 jam merupakan waktu terbaik untuk sampel Er B2 10, sedangkan untuk sampel Ptb

B1 4 waktu inkubasi yang digunakan bukan merupakan waktu inkubasi optimum untuk jenisnya. Matsuguchi *et al.*, (2000) menyatakan bahwa waktu inkubasi yang terlalu lama dari waktu inkubasi optimum masing-masing jenis dapat menyebabkan etilen yang telah terbentuk terurai kembali menjadi asetilen.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi besar aktivitas nitrogenase adalah konsentrasi nitrogenase dalam sampel. Aktivitas nitrogenase memiliki hubungan yang linier dengan konsentrasi nitrogenase dalam sampel. Semakin tinggi konsentrasi nitrogenase maka aktivitas nitrogenase pun akan semakin tinggi (Hardy *et al.*, 1996). Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa sampel Er B2 10 memiliki konsentrasi nitrogenase terbesar karena memiliki nilai aktivitas nitrogenase paling tinggi. Sebaliknya, sampel Ptb B1 4 memiliki konsentrasi nitrogenase paling rendah karena memiliki nilai aktivitas nitrogenase yang paling kecil.

Ding *et al.*, (2005), menyatakan bahwa bakteri *Bacillus marisflavi* yang diisolasi dari akar tanaman di daerah Beijing berdasarkan hasil amplifikasi menggunakan PCR memiliki sekuens gen *nifH*. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa bakteri yang berasal dari *Bacillus subtilis* memiliki kompleks nitrogenase sehingga dapat melakukan penambatan nitrogen dari udara. Salah satu penelitian yang membuktikan hal tersebut adalah penelitian yang dilakukan oleh Kobayashi *et al.*, (1995) menyatakan *Rhodospseudomonas capsulatus* dapat melakukan penambatan nitrogen yang lebih besar ketika diinokulasi bersama dengan *B. subtilis*. Hal tersebut menunjukkan bahwa *B. subtilis* memiliki urutan nitrogenase sehingga mampu untuk meningkatkan jumlah nitrogen terfiksasi dari lingkungan.

Sampel lainnya, yaitu Er B1 3 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Brevibacterium* sp. GU5 (97%) yang merupakan bakteri dari jenis *Brevibacterium* sp. Gilichinsky *et al.*, (2007) melaporkan bahwa telah berhasil melakukan isolasi dan kloning bakteri diazotrof dari daerah Antartika. Beberapa bakteri tersebut telah berhasil teridentifikasi memiliki sekuens gen *nifH* seperti bakteri *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Comamonas*,

Lysobacter, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* dan *Sphingomonas* yang merupakan *Proteobacteria*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Paenibacillus*, dan *Brevibacterium* sp. Sampel ErB210 memiliki kekerabatan terdekat dengan bakteri *Providencia* sp. IARI-KPI (92%). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Anuj *et al.*, (2011) bakteri *Providencia* sp. yang diisolasi dari rhizosfer tanaman gandum menunjukkan adanya aktivitas nitrogenase saat dilakukan pengukuran secara kuantitatif dengan metode ARA. Kekerabatan terendah dimiliki sampel Er B1 9 dengan *B. cereus* isolat FM10 (77%) yang merupakan bakteri *B. cereus*. Penelitian yang dilakukan oleh Ding *et al.*, (2005) pertama kali melaporkan bahwa bakteri *B. cereus* memiliki sekuens gen *nifH*.

Berdasarkan hasil analisis *blast* diketahui bahwa Er B1 4 dan Er B1 9 keduanya memiliki kekerabatan terdekat dengan bakteri dari genus *Bacillus* walaupun dari jenis yang berbeda untuk keduanya. Selain itu, aktivitas nitrogenase yang dimiliki oleh kedua sampel memiliki nilai yang tidak berbeda jauh. Sebaliknya, kekerabatan terjauh dimiliki oleh sampel Er B1 3 dan Er B1 9. Hal ini ditunjukkan dari pohon filogenetik kedua sampel berada dalam tangkai yang berbeda dan posisi yang berjauhan. Hasil ini sesuai dengan hasil analisis menggunakan *blast* yang menunjukkan bahwa Er B1 3 dan Er B1 9 memiliki kekerabatan terdekat dengan dua genus bakteri yang berbeda. Selain itu, besar aktivitas nitrogenase pada kedua sampel pun memiliki nilai yang berbeda jauh.

