



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

ISOLASI BAKTERI METANOTROF DAN DETEKSI GEN *pmoA* BAKTERI METANOTROF PADA EKOSISTEM PADI SAWAH

SKRIPSI



**HARYOSI UTAMI
05133026**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

ABSTRAK

Penelitian tentang isolasi dan deteksi gen *pmoA* bakteri metanotrof pada ekosistem padi sawah telah dilakukan dari bulan Juli sampai Oktober 2010 di Laboratorium Ekologi dan Fisiologi, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas bakteri metanotrof dalam mereduksi emisi gas rumah kaca metan pada ekosistem sawah, serta untuk mendapatkan biakan bakteri metanotrof. Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif. Sampel tanah sawah diambil secara random pada empat petakan sawah dengan tipe penanaman yang berbeda yakni penanaman padi secara konvensional (T0), penanaman padi dengan teknologi SRI, pemupukan anorganik (T1), penanaman padi dengan teknologi SRI, pemupukan organik (T2) dan penanaman padi dengan teknologi SRI, pemupukan organik + pupuk hayati (T3).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah bakteri metanotrof terbanyak yang dihitung dengan metode MPN terdapat pada T2 dan T3 yaitu > 1100 MPN/ml dan jumlah terkecil pada T0 yaitu 36 MPN/ml. Kemampuan absorpsi metan oleh kultur murni T3 kuning sebesar 49 % sedangkan T3 orange sebesar 98 %. Adapun jenis bakteri yang diperoleh yaitu *Methylocystis* sp. dan *Methylobacter* sp.



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, nikmat dan karuniaNya sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan dan penyusunan skripsi ini, dengan judul “**Isolasi Bakteri Metanotrof dan Deteksi Gen *pmoA* Bakteri Metanotrof pada Ekosistem Padi Sawah**”. Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian dalam mata ajaran Mikrobiologi yang telah dilakukan dari bulan Juli sampai Oktober 2010. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan studi di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Nasril Nasir selaku pembimbing satu dan Bapak Prof. Dr. I Made Sudiana, M. Sc., APU selaku pembimbing dua yang telah banyak memberikan saran, petunjuk dan bimbingan selama penelitian sampai selesainya penulisan skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. Syamsuardi, MSc, selaku Ketua Jurusan, Bapak dan Ibu staf pengajar Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Andalas, yang telah membekali penulis dengan berbagai disiplin ilmu.
2. Drs. Suwirmen, MS sebagai Penasehat Akademik yang telah banyak membantu, memberi nasehat, arahan dan semangat dalam segala urusan akademik penulis.
3. Drs. Zuhri Syam, MP selaku Koordinator Seminar dan Bapak/Ibu karyawan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas yang telah banyak membantu dalam kelancaran penulis menyelesaikan studi.
4. Dr. Heddy Julistiono selaku Kepala Bidang Mikrobiologi serta staf dan karyawan Laboratorium Ekologi Fisiologi Bidang Mikrobiologi Puslit

Biologi LIPI yang telah membantu dalam kelancaran pelaksanaan penelitian penulis.

5. Serta segala pihak yang tidak disebutkan namanya yang telah membantu penulis dalam melaksanakan penelitian ini.

Akhirnya penulis panjatkan doa kehadirat Allah SWT semoga bantuan dari semua pihak menjadi amal kebaikan dan diberi pahala yang setimpal, Amin. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang Mikrobiologi.

Padang, 11 Januari 2011

Penulis



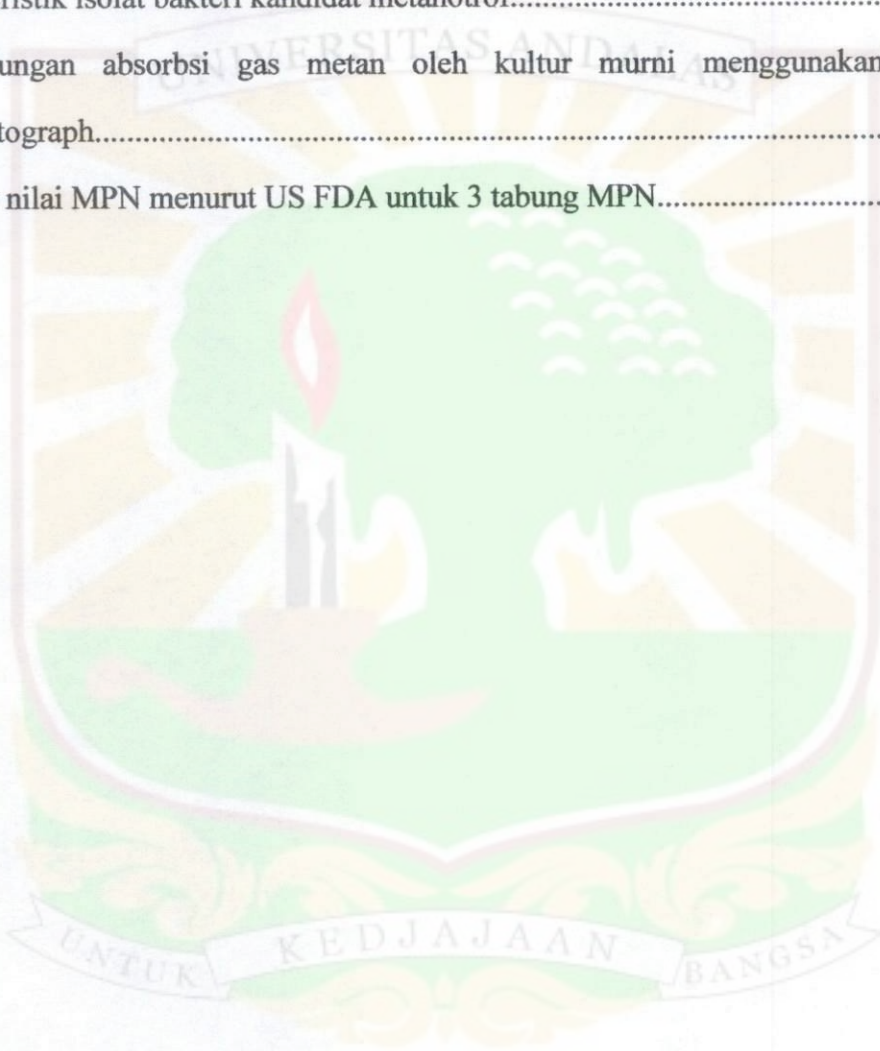
DAFTAR ISI

ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Gas Metan.....	3
2.2 Teknologi SRI.....	7
2.3 Bakteri Metanotrof.....	9
III. PELAKSANAAN PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	12
3.2 Metode Penelitian.....	12
3.3 Alat dan Bahan.....	12
3.4 Cara Kerja	
3.4.1 Pembuatan Medium Metanotrof (NMS).....	14
3.4.2 Penghitungan Populasi Bakteri Metanotrof dengan Metode MPN.....	14
3.4.3 Uji Absorpsi Metan dari kultur campuran.....	15
3.4.4 Kultivasi Bakteri Metanotrof.....	15
3.4.5 Pewarnaan Gram.....	15

3.4.6 Uji Absorpsi Metan dari Kultur Murni.....	16
3.4.7 Analisis Molekuler Gen <i>pmoA</i>	
3.4.7.1 Isolasi Total DNA Bakteri.....	16
3.4.7.2 Amplifikasi PCR gen <i>pmoA</i>	17
3.4.7.3 Elektroforesis.....	18
3.5 Analisis Data.....	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Penghitungan Jumlah Bakteri Metanotrof dengan Metode MPN.....	20
4.2 Kultivasi Bakteri Metanotrof.....	22
4.3 Absorpsi Metan dari Kultur Murni.....	24
4.4 Isolasi Total DNA Bakteri.....	25
4.5 Amplifikasi PCR gen <i>pmoA</i>	26
4.6 Identifikasi Bakteri.....	27
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	32
5.2 Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

1. Deskripsi tipe penanaman padi.....	12
2. Jumlah bakteri metanotrof.....	20
3. Karakteristik isolat bakteri kandidat metanotrof.....	23
4. Penghitungan absorpsi gas metan oleh kultur murni menggunakan gas chromatograph.....	37
5. Standar nilai MPN menurut US FDA untuk 3 tabung MPN.....	38



DAFTAR GAMBAR

1. Tiga jalur metanogenesis.....	5
2. Proses transportasi gas metan dari tanah ke atmosfer.....	6
3. Jalur oksidasi metan dan asimilasi formaldehid dua kelompok utama bakteri metanotrof.....	11
4. Pertumbuhan bakteri metanotrof pada medium NMS.....	22
5. Pewarnaan Gram bakteri metanotrof.....	22-23
6. Grafik absorpsi gas metan dari kultur murni.....	24
7. Hasil amplifikasi gen <i>pmoA</i> dari sampel tanah sawah.....	27
8. Pohon filogeni bakteri metanotrof.....	29
9. Sawah T1, T2 dan T3.....	39
10. Sawah T0.....	39
11. Timbangan digital.....	39
12. pH meter.....	39
13. Autoclave.....	39
14. Tabung double side arms.....	39
15. Elektroforesis.....	39
16. Gas chromatograph.....	40
17. Desikator.....	40
18. Mikroskop.....	40
19. Laminary air flow.....	40
20. Isoil DNA Kit.....	40
21. Beads Cell Disrupter.....	40
22. PCR.....	41
23. BIO-RAD UV Trasilluminator.....	41

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia bersama India dan Cina dikategorikan sebagai tiga negara penghasil metan tertinggi di dunia. Sebagian besar dari metan ini berasal dari kegiatan penanaman padi. Ekosistem sawah menyumbang sekitar 10-25 % total emisi metan dunia (Sakai *et al.*, 2007), sehingga perlu dilakukan penurunan emisi gas metan sebagai usaha mitigasi seperti yang disarankan oleh UNFCCC.

Metan merupakan salah satu gas rumah kaca yang penting dan konsentrasinya di atmosfer terus meningkat selama beberapa dekade ini (Khalil dan Rasmussen, 1990; Steele *et al.*, 1992; Crutzen, 1995). Sawah tergenang merupakan salah satu sumber utama emisi metan di atmosfer (Wassmann *et al.*, 1993; Minami dan Neue, 1994). Emisi ini merupakan hasil dari dua proses: produksi metan oleh bakteri metanogenik di lingkungan anoksik dan oksidasi metan oleh bakteri metanotrof di lingkungan oksik. Aktivitas kedua kelompok bakteri tersebut ditentukan oleh keberadaan jenis terminal elektron aseptor terutama oksigen, redoks potensial, nutrisi dan senyawa organik tanah. Kondisi tersebut juga berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman padi.

Proses produksi metan pada ekosistem sawah sangat kompleks, dekomposisi material organik oleh mikroba dekomposer yang melibatkan banyak enzim penghidrolisis akan mentransformasikan material organik menjadi senyawa-senyawa tertentu yang akan dikonversi menjadi gas metan dan karbondioksida melalui proses metanogenesis. Proses oksidasi metan pada tanah sawah merupakan salah satu faktor yang paling menentukan siklus metan di alam untuk menekan jumlah gas metan yang teremisi ke atmosfer. Bakteri yang berperan dalam proses oksidasi metan lebih

dikenal sebagai bakteri metanotrof. Bakteri ini mampu menggunakan metan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Bakteri pengoksidasi metan mampu mengkonsumsi sampai 90% dari produksi metan yang dihasilkan bakteri metanogen pada zona anaerobik, sebelum akhirnya lepas ke atmosfer. Pemanfaatan bakteri metanotrof pada tanah sawah memberikan dampak yang positif, dimana akan mengurangi produksi metan besar-besaran dari sawah serta membantu dalam program pengurangan pemanasan global.

1.2 Perumusan Masalah

Dari latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah aktivitas bakteri metanotrof pada ekosistem sawah berpengaruh terhadap penurunan emisi gas metan?
2. Apa saja biakan metanotrof yang didapat?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1 Mengetahui aktivitas bakteri metanotrof dalam mereduksi emisi gas rumah kaca metan pada ekosistem sawah.
- 2 Mendapatkan biakan bakteri metanotrof.

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan alternatif pemecahan masalah untuk mengurangi emisi gas metan yang dihasilkan dari sawah dengan stimulasi bakteri metanotrof.
2. Diharapkan hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk penelitian selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gas Metan

Peningkatan efek rumah kaca merupakan aspek penting yang telah menarik perhatian dunia. Metan merupakan salah satu gas rumah kaca yang penting dan memainkan peran besar dalam proses-proses di atmosfer. Sejak 1990, emisi metan menyumbang sekitar 15-20 % emisi gas rumah kaca global (IPCC, 1996). Saat ini konsentrasi metan di atmosfer adalah 1774 ppb dan itu akan meningkat dengan cepat pada angka 1.0 % per tahun (IPCC, 2007). Sawah merupakan salah satu kontributor emisi metan terbesar. Kenyataan menunjukkan bahwa beberapa teknik untuk peningkatan produksi padi dan perbaikan sifat tanah seperti pemberian bahan organik dan pengairan terus-menerus justru meningkatkan emisi metan. Selain itu, penanaman padi dengan tipe tanah terendam adalah sumber antropogenik metan dan emisinya ke atmosfer ada sekitar 60 % (IPCC, 1992).

Emisi metan dari sawah pada dasarnya ditentukan oleh dua proses metabolisme bakteri yaitu produksi metan oleh kelompok bakteri metanogen dan konsumsi metan oleh kelompok bakteri metanotrof (Zehnder dan Stumm, 1988). Metanogenesis terstimulasi oleh kondisi anaerob dengan konsentrasi oksigen rendah, atom karbon labil yang tinggi, redoks potensial < -100 mV (Silver *et al.*, 1999; Ridge dan Firestone, 2005) dan jumlah bahan organik tanah yang dikonversi menjadi asam asetat dan karbondioksida.

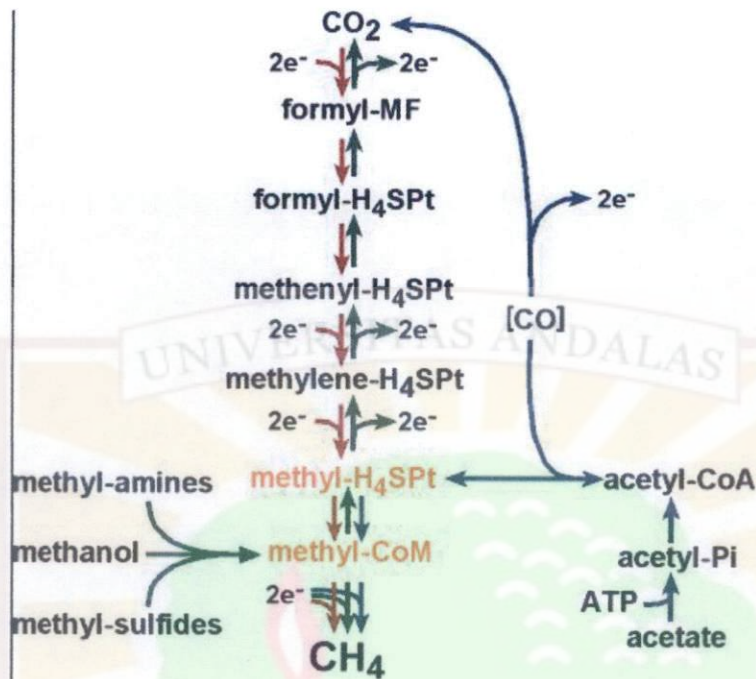
Proses pembentukan gas metan pada ekosistem sawah diawali oleh dekomposisi material organik oleh mikroba dekomposer yang melibatkan beberapa enzim pada proses hidrolisis senyawa polisakarida seperti selulase, amilase dan invertase (Zinder, 1993). Aktivitas enzim lain yang berperan adalah urease, protease

dan lipase (Adam dan Duncan, 2001). Hasil hidrolisis polisakarida menghasilkan senyawa antara yang lebih sederhana (monosakarida). Produk antara selanjutnya memasuki jalur biotransformasi fermentasi yang menghasilkan asam organik seperti asam asetat dan karbondioksida. Pada kondisi anaerob asam asetat dan karbondioksida akan dikonversi menjadi gas metan melalui proses metanogenesis.

Pada tanah sawah, sebagian besar tanah adalah anoksik dan oksidasi metan terbatas pada permukaan tanah, akar dan tanah di sekitar akar (rizosfer). Tanaman lahan basah, termasuk padi, mempunyai suatu aerenkim besar, yang memudahkan pergerakan oksigen pada akar. Dengan cara ini, tanaman dapat menyediakan oksigen untuk oksidasi metan, sehingga mengurangi emisi metan. Akan tetapi, tanaman juga menyediakan sebuah jalur untuk mempermudah pergerakan udara pada tanah, sehingga meningkatkan emisi. Sebagai tambahan, tanaman dapat mempertinggi emisi dengan terus meningkatkan konsentrasi karbon organik labil di rizosfer, poros bagi peningkatan produksi metan.

Tiga jalur utama pembentukan gas metan pada tanah sawah (Shigematsu *et al.*, 2004), seperti yang diperlihatkan pada Gambar 1 (Broad Institute, 2002) :

1. Jalur hidrogenotropik. Mereduksi karbondioksida (CO_2) menjadi metan (CH_4) dengan menggunakan hidrogen (H_2) sebagai elektron donor.
2. Jalur asetoklastik. Asam asetat yang terbentuk akibat dekomposisi bahan organik akan diubah menjadi gugus metil. Elektron hasil oksidasi akan mereduksi gugus metil menjadi metan.
3. Jalur metilotropik. Pembentukan gas metan melalui senyawa karbon tunggal (C_1) seperti metanol, metilsulfida dan metilamin yang direduksi agar menghasilkan elektron. Elektron yang dihasilkan akan digunakan untuk mereduksi gugus metil menjadi metan.



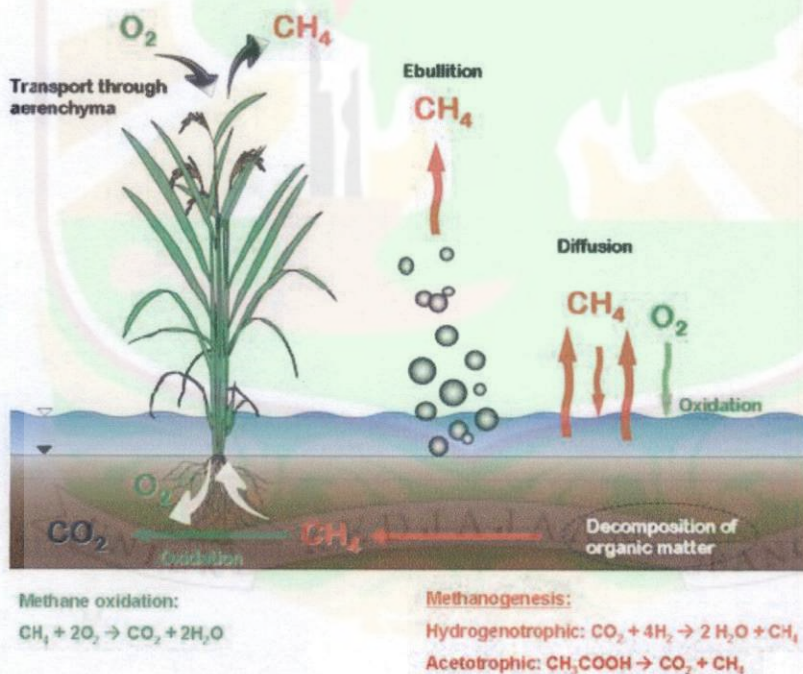
Gambar 1. Tiga jalur metanogenesis; jalur hidrogenotropik (panah merah), jalur metilotropik (panah hijau) dan jalur asetoklastik (panah biru) (Broad Institute, 2002).

Menurut Aiju dan Mingxing (1996), lepasnya gas metan dari tanah sawah ke atmosfer dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya:

1. Faktor biotik. Produksi gas metan tergantung pada aktivitas bakteri metanogen yang menggunakan asam asetat (CH_3COOH) dan karbondioksida (CO_2) sebagai sumber substrat utama. Substrat lain yang dapat digunakan adalah asam format, metanol dan metilamin.
2. Faktor abiotik. Faktor abiotik yang paling menentukan aktivitas biotransformasi senyawa organik menjadi gas metan adalah redoks potensial dan suhu. Redoks potensial ini sangat dipengaruhi oleh keberadaan oksigen.

Emisi gas metan dari tanah sawah dapat terjadi melalui tiga proses utama (Gambar 2). Pertama, pembentukan gelembung-gelembung udara. Gelembung-gelembung gas metan sebagian besar terjadi pada tanah yang tidak ditanami tanaman. Kemampuan gelembung gas melewati lapisan aerob sampai akhirnya

teremisikan ke atmosfer merupakan proses yang membutuhkan suatu aplikasi fisik. Kedua, metan teremisikan melalui proses difusi gas. Gas-gas metan dengan sendirinya akan terdifusi ke atmosfer pada permukaan lapisan air. Kecepatan emisi gas metan melalui proses difusi di pengaruhi oleh absorpsi metan oleh bakteri metanotrof. Ketiga, emisi gas metan melalui tanaman padi. Proses ini dimulai dari masuknya gas metan ke dalam jaringan epidermis akar dan ikut terdifusi melalui sistem pengangkutan air. Gas metan akan terdifusi sampai jaringan aerenkim, sebelum akhirnya teremisi ke atmosfer. Jaringan aerenkim pada tanaman berfungsi untuk mentransportasikan oksigen untuk respirasi ke arah akar dan sebaliknya (Aiju dan Mingxing, 1996; Duval dan Goodwin, 2000).