KESIMPULAN

Analisis aktivitas nitrogenase dan identifikasi gen *nifH* isolat bakteri rhizosfer asal sawah pesisir daerah Eretan dan Patimban, Jawa Barat yang beraktivitas pada kondisi salin telah berhasil diperoleh. Sebanyak 50 sampel awal, hanya 5 sampel menunjukkan adanya aktivitas nitrogenase pada kondisi salin, yaitu Er B1 3, Er B1 4, Er B1 9, Er B2 10, dan Ptb B1 4. Gen *nifH* dari kelima sampel tersebut telah berhasil teridentifikasi menggunakan metode PCR dengan primer spesifik *nifHr* dan *nifHf* yang menghasilkan amplicon berukuran ~360 bp. Aktivitas nitrogenase tertinggi berdasarkan ARA terdapat pada sampel Er B2

10 serta memiliki kekerabatan terdekat dengan bakteri *Providencia* sp. berdasarkan hasil sekuensing dan analisis data dari *GeneBank* menggunakan program *blast* N. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini membuktikan bahwa terdapat beberapa bakteri asal sawah pesisir yang dapat menambat nitrogen pada kondisi salin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Safirah Tasa Nerves Ratu dan Ibu Popi Asri Kurniatin, S.Si, Apt, M.Si atas bantuan teknis dan sarannya untuk kesempurnaan tulisan ini.

REFERENSI

- Annie, A., & John, D. D. (2003). The Effect of NaCl on Growth, N₂ Fixation (Acetylene Reduction), and Percentage Total Nitrogen In *Leucaena leucocephala* (Leguminosae) Var. K-8. *American Journal of Botany*, 90(5), 683-692.
- Anuj, R., Baljeet, S., Monica, J., Radha, P., Kanika, K., & Lata, N. (2011). Identification of multitrait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annual Microbiology*, 61, 893-900.
- Blomberg, A., & Adler, L. (2003). Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 33, 145-212.
- Bordeleau, L. M., & Prevost, D. (2001). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, 161, 115-125.
- Caton, I. R. (2007). *Abundance of nifH genes in urban, agricultural, and pristine prairie streams exposed to different levels of nitrogen loading* (Thesis). Wichita State University.
- Chai, Y. H. (2007). *Characterization of nitrogen fixation (nif) genes from Paenibacillus polymyxa* (Thesis). University Sains Malaysia.
- Choo, Q. C., Samian, M. R., & Najimudin, N. (2003). Phylogeny and characterization of three *nifH*-homologous genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3658-3662.
- Chowdhury, S. P., Michael, S., Anton, H., & Anil, K. T. (2009). Diversity of 16S-rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. *Europe an Journal of Soils Biology*, 45, 114-122.
- Csonka, L. N., & Hanson, A. D. (2001). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology*, 45, 569-606.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1271-81.
- Dwidjoseputro, D. (1998). *Pengantar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta: PT. Gramedia.
- Galinski, E. A. (2005). Osmo adaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 37, 273-328.
- Gilichinsky, D. A., Wilson, G. S., Friedmann, E. I., McKay, C. P., Sletten, R. S., & Rivkina, E. M. (2007). Microbial populations in antarctic permafrost: Biodiversity, state, age, and implication for Astrobiology. *Astrobiology*, 7, 275-311.
- Gong, Z., et al., (2001). Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiology*, 126, 363-375.
- Handayanto, & Hairiah, K. (2007). *Biologi Tanah*. Yogyakarta: Pustaka Adipura.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Ackson, E. K., & Burns, R. C. (1996). The acetylene-etilen assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43, 1185-1207.
- Hawkes, C. (2001). Acetylene reduction method for measuring nitrogenase activity tested by Christine Hawkes. (2010, Juni 14). Retrieved from http://www.biosci.utexas.edu/IB/faculty/hawkes/lab/protocols/acetylene_r
- Kristian, M. (2010). *Eksplorasi bakteri penambat nitrogen non-simbiosis dari tanah kawasan mangrove Wonorejo Surabaya*. (Skripsi). Prodi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