Gambar 2. Proses transportasi gas metan dari tanah ke atmosfer (IBP ETH, 2009)

Konsep utama dalam penekanan laju emisi gas metan dari tanah sawah adalah dengan meningkatkan konsentrasi oksigen pada lapisan anaerobik tanah (rizosfer)

atau dengan cara membuat kondisi lahan sawah tidak tergenang air sehingga menjadi kondisi yang aerobik dan mengurangi suplai karbon yang mudah terurai. Dengan bertambahnya konsentrasi oksigen, proses produksi metan dapat berkurang karena metan teroksidasi secara biologis oleh bakteri metanotrof.

Proses produksi metan pada ekosistem sawah sangat kompleks, dekomposisi material organik oleh mikroba dekomposer yang melibatkan banyak enzim penghidrolisis akan mentransformasikan material organik menjadi senyawa-senyawa tertentu yang akan dikonversi menjadi gas metan dan karbondioksida melalui proses metanogenesis. Proses oksidasi metan pada tanah sawah merupakan salah satu faktor yang paling menentukan siklus metan di alam untuk menekan jumlah gas metan yang teremisi ke atmosfer.

Pemasukan intensif bahan organik berupa jerami pada keadaan tergenang sangat ideal bagi berlangsungnya dekomposisi bahan anaerobik di lahan sawah. Selain itu, penanaman padi dengan tipe tanah terendam adalah salah satu sumber antropogenik metan dan emisinya ke atmosfer ada sekitar 60 % (IPCC, 1992).

2.2 Teknologi SRI

System Of Rice Intensification (SRI) merupakan salah satu pendekatan dalam praktek budidaya padi yang menekankan pada manajemen pengelolaan tanah, tanaman, dan air melalui pemberdayaan kelompok dan kearifan lokal yang berbasis pada kegiatan ramah lingkungan. Gagasan SRI pada mulanya dikembangkan di Madagaskar awal tahun 1980. Pengembangan SRI juga dilakukan melalui uji coba di berbagai negara Asia, termasuk Asia Tenggara. Penerapan gagasan SRI berdasarkan pada enam komponen penting : (1) transplantasi bibit muda, (2) bibit ditanam satu batang, (3)

jarak tanam lebar, (4) kondisi tanah lembab/irigasi berselang, (5) melakukan pendangiran/penyiangan, (6) menggunakan bahan organik/kompos.

Menurut Prayatna (2007), terdapat beberapa komponen penting dalam penerapan SRI yaitu:

- 1) Bibit dipindahkan ke lapangan (transplantasi) lebih awal (bibit muda). Secara umum, SRI menganjurkan untuk menanam bibit muda saat berumur 8-15 hari. Transplantasi pada saat bibit muda dapat mengurangi guncangan dan meningkatkan kemampuan tanaman dalam memproduksi batang dan akar selama pertumbuhan vegetatif sehingga batang yang muncul lebih banyak jumlahnya dalam satu rumpun maupun bulir padi yang dihasilkan oleh malai. Disamping itu juga agar mendapatkan jumlah anakan dan pertumbuhan akar maksimum.
- 2) Bibit ditanam satu-satu. Hal ini dimaksudkan agar tanaman memiliki cukup ruang untuk menyebar dan memperdalam perakaran. Tanaman tidak bersaing terlalu ketat untuk memperoleh ruang tumbuh, cahaya, atau hara dalam tanah sehingga sistem perakaran menjadi sangat baik.
- 3) Jarak tanam lebar, minimal 25 cm x 25 cm. Hal ini bertujuan agar akar tanaman tidak berkompetisi dan mempunyai ruang untuk berkembang sehingga anakan maksimum dapat dicapai.
- 4) Kondisi tanah tetap lembab tapi tidak tergenang air (irigasi berselang). SRI menganjurkan teknik irigasi berselang agar tercipta kondisi perakaran yang teroksidasi, untuk meningkatkan kesuburan tanah dan mendapatkan akar tanaman yang panjang dan lebat.
- 5) Pendangiran. SRI menganjurkan 2-3 kali pendangiran dengan menggunakan gasrok atau lalandak, selain untuk membersihkan gulma, memperbaiki struktur tanah dan meningkatkan aerasi tanah.

- 6) Penggunaan bahan organik (kompos) yang bertujuan untuk memperbaiki struktur tanah agar padi dapat tumbuh baik dan hara tersupply kepada tanaman secara baik.

2.3 Bakteri Metanotrof

Metanotrof adalah sebuah grup yang unik dari bakteri methylophilic yang memanfaatkan metan sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi (Hanson dan Hanson, 1996). Metanotrof mengoksidasi metan dengan menggunakan oksigen (O_2) sebagai elektron aseptor terminal. Di bawah kondisi yang aerob, metanotrof mengkombinasikan oksigen dan metan untuk membentuk formaldehid yang kemudian bergabung membentuk senyawa organik. Oksidasi metan dapat terjadi pada lingkungan mikro yang bersifat aerob pada zona perakaran dan pada bagian yang bersifat oksik pada lapisan permukaan tanah (Bedard dan Knowles, 1989).

Berdasarkan morfologi sel, ultrastruktur, filogeni dan jalur metabolik, metanotrof dapat dikelompokkan kedalam 3 grup yaitu tipe I, tipe II dan tipe X. Metanotrof yang termasuk Tipe I menggunakan ribulosa monofosfat (RuMP) sebagai jalur metabolisme utama dalam asimilasi formaldehid. Metanotrof tipe I mencakup genus *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, *Methylothermus*, *Methylosarcina*, *Methylohalobius* dan *Methylosoma* yang termasuk kedalam subdivisi gamma proteobakteria. Metanotrof yang termasuk Tipe II menggunakan jalur metabolisme serin dalam asimilasi formaldehid. Metanotrof tipe II meliputi genus *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella* dan *Methylocapsa*, termasuk kedalam subdivisi alfa proteobakteria (Hanson dan Hanson, 1996). Tipe X merupakan metanotrof yang memiliki sifat kombinasi antara metanotrof Tipe I dan Tipe II. Metanotrof yang termasuk Tipe X

dapat menggunakan jalur metabolisme RuMP ataupun jalur metabolisme serin untuk asimilasi formaldehid. Bakteri yang termasuk ke dalam Tipe X adalah genus *Methylococcus* (Chistoserdova *et al.*, 2005).

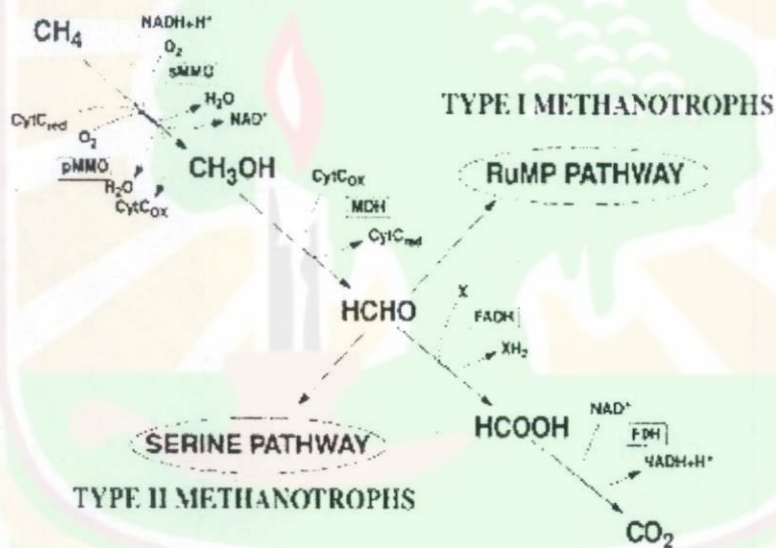
Proses oksidasi metan oleh bakteri metanotrof dikatalisis oleh enzim metan monooksigenase (MMO) yang berperan mengkonversi metan menjadi metanol (Anthony, 1986; Bedard dan Knowles, 1989). Enzim monooksigenase mampu mereduksi ikatan O=O menjadi dioksigen. Satu atom oksigen tereduksi menjadi H₂O, dan yang lain berikatan dengan metan membentuk metanol (Lipscomb, 1994). Ada 2 bentuk dari enzim MMO ini: bentuk partikulat yang berikatan dengan membran (*particulate metan monooxygenase* / pMMO) dan bentuk yang terlarut dalam sitoplasma (*soluble metan monooxygenase* / sMMO) (Bender dan Conrad, 1995). pMMO terdapat pada semua metanotrof kecuali genus *Methylocella* (Theisen *et al.*, 2005), sedangkan sMMO hanya terdapat pada strain tertentu saja (Murrell, 2000).

Proses kedua dalam oksidasi metan adalah transformasi metanol menjadi formaldehid. Proses ini dikatalisis oleh enzim metanol dehidrogenase (MDH). Aktivitas MDH merupakan langkah kunci dalam metabolisme bakteri pengguna karbon tunggal seperti *Methylotrroph*. Formaldehid yang dihasilkan akan memasuki jalur utama metabolisme yakni melalui jalur metabolisme RuMP (Strom *et al.*, 1974) atau melalui jalur metabolisme serin (Quayle, 1980) seperti yang terlihat pada Gambar 3.

Bender dan Conrad (1995), menunjukkan bahwa secara ekologis, kondisi optimum bakteri metanotrof untuk tumbuh dan mengoksidasi metan secara optimal di lingkungan yaitu: kapasitas air dalam tanah 25-30%, suhu sekitar 25-30 °C, pH antara 6.0-7.5, konsentrasi ammonia antara 12-61 mM dan konsentrasi Cu tidak lebih

dari 4.3 mM. Heyer *et al.* (1984) juga mengatakan bahwa metan dalam konsentrasi tinggi juga diperlukan metanotrof pada fase pembelahan selnya.

Bakteri pengoksidasi metan mampu mengonsumsi sampai 90% dari produksi metan yang dihasilkan bakteri metanogen pada zona anaerobik sebelum akhirnya lepas ke atmosfer. Pemanfaatan bakteri metanotrof pada tanah sawah memberikan dampak yang positif, dimana akan mengurangi produksi metan besar-besaran dari sawah serta membantu dalam program pengurangan pemanasan global.



Gambar 3. Jalur oksidasi metan dan asimilasi formaldehid dua kelompok utama bakteri metanotrof (Hanson dan Hanson, 1996)

Pada umumnya, kelompok bakteri metanotrof merupakan jenis mikroba dalam komunitas kecil, hanya sekitar 1-23% dari total mikroorganisme yang ada di dalam tanah dan mempunyai kebutuhan nutrisi yang selektif sehingga sulit untuk dikultivasi. Proses oksidasi metan pada tanah sawah merupakan salah satu faktor yang paling menentukan siklus metan di alam untuk menekan jumlah gas metan yang teremisi ke atmosfer.

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai Oktober 2010, bertempat di Laboratorium Ekologi dan Fisiologi, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong.

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif. Sampel tanah sawah diambil secara random pada empat petakan sawah dengan tipe penanaman yang berbeda seperti tergambar pada tabel berikut :

Tabel 1. Deskripsi tipe penanaman padi

Perlakuan	Deskripsi
T0	Penanaman padi secara konvensional
T1	Penanaman padi dengan teknologi SRI, pemupukan anorganik
T2	Penanaman padi dengan teknologi SRI, pemupukan organik
T3	Penanaman padi dengan teknologi SRI, pemupukan organik + pupuk hayati

3.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: desikator, tabung *double side arms* volume 50ml, selang (*Master Flex, precision Tubing*), oven, GC-14B *gas chromatograph* SHIMATZU, botol sampel, selang gas, stopwatch, plastik, skop kecil, pipet mikro, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bioshaker, *laminary air flow*

(SANYO Bio Clean Bench MCV-B161F, Osaka), autoclave (TOMY SX-500, Seiko), *vortex* (SIBATA TTM-1, Taito-ku, Tokyo), mesin sentrifugasi (KOKUSAN H-15 FR dan 5415 R, Shizuoka), mesin *shaker* inkubator (TAITEC BR-23FP, Saitama-ken), timbangan digital (Sartorius TE-1502S, Landmeier), penangas medium (IKA RH *basic* 2, Staufen), pH meter (Fisher Sci. *Accument basic* AB 15, Canada), *sterilizing filter*, mesin pendingin *freezer* 4°C dan -20°C, tabung *beat beads* 2 ml, tabung mikro berukuran 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml dan 0,1 ml (Eppendorf), pipet mikro, tip (putih, kuning dan biru) steril, *syringe*, mesin *Mini Beads Cell Disrupter*, mesin pendaur suhu (*Takara PCR Thermal Cycler*, Shiga), mesin elektroforesis (*Mupid-EXU Sub Marine Electrophoresis System*, Seraing), *Bioinstrument ATTA Documentation Gel*, dan kamera digital (CASIO M10 7.0 Megapixels, Tokyo). cawan petri, bunsen, plastik wrap, aluminium foil, dan alat tulis.

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: aquadest, alkohol, NaNO_3 , NH_4Cl , KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}/\text{K}_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2/\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4/\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, EDTA, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, larutan trace element, ekstrak tanah, agar, gas metan murni, oksigen, bahan-bahan untuk analisis molekuler : *Isoil Kit DNA Isolation*, TAE *buffer* (50x, 1x, dan 0,5x), TE *Buffer*, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 20%, kloroform, ethanol 70%, sodium asetat 3 M, GoTaq® Green Master Mix, 2X (Buffer pH 8.5, 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP and 3mM MgCl_2 , loading dye) (Promega, Madison), *nuclease free water*, marker DNA *ladder* 100 bp, *primer pmoA* A189b *Forward* (5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'), A682 *Reverse* (5'-GAASGCNGAGAAGAASGC-3') (Invitrogen Lab. Inc., Minato, Tokyo), agarose, *loading buffer*, etidium bromide.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Medium Metanotrof (NMS)

Medium pertumbuhan untuk kultivasi bakteri metanotrof adalah *nitrate mineral salts* (NMS). Ditimbang 1 gram NaNO_3 ; 0.25 gram NH_4Cl ; 0.26 gram KH_2PO_4 ; 0.74 gram $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} / \text{K}_2\text{HPO}_4$; 1 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.2 gram $\text{CaCl}_2 / \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.004 gram $\text{FeSO}_4 / \text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.001 gram EDTA; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sedikit; 10 ml Larutan trace element; 10 ml ekstrak tanah, 980 ml aquadest. Semua bahan dimasukkan kedalam botol scot, kemudian dipanaskan diatas hotplate sampai semua bahan larut. Setelah itu, pH medium diatur menjadi 7.2. Lalu medium disterilisasi dengan autoclave pada tekanan 15 atm dan suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.2 Penghitungan Populasi Bakteri Metanotrof dengan Metode MPN

Untuk menghitung bakteri metanotrof pada sampel alami, digunakan metode MPN dengan tabung reaksi atau botol serum yang bisa ditutup dengan tutup botol atau sumbat karet, dan biakan yang positif dan negatif ditentukan dengan kekeruhan yang tampak atau dengan mengukur konsumsi metan (Espiritu *et al.*, 1997; Iwamoto *et al.*, 2000; Jouliau *et al.*, 1997), atau ditandai dengan munculnya suatu koloni mikroba yang melekat pada dinding tabung reaksi.

Adapun cara untuk menghitung populasi bakteri metanotrof dengan metoda MPN yaitu: diambil sampel tanah dari permukaan sampai kedalaman ± 5 cm dari masing-masing perlakuan (T0, T1, T2, T3). Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik dan dihomogenisasi. Diambil 1 gram tanah dari masing-masing perlakuan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquadest steril. Di shaker selama 1 hari. Hari berikutnya, masing-masing sampel diencerkan sampai pengenceran 10^{-5} . Sementara itu, disiapkan tabung reaksi yang berisi 4.5 ml

medium metanotrof cair. Kemudian dimasukkan 0.5 ml hasil pengenceran dari pengenceran 10^{-1} - 10^{-5} kedalam 4.5 ml medium metanotrof cair. Selanjutnya, tabung ini dimasukkan kedalam *chamber* dan ditutup rapat. Udara dalam *chamber* divacum, kemudian dimasukkan gas metan dan oksigen setiap hari. *Chamber* selanjutnya dishaker selama \pm 1 bulan. Setelah itu, diamati pertumbuhan bakteri tersebut.

3.4.3 Uji Absorpsi Metan dari *Subcultures*

Dipersiapkan tabung *double side arms* yang diisi 30 ml medium metanotrof cair. Selanjutnya suspensi bakteri yang pertumbuhannya paling baik dari MPN dipindahkan ke tabung *double side arms*. Lalu, diisi dengan gas metan dan oksigen, di shaker setiap hari selama 1 bulan. Kemudian diuji absorpsi metan menggunakan GC-14B gas chromatograph SHIMATZU.

3.4.4 Kultivasi Bakteri Metanotrof

Disiapkan cawan petri yang berisi medium metanotrof padat. Kemudian suspensi bakteri pada tabung *double side arms* dikultur ke medium metanotrof dengan metoda streak plate. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi dalam desikator yang sudah dimodifikasi, diberi gas metan dan oksigen setiap hari selama 2 minggu. Kemudian diamati morfologi koloni nya.

3.4.5 Pewarnaan Gram

Diambil sedikit biakan bakteri menggunakan tusuk gigi steril, kemudian ditempatkan di atas objek glass dan ditetesi dengan aquadest, lalu disebar. Inilah yang dinamakan olesan. Selanjutnya olesan ini difiksasi. Setelah itu olesan dibasahi dengan kristal violet selama 60 detik, lalu zat pewarna violet dibilas dengan air. Kemudian olesan dibasahi dengan larutan yodium selama 60 detik, dan dibilas

dengan air. Selanjutnya olesan dicuci dengan larutan alkohol 95% selama 15-30 detik. Olesan kemudian diwarnai dengan safranin selama 30 detik. Bakteri gram positif akan berwarna violet sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah.

3.4.6 Uji Absorpsi Metan dari *Purecultures*

Purecultures bakteri kandidat metanotrof (T0, T1, T2, T3) dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 25 ml medium metanotrof cair dengan jarum ose sebanyak 2 kali ulangan. Kemudian tabung tersebut diisi dengan gas metan 10 ml dan oksigen 5 ml. Selanjutnya dishaker selama 1 minggu. Lalu absorpsi metan sampel diuji dengan GC-14B *gas chromatograph* SHIMATZU.

3.4.7 Analisis Molekuler Gen *pmoA*

3.4.7.1 Isolasi Total DNA Bakteri

Ekstraksi dan pemurnian DNA dari sampel tanah sawah dilakukan sesuai dengan petunjuk ekstraksi DNA untuk sedimen, menggunakan Isoil™ DNA Kit (Meis dan Chen, 2003), yaitu : 0.5 gr sampel tanah ditempatkan pada tabung *beat beads* 2 ml. Ke dalam tabung *beat beads* ditambahkan 950 µl Larutan Pelisis BB (pH 8,6) yang mengandung 1% SDS, 100 mM Tris HCl, 200 mM EDTA, dan 200 mM Na₂HPO₄, dan 50 µl Larutan Pelisis 20 S yang mengandung 20% SDS. Setelah itu, tabung dihomogenisasikan dengan menggunakan alat *Mini Beads Cell Disrupter* dengan kecepatan 2500 rpm selama 2 menit. Tabung yang berisi larutan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam dan tabung dibolak-balik setiap 10 menit agar larutan menjadi homogen, larutan kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 12000 rpm pada suhu ruangan 20°C. Sebanyak 600 µl supernatan ditransfer ke dalam tabung eppendorf 2 ml baru dan ditambahkan 400 µl larutan purifikasi (pH 8) yang terdiri dari 2,5 M NaCl dan 5% CTAB. Tabung diinkubasi

selama 5 menit pada suhu 65°C dan dibolak-balik setiap 2,5 menit lalu dinginkan pada suhu ruangan, setelah itu tambahkan 600 µl kloroform dingin. Setelah di homogenisasi dengan vortex selama 15 detik, larutan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 12000 rpm pada suhu 20°C. Sebanyak 800 µl supernatan ditransfer ke tabung eppendorf baru secara hati-hati, kemudian ke dalamnya ditambahkan 800 µl larutan pengendap yang mengandung 12% Polyetilenglikol (PEG) dan 1,5 M Tris-HCl, lalu dihomogenisasi perlahan-lahan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 16000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dibuang perlahan, lalu ke dalam tabung ditambahkan larutan pencuci sebanyak 1 ml dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 16000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang dengan hati-hati (jangan sampai menyentuh DNA di dinding tabung). Langkah terakhir adalah menambahkan etanol 70% dingin sebanyak 1 ml dan 100 µl Natrium asetat, kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 16000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Pellet DNA dikeringkan dengan membalik tabung di atas tisu kering selama 15 menit. Ke dalam tabung yang berisi pellet DNA dilarutkan dengan 20-50 µl Tris-EDTA buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA; pH 8). Larutan DNA ditapping sampai larut lalu dispindown dengan menggunakan sentrifugator selama 1 detik. Setelah didapatkan DNA hasil isolasi total komunitas bakteri, dilanjutkan dengan pengecekan hasil isolasi DNA melalui elektroforesis.