- Kobayashi, M., Katayama, T., & Okuda, A. (1995). Nitrogen-fixing microorganism in paddy soils in mixed culture of photosynthetic bacteria (*R. Capsulatus*) with other heterotrophic bacteria, associaton with *B. Subtilis*. *Soil Science Plant Nutrition*, 11, 78-83.
- Las, I. (2007). Menyiasati fenomena anomali iklim bagi pemantapan produksi padi nasional pada era revolusi hijau lestari. *Jurnal Biotek-LIPI*. (Makalah orasi pengukuhan profesor riset) Badan Litbang Pertanian. Bogor.
- Lee, S., Reth, A., Meletzus, D., Sevilla, M., & Kennedy, C. (2000). Characterization of major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal Bacteriology*, 182(24), 7088-7091.
- McNair, H. M., & Boneli, E. J. (1988). *Dasar kromatografi gas, edisi ke-5*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawimata. Bandung: ITB.
- Matsuguchi, T., Shimomura T., & Lee, S. K. (2000). Factor regulating acetylene reduction assay for measuring heterotrophic nitrogen fixation in waterlogged soils. *Society of Soil Science and Plant Nutrition*, 25(3), 323-336.
- Nurosid, Oedjijono, & Lestari, P. (2008). *Kemampuan Azospirillum sp. JG3 dalam menghasilkan lipase pada medium campuran bedak dan onggok dengan waktu inkubasi berbeda*. Departemen of Microbiology, Biology Faculty Jenderal Soedirman: Purwokerto.
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., & Monrozier, L. J. (2001a). Comparison of *nifH* gene pools in soil microenvironments with contrasting properties. *Applied Environmental and Microbiology*, 67, 2255-62.
- Poly, F., Jocteur Monrozier, & Bally, R. (2001b). Improvement in RFLP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of *nifH* gene. *Research in Microbiology*, 152, 95-103.
- Promega (2010). *Wizard Genomic DNA Purification KIT Quick Protocol*. (2013, November 25). Retrieved from <http://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizardgenomic-dna-purification-kit-protocol>.
- Promega (2010). *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Quick Protocol*. (2013, November 25). Retrieved from <http://worldwide.promega.com/resources/protocols/technicalbulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol>.
- Ramos, J. (2005). Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt-loving yeast. In Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A, (eds). Adaptation to life at high salt concentrations in Archea, Bacteria and Eukarya. (pp. 441-451). *The Netherlands: Springer*.
- Rasti, S., Husen, E., Simanungkalit R. D. M. (2007). *Metode analisis biologi tanah*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian. Bogor.
- Rao, V. R., Jena, P. K., & Adya, T. K. (1997). Inoculation of rice with nitrogen fixing bactria problems and perspective. *Biology Fertilization Soils*, 4, 21-26.
- Robert, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1, 5.
- Sangakkara, U. R. (2001). Plant stress factors: Their impact on productivity of cropping systems. In J. Nosberger, H. H. Geiger, & P.C. Struik (Eds.). *Crop Science: Progress and Prospects*. (pp. 101-117). CAB International Publication Wellingford.
- Shovitri, M., Tutik, N., Enny, Z., Nova, M. A., & Purwanti. (2011). *Rhizobakteria di Rhizosfer Avicennia marina dan Pluchea indica di Pantai Wonorejo, Pantai Timur Surabaya*. Seminar Kelautan Nasional VII: Surabaya.
- Shilajit, B., Sudipathi, T., Ashis, C., Sagarmoy, G., & Kaylan, C. (2011). Characterizarion and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. *Microbiological Research*, 167, 95-102.

- Susilowati, D. N., Saraswati, R., Hastuti, R. D., & Yuniarti, E. (2007). Peningkatan serapan N pada kedelai yang diinokulasi bakteri diazotrof endofit di medium vermiculit. *Jurnal Tanah Iklim* 26, 41-46.
- Tamura, K., Daudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA 5: Molecular Evolutioner Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2, 1596-1599.
- The Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC]. (2007). *Climate change 2007: Impacts, Adaptation and vulnerability. contribution of working group II to the fourth assessment report of the Intergovern-mental Panel on Climate Change* (IPCC), M.L. Parry, O.F.Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden, and C.E. Hanson (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Thermo Fisher Scientific. (2009). *Nanodrop 2000/200c Spectrophotometer V1.0 User Manual*. Wilmington (US): Thermo Fischer Scientific.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., & Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in riceroots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequnces. *Journal Bacteriology*, 177, 1414-1417.
- Zehr, J. P. & McReynolds, L. A. (1989). Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium-thiebautii*. *Applied Environmental and Microbiology*, 55, 2522-2526.
- Zhu, B., Chen, T. H., & Li, P. H. (2005). Expression of three osmotin-like protein in response to osmotic stress and fungal infection in potato. *Plant Biology*, 28, 17-26.