3.4.7.2 Amplifikasi PCR Gen *pmoA*

Keberadaan bakteri metanotrof dideteksi melalui keberadaan gen-gen fungsional yang diamplifikasi dengan desain *primer* yang spesifik yaitu gen *pmoA* dengan *primer* fA189b-rA682 (Henckel dkk., 1999). Produk PCR dibuat dengan mencampurkan secara homogen komponen-komponen berikut ini: 7,5 µl ddH₂O (*Nuclease free water*), 12,5 µl Go Taq Green Master Mix 2x, 2,0 µl *Forward primer*

(0.4 pmol/ μ l), 2,0 μ l *Reverse primer* (0.4 pmol/ μ l), dan 1,0 μ l DNA cetakan, secara berurutan di dalam tabung PCR steril berukuran 0,5 ml dan dilakukan pada suhu dingin di dalam kotak es. Tabung PCR yang berisi campuran di atas kemudian diketuk-ketukan hingga larutan tercampur merata dan dilakukan sentrifugasi selama beberapa detik agar campuran turun hingga ke dasar tabung. Proses PCR berlangsung pada mesin pendaaur suhu (PCR *thermal cycler*) dengan profil PCR (Otsuka dkk., 2007): 1 siklus meliputi denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, 30 siklus meliputi denaturasi pada 94°C selama 30 detik, penempelan *primer* pada 50-55 °C selama 30 detik, pemanjangan pada 72°C selama 1 menit, dan 1 siklus akhir meliputi pemanjangan pada 72°C selama 7 menit, pendinginan pada 04°C selama 5 menit, inkubasi pada 16°C selama tak hingga (∞). Tabung PCR kemudian diangkat dari mesin pendaaur suhu dan hasil amplifikasi diinkubasi pada suhu -20°C. Setelah itu, dilanjutkan dengan pengecekan hasil PCR melalui elektroforesis (Otsuka, *et al.*, 2007).

3.4.7.3 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan untuk mendeteksi hasil isolasi DNA dan amplifikasi PCR. Pertama, dilakukan pembuatan gel agarose dimana 1% gel agarose (0,5 gr agarose dalam 50 ml TAE *buffer* 1x) dipanaskan sampai larut. Gel yang sudah larut ditunggu sampai hangat kemudian dituang ke dalam cetakan yang telah disiapkan sebelumnya. Gel dibiarkan memadat selama 30 menit. Apabila gel sudah siap, sisir dilepaskan dari cetakan kemudian gel diletakkan ke dalam tangki elektroforesis yang berisi TAE *buffer* 1x hingga terendam setinggi 1-2 mm. Pengecekan hasil isolasi DNA dilakukan dengan mencampurkan 3 μ l DNA hasil ekstraksi dengan 1 μ l *loading buffer* di atas plastik *parafilm*, kemudian diaduk perlahan dengan pipet dan dimasukkan ke dalam sumur yang terdapat pada gel. DNA hasil amplifikasi PCR dideteksi dengan

memasukkan 3 μ l hasil PCR dan 2 μ l gen penanda DNA ke dalam sumuran pada gel. Selanjutnya alat elektroforesis disambungkan ke sumber tegangan. Proses elektroforesis berlangsung selama 25 menit pada tegangan 100 volt. Gel direndam di dalam larutan etidium bromida selama 15 menit lalu dibilas dalam TAE *buffer* 1x. Gel diletakkan di atas UV *transluminator* dan difoto (Otsuka, *et al.*, 2007).

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini, diamati secara deskriptif.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penghitungan Jumlah Bakteri Metanotrof dengan Metode MPN

Penghitungan jumlah bakteri metanotrof pada tanah sawah sangat penting dilakukan karena berhubungan dengan emisi gas metan yang dihasilkan pada ekosistem sawah. Pada ekosistem sawah, ada dua kelompok bakteri tanah yang berperan mengatur emisi metan yaitu kelompok bakteri metanogen dan metanotrof. Bakteri metanogen adalah kelompok bakteri penghasil metan, sedangkan metanotrof adalah kelompok bakteri pengguna metan sebagai sumber karbon dan energinya.

Bakteri metanotrof sangat sulit dikultivasi dan membutuhkan waktu inkubasi cukup lama untuk menumbuhkannya. Pengamatan pada inkubasi 48 jam tidak cukup untuk mendapatkan bakteri metanotrof. Pada pengamatan hari ke-20, terlihat adanya koloni bakteri yang melekat pada dinding tabung reaksi ditabung pengenceran T0, T1, T2, T3 dan tidak berada melayang bersamaan dengan medium metanotrof. Bakteri tersebut diduga merupakan bakteri metanotrof. Sebagaimana yang diketahui bahwa bakteri metanotrof merupakan bakteri yang hidup dalam keadaan aerobik. Berikut adalah tabel jumlah bakteri metanotrof dengan menggunakan metode MPN :

Tabel 2. Jumlah bakteri metanotrof

Perlakuan	Pengenceran			Indeks MPN (MPN/ml)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
T0	2	3	1	36
T1	3	2	3	290
T2	3	3	3	> 1100
T3	3	3	3	> 1100

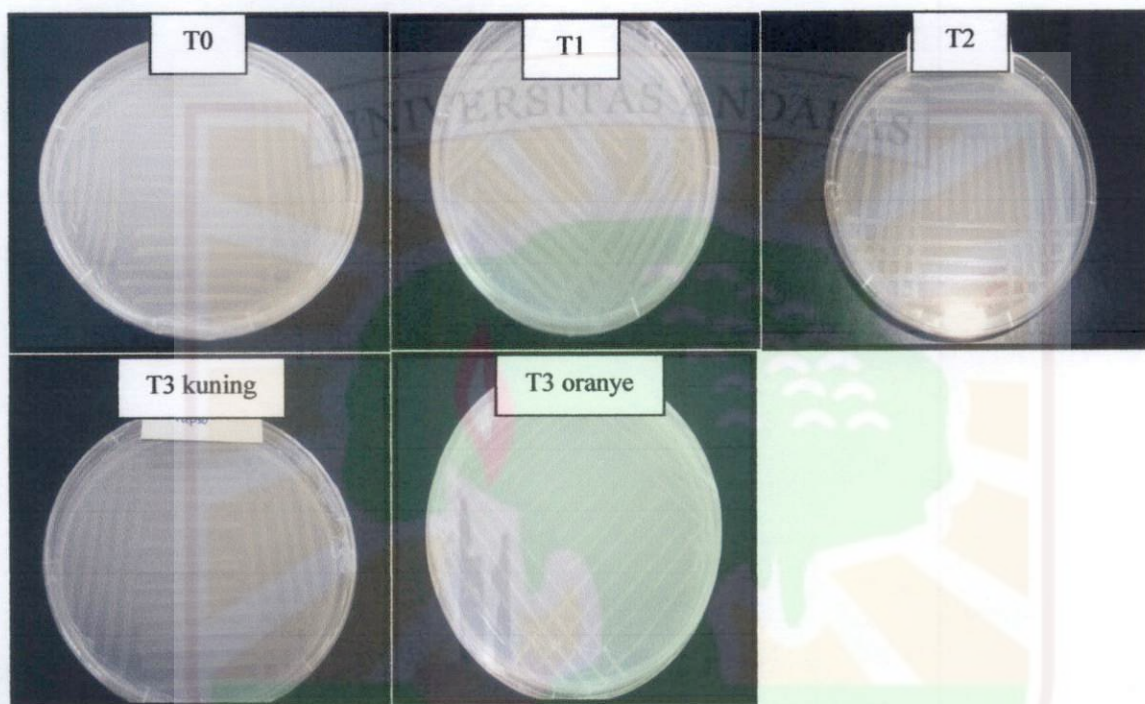
Berdasarkan Tabel 3 diatas, maka diketahui jumlah bakteri metanotrof terbanyak terdapat pada perlakuan T2 (tanah sawah SRI dengan pemupukan organik) dan T3 (tanah sawah SRI dengan pemupukan organik + pupuk hayati) yakni sebesar > 1100 MPN/ml. Sedangkan jumlah bakteri metanotrof yang paling sedikit terdapat pada T0 (sawah konvensional) yakni sebesar 36 MPN/ml. Pada T0 juga terdapat bakteri metanotrof yang biasanya terdapat pada rizosfer atau dekat dengan daerah permukaan yang berdekatan dengan daerah oksik. Suplai oksigen merupakan faktor utama untuk multiplikasi dan pertumbuhan bakteri metanotrof (Dubey *et al.*, 2003)

Adanya sejumlah bakteri yang diduga sebagai bakteri metanotrof juga dapat dikaitkan dengan rata-rata konsentrasi gas metan yang dihasilkan dari sawah. Pada T0 ditemukan jumlah bakteri metanotrof sedikit karena kondisi sawah hampir seluruhnya anaerobik maka besarnya konsentrasi gas metan yang dikeluarkan dari sawah T0 sangat tinggi. Hal ini berbanding terbalik dengan tanah sawah yang diberi perlakuan pada T1, T2 dan T3 yakni jumlah bakteri yang diduga sebagai bakteri metanotrof lebih banyak dibandingkan T0 maka bakteri ini dapat menggunakan gas metan dengan cepat sebagai satu-satunya sumber karbon sehingga besarnya konsentrasi gas metan yang dikeluarkan dari sawah menjadi lebih kecil.

Metode MPN telah digunakan secara luas untuk menghitung kepadatan bakteri terutama sekali yang sulit menggunakan metode penghitungan jumlah koloni pada medium padat (Alexander, 1982). Akan tetapi, metode MPN relatif kurang teliti jika dibandingkan dengan metoda penghitungan jumlah koloni, dan cara ini memerlukan sejumlah besar tabung, yang membuat metode ini sulit dan memakan waktu.

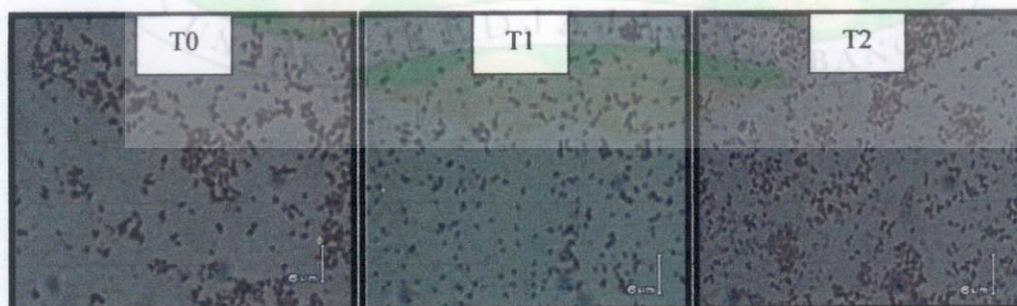
4.2 Kultivasi Bakteri Metanotrof

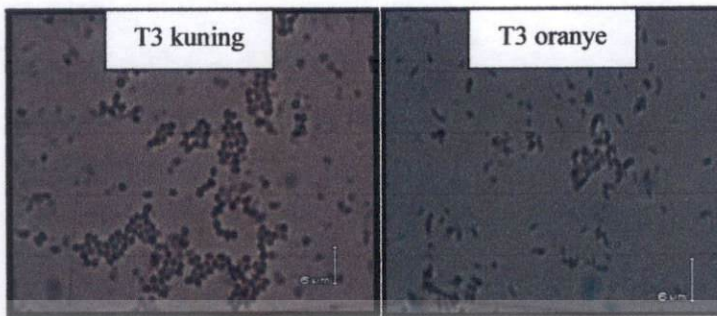
Kultivasi bakteri metanotrof pada medium NMS setelah diinkubasi selama 1 minggu, diperoleh 5 isolat seperti terlihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 4. Pertumbuhan bakteri metanotrof pada medium NMS

Hasil pewarnaan gram terhadap isolat bakteri metanotrof, diperoleh hasil seperti terlihat pada gambar dibawah ini :





Gambar 5. Pewarnaan Gram isolat bakteri metanotrof

Pengamatan terhadap karakter morfologi isolat bakteri metanotrof, diperoleh hasil seperti terlampir pada tabel berikut ini :

Tabel 3. Karakteristik isolat bakteri kandidat metanotrof

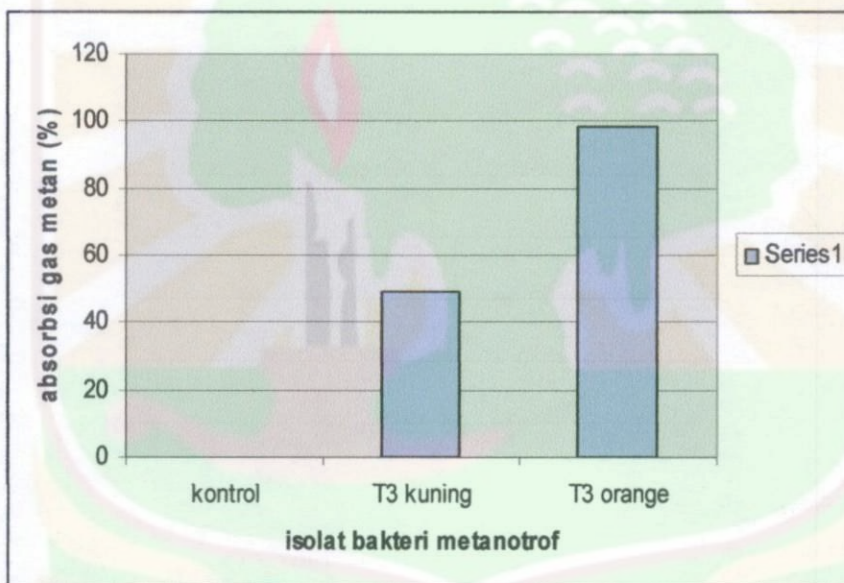
Karakteristik	T0	T1	T2	T3 (a)	T3 (b)
Warna koloni	oranye	putih	kuning	Kuning	oranye
Bentuk koloni	circular	circular	circular	Circular	circular
Ukuran koloni	kecil	kecil	Kecil	Kecil	kecil
Bentuk tepi	Rata	rata	Rata	Rata	rata
Pigmentasi ekstraseluler	tidak ada	tidak ada	tidak ada	tidak ada	tidak ada
Pewarnaan gram	negatif	negatif	negatif	Negatif	negatif
Bentuk sel	coccus	coccus	coccus	Coccus	Bacil

Karakter morfologi isolat bakteri kandidat metanotrof yang didapat menunjukkan warna koloni berkisar dari putih sampai oranye. Bentuk koloni dari masing-masing isolat sama, yaitu berbentuk circular dengan tepi yang rata dan ukuran koloni kecil. Pada pewarnaan gram, semua isolat kandidat metanotrof dari tanah sawah merupakan gram negatif. Bakteri gram negatif mempunyai struktur lapisan yang kompleks yang berperan dalam pengikatan gas metan. Genus bakteri metanotrof yang ditemukan di alam seperti *Methylosinus*, *Methylobacter*, *Methylocystis*, *Methylomicrobium*, *Methylosarcina*, *Methylothermus*, *Methylocella*, *Methylomonas*, *Methylosoma*, dan *Methylopila* merupakan gram negatif dan belum pernah ditemukan bakteri metanotrof gram positif (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008). Sel bakteri

kandidat metanotrof yang didapat pada T0, T1, T2 dan T3 kuning berbentuk coccus, sedangkan pada T3 oranye berbentuk bacil. Walaupun karakteristik koloni menunjukkan kemiripan, hanya berbeda pada warna koloni dan bentuk sel, belum dapat dipastikan isolat ini merupakan bakteri yang sama.

4.3 Absorpsi Metan dari Kultur Murni

Dari pengukuran absorpsi metan pada kultur murni bakteri metanotrof setelah diinkubasi selama 1 minggu, didapatkan hasil sebagai berikut :



Gambar 6. Grafik absorpsi gas metan dari *purecultures*

Gambar 6 menunjukkan bahwa tingkat absorpsi metan tertinggi setelah diinkubasi selama 1 minggu terjadi pada isolat T3 oranye yaitu sekitar 98 %. Sedangkan isolat T3 kuning hanya mampu mengabsorpsi gas metan sebesar 49 %. Hal ini disebabkan karena biomassa sel isolat T3 orange lebih besar daripada isolat T3 kuning sehingga kemampuannya untuk mengabsorpsi metan juga lebih tinggi.

Dua isolat bakteri metanotrof yang didapat berasal dari sampel tanah T3 yaitu sawah dengan teknologi SRI, pemupukan organik + pupuk hayati (*Azospirillum* +

PSB). Bakteri pelarut fosfat berperan penting pada tanah dalam pengadaan fosfat yang diperlukan bagi tumbuhan dan mikroba lain. Fosfat tersebut menstimulasi pertumbuhan bakteri metanotrof. Bakteri tersebut mampu tumbuh pada kondisi tanah yang mengandung kurang dari 1 % KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 (Tsubota *et al.*, 2005; Haouari, 2006). Bakteri metanotrof mengoksidasi metan pada kondisi aerob.

4.4 Isolasi Total DNA Bakteri

Sampel T0, T1, T2 dan T3 memperlihatkan total genomic DNA yang tinggi dan bersih dan kemungkinan akan bekerja baik untuk amplifikasi PCR. Isolasi DNA total bakteri dilakukan pada sampel tanah sawah T0, T1, T2 dan T3. Proses isolasi DNA menggunakan metode *bead beating* dengan menggunakan Isoil Kit. Isolasi total DNA menggunakan metode *bead beating* dan Isoil Kit bertujuan untuk memperoleh DNA bakteri tanah yang banyak dan murni. Metode *bead beating* memiliki kelebihan dibandingkan metode isolasi DNA lain, dengan penggunaan kit komersil dalam prosedurnya (Hoshino dan Matsumoto, 2003).

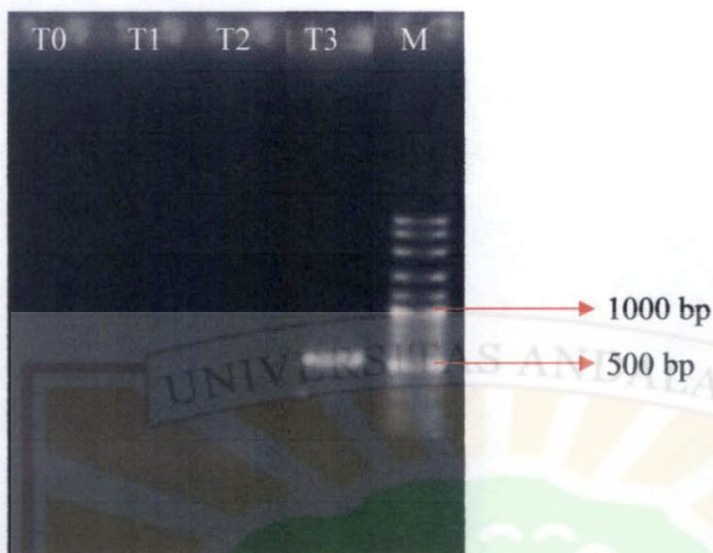
Proses pelisisan sel bakteri dan adanya asam humat seringkali menjadi masalah utama dalam mengekstraksi DNA bakteri dari sampel tanah. *Bead Cell Disrupter* membantu proses pelisisan sel bakteri dalam tanah dengan homogenisasi pada kecepatan tinggi. Bagaimanapun, untuk mendapatkan DNA yang besar, murni dan terfragmentasi, ditentukan oleh faktor homogenisasi. Isoil Kit terdiri dari Larutan Pelisis (*Lysis Buffer*), Larutan Purifikasi, Larutan Presipitasi, dan Larutan Pencuci, yang merupakan empat komponen utama dalam protokol isolasi DNA. Proses pelisisan sel bakteri pada sampel tanah sawah menggunakan SDS berperan dalam merusak membran sel dengan menghilangkan komponen lipid. Homogenisasi *bead beater* dengan kecepatan 2500 rpm akan mempermudah proses pelisisan sel. Purifikasi dengan menggunakan CTAB bertujuan untuk menghilangkan protein dan

senyawa-senyawa lainnya. Presipitasi DNA untuk menghilangkan sisa protein dan asam humat dengan menggunakan PEG (polietilenglikol) dan teknik sentrifugasi yang mampu memisahkan DNA dari kotoran akibat proses pelisisan berdasarkan berat jenis molekulnya. Kloroform dan Etanol 70% digunakan pada tahap pencucian agar memperoleh DNA yang murni. DNA yang terisolasi dicek keberadaannya melalui elektroforesis yang ditandai dengan proses interkalisasi molekul DNA dan etidium bromida. Migrasi DNA selama proses elektroforesis akan berlangsung dari kutub negatif menuju kutub positif. Hasil isolasi total DNA bakteri pada tanah sawah akan digunakan sebagai DNA cetakan dalam proses analisis selanjutnya.

4.5 Amplifikasi PCR Gen *pmoA*

Deteksi awal keberadaan bakteri metanotrof pada tanah sawah (T0, T1, T2 dan T3) dilakukan dengan mendeteksi keberadaan gen fungsional pengkode enzim *particulate methane monooxygenase* yang dimiliki oleh bakteri metanotrof dalam proses oksidasi metan. Amplifikasi PCR menggunakan primer yang spesifik terhadap daerah gen pengkode enzim tersebut. Hasil amplifikasi yang positif ditunjukkan dengan adanya pita-pita DNA pada gel setelah dielektroforesis.

Hasil amplifikasi gen-gen fungsional yang berperan dalam proses oksidasi gas metan dari sampel tanah sawah T0, T1, T2 dan T3 berdasarkan pita DNA seperti ditampilkan pada Gambar 8. yang menunjukkan bahwa pada keempat sampel tanah hanya pada T3 yang terdeteksi adanya komunitas bakteri metanotrof melalui amplifikasi gen pengkode enzim pMMO. DNA yang berhasil teramplifikasi dengan target sekuen gen pengkode enzim pMMO berada pada kisaran target sekuen ± 500 bp. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel tanah T3 terdapat komunitas bakteri metanotrof. McDonal *et al.* (1994) menjelaskan bahwa produk PCR target gen *pmoA* memiliki kisaran 500 bp.



Gambar 7. Hasil amplifikasi gen *pmoA* dari sampel tanah sawah. M marker, T0 sampel tanah sawah konvensional, T1 sampel tanah sawah SRI dengan pemupukan anorganik, T2 sampel tanah sawah SRI dengan pemupukan kompos, T3 sampel tanah sawah SRI dengan pemupukan kompos + pupuk hayati.

Suhu pada proses penempelan *primer* (*annealing*) adalah salah satu parameter penting yang perlu penyesuaian dalam reaksi PCR. *Primer* akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA genom pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen pada *primer* (Yuwono, 2006). Profil PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *pmoA* menggunakan suhu penempelan *primer* yang meningkat dari 50°C ke 55°C, hal ini bertujuan untuk meningkatkan efisiensi *primer* terlebih dahulu baru kemudian meningkatkan spesifitas reaksi amplifikasi agar *primer* menempel pada sekuen yang tepat (Yuwono, 2006).

4.6 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan metode sequencing menggunakan ABI 3010 DNA sequenser (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Hasil sequencing dianalisa menggunakan Bioedit. Nukleotida dan asam amino sequen dari fragmen gen *pmoA* dianalisis secara manual dan dibandingkan dengan sequen dari Gen Bank database.

16S rDNA sequen dilakukan alignment dengan clustal X dan untuk analisis filogeni dilakukan ARB software. Jarak evolusi dihitung berdasarkan persamaan Jukes-Cantor dan Felsenstein. Pohon filogeni dibuat dengan *neighbour-joining algorithm*.

Dari hasil sequencing DNA bakteri metanotrof, diketahui bahwa bakteri tersebut termasuk kedalam genus *Methylobacter* (T3 kuning) dan *Methylocystis* (T3 orange).

Sel dari *Methylobacter* memiliki karakteristik berbentuk bulat atau elips, lebar 0,8-1,5 x 1,2-3.0 μm . kebanyakan singel atau berpasangan, walaupun formasi rantai lazim terjadi pada beberapa strain pada fase pertumbuhan eksponensial akhir. Jika motil, flagellum dengan tipe singel polar. *Methylobacter lutes* adalah nonmotil, sedangkan *Methylobacter whittenburyi* biasanya motil saat pertama diisolasi tetapi secara spontan bisa kehilangan kemampuannya setelah *disubculture* secara ekstensif. Kebanyakan pergerakan tampak pada kultur muda dari *Methylobacter whittenburyi* dan *Methylobacter marinus*, kultur tua sering tanpa sel motil (Romanovskaya *et al.*, 1978 ; Bowman *et al.*, 1993b). Dinding sel mempunyai ultrastruktur Gram negatif. Sel diselubungi kapsul yang dapat dideteksi dengan pewarnaan tinta India.

Spesies *Methylobacter* adalah mesofilik, dan kebanyakan strain tumbuh pada suhu 15-40 °C dengan pertumbuhan optimum terjadi sekitar suhu 30°C. pH untuk pertumbuhan antara 5,5-9, dengan pertumbuhan optimum terjadi sekitar pH 7.

Methylobacter merupakan metanotrof aerob abligat dengan oksigen sebagai elektron aseptor. Memanfaatkan metan sebagai sumber karbon dan energi. Oksidase dan katalase positif. Menggunakan jalur ribulosa monofosfat (RuMP) untuk megubah formaldehid menjadi biomassa sel. Aktivitas enzim kunci dari jalur serin transhidroksimetilase tidak ada. Fiksasi nitrogen tidak ada. Termasuk kedalam kelompok gammaproteobakteria, ordo Methylococcales, famili Methylococcaceae.

Genus *Methylocystis* merupakan Gram negatif. Panjang selnya 0,5-1,5 μm dengan lebar 0,3-0,5 μm . Reproduksi dengan pembelahan sel. Nonmotil. Tumbuh pada temperatur antara 20-40 $^{\circ}\text{C}$ dan pH 5,0-9,0. Pertumbuhan optimal terjadi pada suhu sekitar 30 $^{\circ}\text{C}$ dengan pH 7,0. Bersifat kemoheterotrof aerob. Termasuk metanotrof grup II. Hanya memanfaatkan senyawa berkarbon tunggal melewati jalur serine transhydroxymethylase. Senyawa dengan ikatan karbon-karbon tidak digunakan sebagai sumber karbon dan energi. Tidak terjadi pertumbuhan pada medium organik kompleks seperti nutrien agar. Tidak terdapat siklus Benson-Calvin untuk fiksasi CO_2 tetapi terdapat siklus trikarboksilat (Romanovskaya, Malashenko, and Bogachenko 1978).



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Kemampuan absorpsi metan oleh kultur murni T3 kuning sebesar 49% sedangkan T3 oranye sebesar 98%
2. Jenis bakteri yang diperoleh yaitu *Methylocystis* sp. dan *Methylobacter* sp.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap bakteri hasil isolasi dari tanah sawah untuk pengembangan pupuk yang mampu mengurangi emisi metan di alam dan perlu adanya kajian lebih dalam tentang bakteri dari tanah sawah yang berfungsi menurunkan emisi metan secara alam.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiju, D. and W. Mingxing. 1996. *Model for Methane Emissions from Rice Fields and Its Application in Southern China*. Adv. Atmos. Sci. 13: 159-170.
- Alexander, M. 1982. *Most Probable Number Method for Microbial Populations*, p. 815-820. In A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (ed.), *Methods of Soil Analysis*, part 2, *Chemical and Microbiological Properties*, *Agronomy Monograph* no.9, 2nd ed. ASA-SSSA, Madison, WI, USA.
- Anthony, C. 1986. *Bacterial Oxidation of Methane and Methanol*, p.113-210. In A. H. Rose (ed.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press. London.
- Bedard, C. and R. Knowles. 1989. *Physiology, Biochemistry and Specific Inhibitors of CH₄, NH₄ and CO Oxidation by Methanotrophs and Nitrifiers*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 53: 68-84.
- Bender, M. and R. Conrad. 1995. *Effect of Methane Concentrations and Soil Conditions on The Induction of Methane Oxidation Activity*. Soil Biol. Biochem. 27: 1517-1527.
- Bowman, J. P., L. Jimenez, I. Rosario, T. C. Hazen, and G. S. Sayler. 1993. *Characterization of The Methanotrophic Bacterial Communities Present in A Trichloroethylene-Contaminated Subsurface Groundwater Site*. Appl. Environ. Microbiol. 59:2380-2387.
- Broad Institute. 2002. *Methanogenesis Pathway*. Alamat situs: <<http://www.broadinstitute.org/annotation/microbes/methanosarcina/>>. Tanggal diakses: 3 Maret 2009.
- Chistoserdova, L., J. A. Vorholt, and M. E. Lidstrom. 2005. *A Genomic View of Methane Oxidation by Aerobic Bacteria and Anaerobic Archae: Mini Review*. Genome Biol. 6: 208.1-208.6.
- Crutzen, P. J. 1995. *On The Role of CH₄ in Atmospheric Chemistry: Sources, Sinks and Possible Reductions in Anthropogenic Sources*. Ambio 24:52-55.
- Doronina, N.V, Y.A Trotsenko, V.I. Krausova, E. S. Boukygnia, and T.P. Tourova. 1998. *Methylopila capsulata gen. nov., sp. nov., A Novel Nonpigmented Aerobic Facultatively Methylophilic Bacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 48, p. 1313-1321.
- Dubey, S.K., Padmanabhan, P., Purohit, H.J., and Upadhyay S.N. 2003. *Tracking of Methanotrophs and Their Diversity in Paddy Soil: A Molecular Approach*. Curr. Sci. 85: 92-95.

- Dunfield, P.F., V.N. Khmelenina, N.E. Suzina, Y.A. Trotsenko, and S.N. Dedysh. 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov., A Novel Methanotroph Isolated from An Acidic Forest Cambisol. DOI 10.1099/ iks. 0.02481-0.
- Duval, B. and S. Goodwin. 2000. *Methane Production and Release from Two New England Peatlands*. Internatl. Microbiol. 3: 89-95.
- Espiritu, B.M., K. Adachi and T. Senboku. 1997. *Effect of Application of Rice Straw and Cellulose on Methane Emission and Biological Nitrogen Fixation in A Subtropical Paddy Field*. Soil Sci. Plant Nutr. 43: 729-734.
- Hanson, R. S., and T. E. Hanson. 1996. *Metanotrophic Bacteria*. Microbiol. Rev. 60:439-471.
- Haouari, O., M.L. Fardeau, L. Casalot, J.L. Tholozan, M. Hamdi, and B. Olivier. 2006. *Isolation of Sulfat Reducing Bacteria from Tunisian Marine Sediment and Description of Desulfovibrio bizertensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 56, p. 2909-2913.
- Heyer, A. J., A. Costello, M. E. Lidstrom, and J. C. Murrell. 1984. *Evidence That Particulate Methane Monooxygenase and Ammonia Monooxygenase May Be Evolutionarily Related*. FEMS Microbiol. Lett. 132: 203-208.
- Hoshino, Y. T. and N. Matsumoto. 2003. *An Improved DNA Extraction Method Using Skim Milk from Soils that Strongly Adsorb DNA*. Microbes Environ. 21: 112-121.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change): *Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing*, in: IPCC Fourthly Assessment Report, 141-142, 2007.
- Iwamoto, T., K. Tani, K. Nakamura, Y. Suzuki, M. Kitagawa, M. Eguchi and M. Nasu. 2000. *Monitoring Impact of In Situ Biostimulation Treatment on Groundwater Bacterial Community by DGGE*. FEMS Microbiol. Ecol. 32: 129-141.
- Joulian, C., S. Escoffier, J. Le Mer, H.-U. Neue and P.A. Roger. 1997. *Populations and Potential Activities of Methanogens and Methanotrophs in Rice Fields: Relations with Soil Properties*. Eur. J. Soil Biol. 33: 105-116.
- Kalyuzhnaya, M., V. Khmelenina, B. Eshinimaev, D. Sorokin, H. Fuse, M. Linstrom, and Y. Trotsenko. 2008. *Classification of Haloalkaliphilic and Haloalkalitolerant Methanotrophs Provisionally Assigned to Genera Methylococcus and Methylobacter and Emended Description of The Genus Methylococcus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 58, p. 591-596.

- Khalil, M. A. K., and R. A. Rasmussen. 1990. *Atmospheric Metan: Recent Global Trends*. Environ. Sci. Technol. 24:549-553.
- Lindner, A.S., A. Pacheco, H.C. Aldrich, A.C. Staniec, L.Uz, and D.J. Hodson. 2007. *Methylocystis hirsuta* sp. nov., A Novel Methanotroph Isolated from Groundwater Aquifer. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 57, p. 1891-1900.
- Lipscomb, J. D. 1994. *Biochemistry of The Soluble Methane Monooxygenase*. Annu. Rev. Microbiol. 48: 371-399.
- Malashenko, Y. R., V. A. Romanovskaya, V. N. Bogachenko and A. D. Shved. 1975. *Thermophilic and Thermotolerant Methane Assimilating Bacteria*. Mikrobiologiya 44:855-862.
- McDonald, I.R., Bodrossy L, Chen Y. and Murrell J.C. 2008. *Molecular Ecology Techniques for The Study of Aerobic Methanotrophs*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74. p. 1305-1315.
- Minami, K., and H. U. Neue. 1994. *Rice Paddies as A Metan Source*. Clim. Change 27:13-26.
- Murrell, J. C., I. R. McDonald, and B. Gilbert. 2000. *Regulation of Expression of Metan Monooxygenases by Copper Ions*. Trends Microbiol. 8:221-225.
- Otsuka, S., I. M. Sudiana, A. Komori, K. Isobe, S. Deguchi, M. Nishiyama, H. Shimizu, and K. Senoo. 2007. *Community structure of soil bacteria in a tropical rainforest several years after fire*. Microbes Environ. 23: 49-56.
- Quayle, J. R. 1980. *Microbial Assimilation of Cl Compounds*. Biochem. Soc. Trans. 8: 1-10.
- Ridge, J. P. and M. K. Firestone. 2005. *Redox Fluctuation Structures Microbial Communities in A Wet Tropical Soil*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 6998-7007.
- Romanovskaya, V. A., Y. R. Malashenko, and V. N. Bogachenko. 1978. *Corrected Diagnoses of The Genera and Species of Methane-Utilizing Bacteria*. Mikrobiologiya 47:96-103.
- Shigematsu, T., Y. Tang, T. Kobayashi, H. Kawaguchi, S. Morimura, and K. Kida. 2004. *Effect of Dilution Rate on Metabolic Pathway Shift Between Aceticlastic and Nonaceticlastic Methanogenesis in Chemostat Cultivation*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4048-4052.
- Silver, W., A. E. Lugo, and M. Keller. 1999. *Soil Oxygen Availability and Biogeochemistry Along Rainfall and Topographic Gradients in Upland Wet Tropical Forest Soils*. Biogeochem. 44: 301-328.

- Steele, L. P., E. J. Dlugokencky, P. M. Lang, P. P. Tans, R. C. Martin, and K. A. Masarie. 1992. *Slowing Down of The Global Accumulation of Atmospheric Metan During The 1980s*. *Nature* 358:313–316.
- Strom, T., T. Ferenci, and J. R. Quayle. 1974. *The Carbon Assimilation Pathways of Methylococcus capsulatus, Pseudomonas methanica and Methylosinus trichosporium (OB3b)*. *Biochem. J.* 144: 465–476.
- Theisen, A. R., M. H. Ali, S. Radajewski, M. G. Dumont, P. F. Dunfield, I. R. McDonald, S. N. Dedysh, C. B. Miguez, and J. C. Murrell. 2005. *Regulation of Metan Oxidation in The Facultative Metanotrof Methylocella silvestris BL2*. *Mol. Microbiol.* 58:682–692.
- Tsubota, J., B.Ts. Eshinimaev, V.N. Khmelenina, and Y.A. Trotsenko. 2005. *Methylothermus thermalis gen. nov., sp. nov., A Novel Moderately Thermophilic Obligate Methanotroph from A Hot Spring in Japan*. *International Journal of Systematic*. Vol. 55, p. 1877-1884.
- Wassmann, R., H. Papen, and H. Rennenberg. 1993. *Metan Emission from 1206 Bosse and Frenzel Appl. Environ. Microbiol. Rice Paddies and Possible Mitigation Strategies*. *Chemosphere* 26:201–217.
- Wise, M.G, J.V. McArthur, and L.J. Shimkets. 2001. *Methylosarcina fibrata gen. nov., sp. nov. and Methylosarcina quisquiliarum sp. nov., Novel Type I Methanotroph*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 51, p. 611-621.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi polymerase Chain Reaction*. CV Andi. Yogyakarta.
- Zehnder, A. J. B. and Stumm W. 1988. *Geochemistry and Biogeochemistry of Anaerobic Habitats*, p.1-38. In A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of Anaerobic Organisms*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Zinder, S. H. 1993. *Physiological Ecologi of Methanogen*, p.128-206. In J. G. Ferry (ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. Chapman and Hall Inc. New York.

LAMPIRAN

Tabel 4. Perhitungan absorpsi gas metan oleh kultur murni menggunakan gas chromatograph

Kode sampel	Time	Peak area standar	Peak area sampel	Konsentrasi standar	Konsentrasi sampel	Persentase
kontrol	0.437	304980	127823	100	41.91192865	0
T3 kuning	0.445	304980	64930	100	21.28992065	49.203195
T3 orange	0.427	304980	1972	100	0.646599777	98.457242

START

T3
orange

0.427
STOP

CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 50

FILE METHOD 0
41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.427	1972			100	
TOTAL		1972			100	

START

T3
kuning

0.445
STOP

CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 52

FILE METHOD 0
41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.445	64930			100	
TOTAL		64930			100	

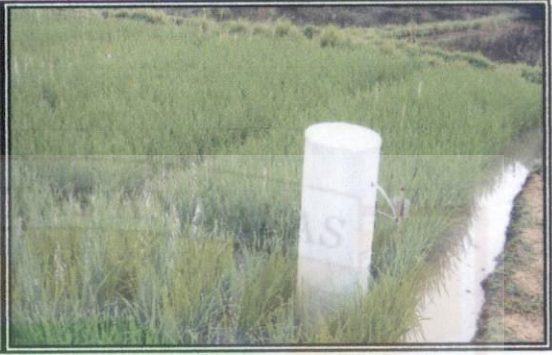
Gambar 10. Chromatogram absorpsi metan oleh kultur murni

Tabel 5. Standar Nilai Most Probable Number (MPN) Menurut US FDA untuk 3 Tabung MPN

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--



Gambar 9. Sawah T1, T2 dan T3



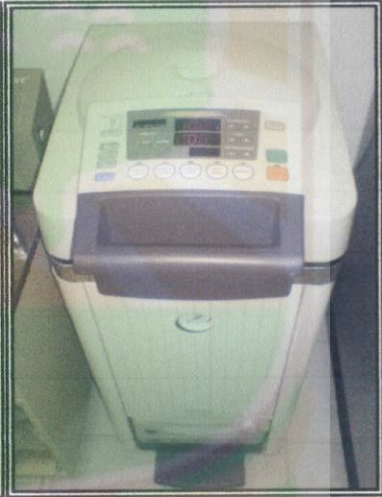
Gambar 10. Sawah T0



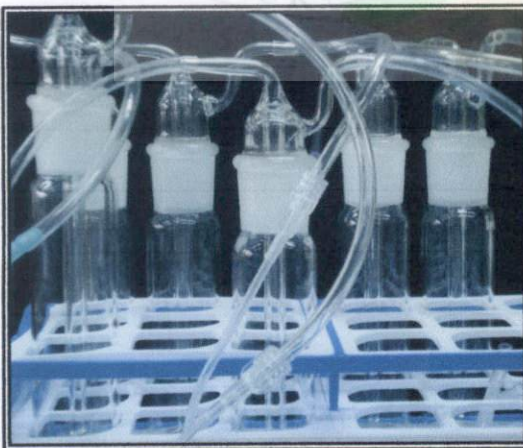
Gambar 11. Timbangan Digital



Gambar 12. pH meter



Gambar 13. Autoclave Digital



Gambar 14. Tabung double side arms

Gambar 15. Elektroforesis



Gambar 16. Gas chromatograph

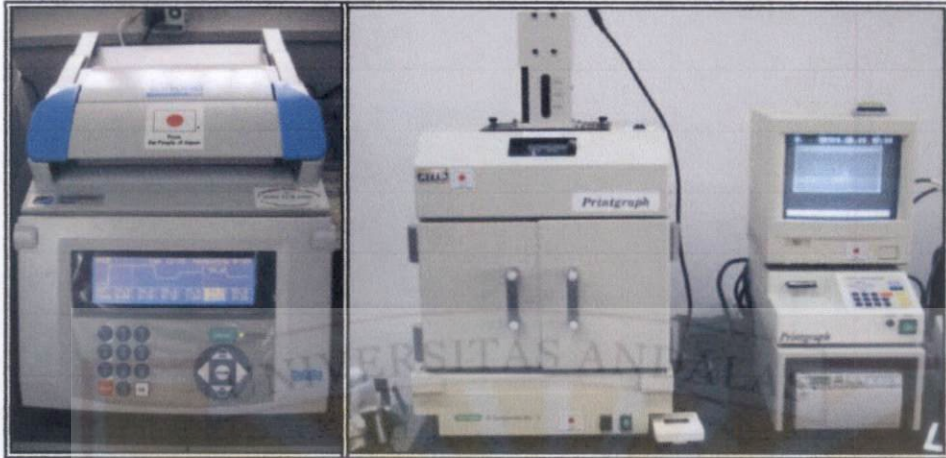
Gambar 17. Desikator



Gambar 18. Mikroskop

Gambar 19. Laminary air flow





Gambar 22. PCR

Gambar 23. BIO-RAD UV Transilluminator

